



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS
DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO
AISLADAS DE QUESO COTIJA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

BRAVO MENDOZA AMANDA



México, D.F.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

2008



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	Prof. María del Carmen Wachter Rodarte
Vocal	Prof. María Elena Cañizo Suárez
Secretario	Prof. Maricarmen Quirasco Baruch
1er. Suplente	Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López
2º. Suplente	Prof. Agustín Reyó Herrera

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 312. Departamento de Biotecnología y Alimentos.

Proyecto financiado por el PAPIIT IN200705 "Caracterización de la microbiota presente en quesos tradicionales mexicanos".

Y con apoyo del Subprograma 127 Formación Básica en Investigación 2006.

Asesor del tema:



Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor técnico:



Idalia María Antonieta Flores Argüello

Sustentante:



Amanda Bravo Mendoza

Agradezco sinceramente:

A la Dra. Maricarmen Quirasco por invitarme a participar en este proyecto, por su apoyo, entusiasmo y paciencia. Y por su confianza en mi trabajo.

A la Mtra. Idalia Flores y a la Mtra. Sandra Pérez Murguía por asesorarme y apoyarme cuando las necesité durante la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Amelía Farrés, la Dra. Amanda Gálvez y el Dr. Guillermo Aguilar, por sus asesorías y observaciones. Y a todo el equipo de trabajo del laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, en especial a mis compañeras Verónica García, Nayeli Hernández, Verónica Hernández y Berenice Zúñiga.

A todas las demás personas involucradas en este proyecto: Dra. Carmen Wachter, Dr. Mariano García Garibay y Dra. Judith Jiménez. Y a quienes permitieron que este trabajo pudiera realizarse por completo: Dr. Arturo Navarro, Profa. Julieta Sandoval, Dr. Ruiz Terán y al Dr. Eduardo Bárzana por prestar sus instalaciones y equipos, así como al personal de sus equipos de trabajo.

A mis profesores que durante la carrera me enseñaron no sólo lo relacionado con sus materias, sino también compartieron sus ideas y conocimiento sobre la vida y a quienes les tengo mucha estima: Jesús Gumaro, Beatriz Serrano, Agustín Reyó, Olga Velázquez, Sergio Álvarez, de nuevo Maricarmen Quirasco, Amanda Gálvez y Carmen Wachter.

A la Facultad de Química en donde pasé los mejores años de mi vida hasta ahora, donde conocí tanta gente valiosa y en donde no sólo aprendí de química sino de mí misma.

Y por supuesto a esta mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se nos ha dado todo el conocimiento, los recursos y las actividades que queremos aprovechar. Ha sido un honor pertenecer a ella.

DEDICATORIAS

Mi familia:

A mi querida madre Carmen Mendoza Cámara, por su energía y valor, por su cariño y alimento, por cuidarme, leerme y cantarme, por mucho más...

A Gonzalo de Anda Vizcarra, mi querido papá, quien me ha dado algo mejor que la vida: su amor, educación, ejemplo, apoyo y guía...

A mi querida hermanita Mariana, por darme su mano y cariño en los momentos más dolorosos. Por compartir tanto y ser tan diferentes...

A mi querida Xuliana, la hermanita con quien he compartido cosas más importantes que la sangre...

...mil gracias, los quiero tanto.

A mis abuelos queridos, Afrania, Antonio, Enriqueta' y Gilberto. Porque sencillamente sin ustedes no estaría yo aquí...

A mis tías Emma, Gabriela y Lucrecia, porque junto con mi madre y abuela, han sido un ejemplo de fortaleza y valor, por su cariño y apoyo...

... muchas gracias.

A mis primos y primas por lo que hemos compartido y por lo que cada quien ha vivido, espero que todos logremos el éxito que deseamos, los quiero.

Y a mi tía Carlota por quien siento un gran cariño a pesar de la distancia.

Mis amigos:

A mis amigos de la prepa: Angie, Carmen, Nadia, Alejandro S. e Ivan, por compartir tantos años juntos, a pesar del tiempo y la distancia. En especial mi querida Viri, porque además de ser una muy buena amiga eres una gran persona, un ser muy valioso y admirable. A Alejandro Z. ...

...Saben que los he querido mucho.

A Raquel, por tu apoyo y por ser más que una amiga, como una hermana, por compartir tantos momentos y cambios en mí, por ayudarme a ser más libre...

...gracias por tanto amiguita.

A René, por esta amistad tan importante, por tu ejemplo y por compartir ese viaje tan increíble...

...muchas gracias amiga.

A Ligia, por todo tu apoyo y amistad. Te agradezco tantas cosas.

A Donovan, mi querido Luminou, por ser como un hermano y cuidarme siempre que puedes.

A Olmo, por hacerme compañía, por ser como eres y ser mi amigo.

A Job, por ser tan buen ser humano, tan buen amigo y consejero.

A Manuel y Youssef por compartir conmigo el principio de esta carrera y ser mis amigos.

A Luis Lima y Adrián por ser temporalmente mis hermanitos postizos.

A todos mis locos amigos P.rones a quienes les agradezco tantos ratos de diversión.

A Citlalin, por ser no sólo una amiga sino una guía en mi alma. Gracias por toda tu ayuda.

A Erica, por tu compañía y amistad.

A todas las personas que he conocido en esta querida Facultad, por cruzar su camino conmigo, compartir un momento, el estrés y una sonrisa.

Y a Raúl, por compartir cada día, apoyarme e intentar comprenderme. Gracias por estar ahora, espero que compartamos un camino.

Tu siempre amiga Amanda



*I am a bird girl now
I've got my heart
Here in my hands now*

*I've been searching
For my wings some time*

*I'm gonna be born
Into soon the sky*

*'Cause I'm a bird girl
And the bird girls go to heaven*

*I'm a bird girl
And the bird girls can fly*

Bird girls can fly

... y el mundo sonríe conmigo

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GENERAL	4
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	4
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES	5
3.1 EL QUESO COTIJA	5
3.2 GENERALIDADES DEL QUESO	12
3.3 BACTERIAS LÁCTICAS. SU IMPORTANCIA Y FUNCIÓN EN ALIMENTOS ...	18
3.3.1 Generalidades	18
3.3.2 Actividad de las Bacterias Lácticas	18
3.3.3 BAL reportadas en alimentos artesanales	22
3.4 MICROORGANISMOS COLIFORMES	24
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS	26
CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA	27
5.1 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
5.2 MUESTRAS	27
5.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	29
5.3.1 Preparación de las Muestras	29
5.3.2 Dinámica de Poblaciones Microbianas	30
5.3.2.1 Pruebas Microbiológicas Generales	30
5.3.2.1.1 Determinación de mesófilos aerobios	30
5.3.2.1.2 Determinación de mohos y levaduras	31
5.3.2.1.3 Determinación de coliformes totales	32
5.3.2.2 Cuantificación General de Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	32
5.3.3 Aislamiento, Cuantificación e Identificación de BAL	34
5.3.3.1 Aislamiento Selectivo y Cuantificación de BAL	34
5.3.3.2 Selección y Purificación de Cepas	39
5.3.3.3 Conservación de Cepas Seleccionadas en Perlas de Vidrio Perforadas (Chaquiras)	39
5.3.3.4 Identificación Bioquímica de las BAL Seleccionadas	40
5.3.3.4.1 Patrón de fermentación de carbohidratos	41
5.3.3.4.2 Crecimiento en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI)	42
5.4 ANÁLISIS FISCOQUÍMICO	43
5.4.1 Preparación de las Muestras	43
5.4.2 Determinación de la Actividad Acuosa (a_w)	44
5.4.3 Determinación del pH	44
5.4.4 Determinación de la Acidez como Porcentaje de Ácido Láctico	45

Contenido	Página
CAPÍTULO 6. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	46
6.1 PRIMERA ETAPA	46
6.1.1 Dinámica de Poblaciones: Análisis Microbiológico General y Cuantificación de BAL	46
6.1.2 Resultados Fisicoquímicos	51
6.1.3 Comparación de Resultados Fisicoquímicos y la Cuenta Microbiana	53
6.1.3.1 Queso 1.....	54
6.1.3.2 Queso 2.....	59
6.1.3.3 Queso 3.....	62
6.1.3.4 Comportamiento general en las piezas analizadas.....	66
6.2 SEGUNDA ETAPA	72
6.2.1 Aislamiento Selectivo y Cuantificación de BAL	72
6.2.2 Conservación de las BAL Seleccionadas en Perlas de Vidrio Perforadas (Chaquiras)	75
6.2.3 Identificación Bioquímica de las BAL Seleccionadas	76
6.2.3.1 Patrón de Fermentación de Carbohidratos.....	78
6.2.3.2 Crecimiento en Agar Infusión Cerebro Corazón.....	80
6.2.3.3 Identificación de Cepas de <i>Enterococcus</i>	81
6.2.4 Presencia de <i>Enterococcus</i> en alimentos	85
6.2.4.1 Importancia de <i>Enterococcus</i> en leche y su presencia en productos lácteos.....	85
6.2.4.2 Patogenicidad intrínseca y virulencia potencial de los enterococcus.....	87
6.2.5 Presencia de <i>Lactobacillus pentosus</i> en alimentos	89
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	91
CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS Y PROYECCIONES A FUTURO	94
ANEXOS	
TÉCNICAS	
1. TOMA DE MUESTRAS A DISTINTOS TIEMPOS DE MADURACIÓN	96
2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	97
3. DETERMINACIÓN DE MESÓFILOS AEROBIOS	99
4. DETERMINACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS	102
5. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES	104
6. CUANTIFICACIÓN GENERAL DE BAL	109
7. AISLAMIENTO SELECTIVO Y CUANTIFICACIÓN DE BAL	111
8. SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CEPAS	113
9. CONSERVACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS EN PERLAS DE VIDRIO PERFORADAS (CHAQUIRAS)	114
10. PATRÓN DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS	119
11. CRECIMIENTO EN AGAR INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI)	123
12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACUOSA (a_w)	125
13. DETERMINACIÓN DEL PH	126
14. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ COMO PORCENTAJE DE ÁCIDO LÁCTICO	128

Contenido	Página
RESULTADOS	
15. RESULTADOS DE LA DINÁMICA DE POBLACIONES.....	129
16. RESULTADOS FÍSICOQUÍMICOS.....	131
17. HOJAS DE RESULTADOS DEL PATRÓN DE FERMENTACIÓN DE CHO'S...	132
18. CARACTERIZACIÓN DE BAL POR MÉTODOS MOLECULARES.....	137
19. IMPORTANCIA DE <i>ENTEROCOCCUS</i> EN LECHE Y SU PRESENCIA EN PRODUCTOS LÁCTEOS.....	138
20. ENTEROCOCCOS PRESENTES EN OTROS ALIMENTOS FERMENTADOS.....	140
21. ACTIVIDAD DE LOS ENTEROCOCCOS EN ALIMENTOS. DESARROLLO DE SABOR, PROBIÓTICOS Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS.....	141
22. PRESENCIA DE <i>LACTOBACILLUS PENTOSUS</i> EN ALIMENTOS.....	142
23. USO BENÉFICO DE <i>LACTOBACILLUS PENTOSUS</i> Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS.....	144
BIBLIOGRAFÍA.....	146

RESUMEN

El queso Cotija se elabora a partir de leche cruda, por lo que inicialmente contiene una determinada carga microbiana. Es madurado durante un tiempo mínimo de 3 meses hasta 2 años. Durante la maduración el desarrollo y actividad de bacterias ácido-lácticas (BAL) promueve el aumento de acidez y la disminución del pH, lo que limita la presencia y desarrollo de bacterias coliformes. Se analizaron tres piezas de queso Cotija, dos piezas elaboradas artesanalmente y una de manufactura semi-industrial. Se evaluó la relación entre estas comunidades microbianas en cinco tiempos durante los primeros tres meses de maduración de cada pieza de queso. Se determinaron el pH, la acidez y la actividad acuosa (a_w), así como la calidad microbiológica general, y se cuantificaron las BAL en el medio selectivo de Man Rogosa Sharpe (MRS).

Adicionalmente se cuantificaron y aislaron las BAL en los medios selectivos KAA, LM17 y MRS a partir de las muestras con más de 70 días de maduración de las dos piezas de queso Cotija reconocidas como Región de Origen, para posteriormente realizar su identificación taxonómica con el sistema API 50CHL.

Los resultados muestran que al transcurrir 50 días de maduración la población de coliformes disminuye significativamente, debido a la interacción de factores como la disminución del a_w (menos de 0.890), una disminución del pH (de 5.8 a 5.4) y al posible efecto de bacteriocinas y otras sustancias inhibitorias, como resultado del crecimiento y actividad de las BAL.

Pudo detectarse la presencia de BAL, predominando el género *Enterococcus*. Específicamente se identificaron 14 cepas, 11 correspondientes a *Enterococcus faecium* y tres a *Lactobacillus plantarum*.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El queso Cotija es un derivado lácteo que se elabora totalmente de manera artesanal en México, a partir de leche bronca como materia prima. En su elaboración confluyen elementos propios de la región y del medio ambiente que lo hacen un producto con características idóneas para obtener la Denominación de Origen. La falta de una metodología aplicada homogéneamente y regulada para su producción ha generado la introducción de productos comerciales no auténticos, que ponen en peligro la continuidad en la elaboración de este producto tradicional, que además de México tiene a Estados Unidos como un mercado importante.

No se ha reportado previamente que microorganismos participan durante la elaboración y el proceso de maduración del queso, y que contribuye principalmente en la generación de los atributos de aroma y sabor propios. El conocimiento de esta información es relevante ya que la fermentación que tiene lugar en el queso Cotija es producida de manera natural, sin la inoculación inicial de algún cultivo.

Los microorganismos son un componente esencial de todas las variedades naturales de quesos y juegan un papel muy importante durante su elaboración y maduración¹¹. La composición microbiana en los quesos ha sido un tema de investigación frecuente principalmente en países de Europa, con el fin de obtener

mayores conocimientos científicos sobre la gran cantidad de variedades de quesos que se producen en ese continente.

Durante la elaboración y maduración del queso ocurren interacciones complejas entre las distintas poblaciones microbianas presentes. Los factores fisicoquímicos del queso también promueven estas interacciones. La elucidación de las mismas contribuye al conocimiento y entendimiento del proceso de maduración del queso¹¹.

Una de las funciones que desempeña la fermentación de los alimentos, como lo es la elaboración del queso mediante la fermentación de la leche, es lograr su conservación. Los cambios bioquímicos resultantes de la fermentación y la generación de metabolitos influyen en la población de microorganismos patógenos. Esto es muy importante desde el aspecto sanitario para que el alimento sea inocuo al consumirse. Diversas investigaciones demuestran que la presencia de patógenos es inhibida gracias a la actividad de cultivos lácticos^{19,27} en gran cantidad de alimentos, desde alimentos cárnicos²⁷ hasta algunos vegetales como el germinado de alfalfa⁸⁵.

Los coliformes son considerados como indicadores de microorganismos patógenos y pueden estar presentes en productos derivados de la leche cruda. En esta investigación se propone que la actividad de las bacterias ácido lácticas que participan en la maduración del queso contribuyen a mejorar la calidad sanitaria

del producto durante la maduración, por lo que se realizó el análisis microbiológico general para comprobar este comportamiento.

La investigación forma parte de un proyecto general que se lleva a cabo en el departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química. Este trabajo en particular, pretende contribuir a generar información sobre la elaboración del queso Cotija desde el punto de vista microbiológico, para conocer la relación entre la cuenta de las poblaciones microbianas durante la etapa de maduración y para determinar el tipo de bacterias lácticas presentes, al considerarse éstas como uno de los principales grupos de microorganismos que participan en el proceso de elaboración y de maduración.

Se espera que con los datos que este trabajo y otras investigaciones relacionadas aporten desde el aspecto microbiológico, junto con las características fisicoquímicas, sensoriales y las del proceso de elaboración, se contribuya al conocimiento y a resguardar la tradición de este producto nacional. Y con ello, generar la información necesaria para obtener la Denominación de Origen del tradicional queso Cotija, de manera que las comunidades productoras logren alcanzar mayores mercados en el país y el extranjero.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- ☒ Conocer la dinámica de las poblaciones de microorganismos coliformes y bacterias lácticas presentes en dos piezas de queso Cotija elaborado de manera tradicional y una pieza de manufactura semi-industrial, provenientes de las principales zonas productoras entre la Sierra de Jalisco y Michoacán.
- ☒ Identificar las bacterias lácticas aisladas mediante técnicas de microbiología tradicional.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ☒ Determinar la cuenta microbiana presente en tres piezas de queso Cotija analizadas en cinco diferentes tiempos de la etapa de maduración, mediante el análisis microbiológico general.
- ☒ Realizar el análisis fisicoquímico de las tres piezas de queso durante los cinco diferentes tiempos de la etapa de maduración, en términos de: pH, a_w y acidez expresada como porcentaje de ácido láctico.
- ☒ Identificar las bacterias lácticas aisladas a partir de dos piezas de queso Cotija, reconocidas como Región de Origen por ser elaboradas en la región considerada "auténtica" para su producción, mediante técnicas de microbiología tradicional.

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES

La Asociación Regional de Productores de Queso Cotija busca preservar y normalizar su producción y comercialización, para proteger su tradición, evitar la competencia de imitaciones, así como mejorar sus prácticas de manufactura e higiene, con el fin de obtener productos genuinos y de muy buena calidad. Para lograrlo han participado con el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), la asociación Pro Sierra de Jalmich y el Colegio de Michoacán, y así impulsar la elaboración de un proyecto de desarrollo y mejoramiento tecnológico. El 7 de marzo de 2005 se logró obtener la distinción de Marca Colectiva del queso *Cotija Región de Origen*, otorgado por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) bajo los números 867585 y 867586⁸. Este reconocimiento es un gran paso en el proceso de protección oficial, con el que se busca lograr obtener la Denominación de Origen. Se ha publicado también un manual de Reglas de Uso¹, en donde se describen sus particularidades, propiedades y características de elaboración.

3.1 EL QUESO COTIJA

Es un queso que se elabora artesanalmente desde hace aproximadamente unos 400 años, a partir de leche entera y bronca, de ganado cebú o criollo de pastoreo libre. Se produce en los meses de junio a noviembre durante la temporada de lluvias, en la región ubicada entre las laderas de la Sierra de Jalmich, que limita los estados de Jalisco y Michoacán. Las zonas reconocidas como auténticas para la producción de este queso se encuentran en comunidades ubicadas en los

municipios al noreste de Jalisco (Sta. María del Oro y Quitupan) y al noroeste de Michoacán (Cotija de la Paz y Tocumbo), además de algunas rancherías cercanas a los municipios anteriores.^{4,7}

Se sabe que este queso también es producido en algunas zonas de Chiapas y Tabasco, pero el queso presenta diferentes características y su producción no se reconoce como Región de Origen. Además se han elaborado algunas versiones comerciales no auténticas, que compiten con el queso artesanal y ponen en riesgo la tradición realizada en las comunidades productoras originales en la zona de la Sierra de Jalmich (ver Figura 1).



Figura 1. REGIÓN DE ORIGEN DEL QUESO COTIJA EN LA SIERRA DE JALMICH⁴

Como ya se mencionó, el queso se produce artesanalmente, la sal se emplea como único ingrediente además de la leche y el cuajo (de origen natural, no microbiano); aparentemente son la composición del tipo de leche que se emplea y las condiciones de la zona, durante su maduración, las que propician que el producto final posea las propiedades características del queso Cotija genuino.

El queso Cotija es madurado durante un tiempo variable de 3 meses a varios años, y se considera que el producto genuino debe ser madurado al menos 100 días. El producto final presenta una pasta dura, no cocida, prensada, ácida y con un elevado porcentaje de sal, de consistencia firme y friable (desmenuzable). Es un queso seco de forma cilíndrica, de gran tamaño y peso –con dimensiones promedio alrededor de 40 cm de diámetro y 18 cm de altura, entre 20 y 30 kg por pieza. Su sabor y aroma son bastante pronunciados y presenta una costra o “tecata” de color amarillo en la superficie.^{7, 73}

El procedimiento general^{4, 7, 35, 73} (ver Figura 2) para su producción es el siguiente:

- La leche recién ordeñada se mezcla y no se acidifica previamente a la adición de cuajo, se deja reposar a temperatura ambiente hasta que alcance una temperatura óptima para ser cuajada (aproximadamente 34º C).
- La cuajada no es inducida por la adición de algún cultivo en particular, sólo se emplea un cuajo de origen animal (marca comercial Cuamex XXX), se

añaden aproximadamente 10 mL de cuajo por cada 100L de leche, se mezcla rápidamente y se deja cuajar por una hora aproximadamente.

- La cuajada se corta en grumos pequeños con una cuchara o cuchillo esterilizado y se deja reposar hasta su asentamiento, se desuera manualmente o por drenado.
- Se sala con sal de mar (de grano) generalmente proveniente del estado de Colima, y se agrega alrededor de 4 a 6% de sal (sin embargo, la dosificación no es precisa).
- Se amasa y finalmente se le da forma dentro de un molde fajado y cubierto internamente con una manta de fibras de maguey o *ixtle*, se forman piezas de 20 kg aproximadamente.
- Se prensa de 18 a 24 horas y se mantiene fajado, llevándose a cabo diariamente o cada tercer día el desfajado, volteado y limpieza del queso con un trapo limpio, hasta que el suero deja de escurrir, durante aproximadamente 15 días. Al producto en esta etapa se le denomina "oreado".
- El queso se desfaja cuando la consistencia es adecuada, pero se voltea periódicamente durante los primeros tres meses.

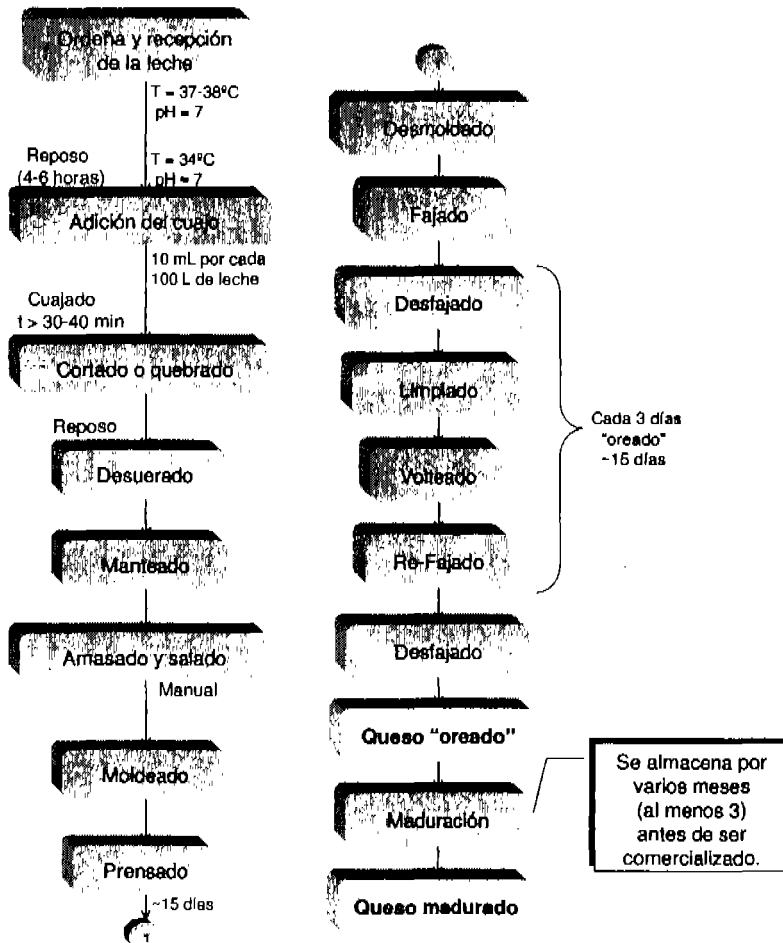


FIG. 2. PROCESO GENERAL DE ELABORACIÓN DEL QUESO COTIJA^{4, 7, 35, 73}

La variedad de quesos a nivel mundial es muy numerosa y en la literatura no es posible encontrar una clasificación exacta a la que pertenezca el queso Cotija. Los quesos pueden clasificarse de acuerdo con su textura, humedad, agente de maduración y método de manufactura⁸⁴. Algunos autores sugieren realizar la

clasificación de los quesos de acuerdo con su composición proximal, donde se considera principalmente la proporción de humedad libre de materia grasa (HSMG)⁷⁷, aunque ésta en ocasiones englobe en una misma categoría a quesos completamente distintos en cuanto a elaboración, tipo de maduración y propiedades finales.

Dentro del grupo de trabajo del laboratorio se realizó el análisis proximal⁴¹ de varias piezas de queso Cotija auténtico, con el fin de conocer mejor su composición y propiedades fisicoquímicas.

Tabla 1. Composición proximal (% promedio) de las muestras analizadas de queso Cotija

Componente	Base Húmeda	Base Seca
Humedad	32 – 40	-
Sólidos totales	60 – 68	-
Proteína total	Mín. 27	Mín. 39
Grasa Butírica	Mín. 24	Mín. 37
Minerales	5.8 – 7.2	8.7 – 11.2
NaCl	2.6 – 4.0	4.7 – 7.4
Carbohidratos*	0.08 – 0.15	0.12 – 0.24
HSMG**	42.1 – 52.6	-

El tiempo de maduración promedio al que se analizaron las muestras fue entre 3 y 6 meses.

* Determinados por el método de Fenol Sulfúrico.

** Humedad sin materia grasa:

$$\text{HSMG} = \frac{\text{Peso de la humedad en el queso}}{\text{Peso total del queso} - \text{peso de la grasa en el queso}} \times 100$$

De acuerdo con el manual publicado de Reglas de Uso para la elaboración del queso Cotija, la composición básica del queso debe ser:

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

Los datos de la Tabla 1 demuestran una correspondencia con los valores definidos por el manual de las Reglas de Uso, por lo que las muestras analizadas en el grupo de trabajo cumplen con estas indicaciones y se comprueba la composición porcentual promedio del queso Cotija Región de Origen.

Si se consideran el contenido porcentual promedio de HSMG y las características de maduración que tiene el queso Cotija, la clasificación que recibiría es de un queso duro o extraduro y madurado, de acuerdo con la información que se reporta en la norma CODEX-STAN-A-006-1978 (Norma General para el Queso), mostrada en la Tabla 2, y de acuerdo a los valores de la Tabla 3, el queso se clasifica como duro o extraduro y semigraso.

Tabla 2. Clasificación del queso según su composición de humedad y tipo de maduración⁶⁹

Según su consistencia: Término 1		Según las principales características de maduración: Término 2
HSMG %	Denominación	
< 51	Extraduro	Madurado
49 – 56	Duro	Madurado por mohos
54 – 69	Firme / Semiduro	No madurado / Fresco
> 67	Blando	En salmuera

Tabla 3. Clasificación de los quesos según su composición⁷⁷

Tipo de queso	Humedad en sustancia libre de grasa (%)	Grasa de la materia seca (%)	Descripción
Extraduro	< 51	> 60	Queso muy graso
Duro	49-55	≥ 45 - < 60	Queso de leche entera
Semigraso	53-63	≥ 25 - < 45	Queso semigrasa
Semiblando	61-68	≥ 10 - < 25	Queso magro
Blando	> 61	> 10	Queso de leche desnatada

Por otro lado los quesos pueden clasificarse también de acuerdo a la textura que presenten, el contenido de humedad, el agente de maduración y el método de elaboración. Siguiendo este esquema de clasificación, el queso Cotija puede considerarse como un queso muy duro madurado por bacterias, como se clasifican el queso Parmesano, el Romano y el Aciago.

3.2 GENERALIDADES DEL QUESO

Un queso se define en general, como un alimento lácteo obtenido por la coagulación enzimática de la leche con la subsecuente separación del suero³⁴. Es un producto fresco o madurado obtenido por drenaje del suero tras la coagulación de la leche⁷⁷.

El proceso de elaboración de un queso se basa en cinco operaciones fundamentales comunes: preparación o estandarización de la leche, adición de microorganismos iniciadores, coagulación, desuerado, salado y maduración³⁴. La adición de cultivos iniciadores o la maduración no se realizan en la producción de

todos los quesos, las variaciones que pueden darse en cada operación, el tipo de leche y los microorganismos involucrados en el proceso son los parámetros que definen y generan la diversidad de los productos finales.

La función principal de las bacterias que participan al inicio del proceso es la producción del ácido láctico, responsable del sabor ácido característico del queso fresco y tiene gran importancia durante la etapa de coagulación de la caseína de la leche, que se debe a la acción de la quimosina y a la acidificación generada.

El salado desempeña múltiples funciones pues controla el crecimiento y la actividad microbiana, debido a que la sal incrementa la presión osmótica en la fase acuosa del alimento, con lo que causa la deshidratación de las células bacterianas, y así las elimina o por lo menos previene su crecimiento³². Reduce la actividad del agua (a_w), controla la velocidad de proteólisis de las caseínas, y regula las modificaciones fisicoquímicas en las proteínas del queso. La sal, además de impartir sabor, impide un crecimiento excesivo de las bacterias iniciadoras y provoca el desacoplamiento de la fermentación de la lactosa¹⁴.

La maduración del queso consiste en el almacenamiento del queso en condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad durante las que se desarrolla la consistencia, el sabor y textura característicos de cada tipo de queso¹⁴. Los microorganismos involucrados en la maduración contribuyen a desarrollar algunos de los compuestos que son responsables del sabor, ya que sintetizan y liberan enzimas proteolíticas y lipolíticas extracelulares importantes

durante el proceso de maduración del queso¹⁴. El grado de maduración está directamente relacionado con el contenido de humedad del queso e inversamente relacionado con el contenido de sal³².

Los principales factores que controlan el crecimiento de microorganismos en el queso son³²:

- a) La **actividad acuosa (a_w)**: que expresa la cantidad de agua disponible para participar en diversas reacciones (relación entre la presión de vapor del agua del alimento (p) y la del agua pura (p_0) a la misma temperatura)²⁹. La mayoría de las bacterias requieren un valor de un a_w alrededor de 0.92 como mínimo para crecer; el límite de la mayoría de las levaduras es cercano a 0.83, aunque las osmófilas llegan a crecer a valores por debajo de 0.6; mientras que los mohos presentan un límite más bajo, alrededor de 0.75. Las bacterias ácido-lácticas (BAL) generalmente crecen a valores mínimos mayores bacterias (entre 0.93 y 0.96) que otras bacterias (entre 0.95 y 0.99)^{13, 29, 32}.
- b) La **concentración de sal**: que como se mencionó anteriormente, tiene un mayor efecto inhibitorio provocado probablemente por la reducción en el a_w , que ocurre cuando la sal se disuelve en el agua del alimento.³²
- c) El **potencial de óxido-reducción (E_h)**: que indica la capacidad de un sistema químico o bioquímico para oxidarse (perder electrones) o reducirse (ganar electrones); un valor positivo indica un estado oxidado mientras que un valor negativo indica un estado reducido³². Puede ser utilizado para

especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células sin recurrir al oxígeno molecular¹⁰⁰. Los microorganismos aerobios necesitan valores redox positivos (300 mV) para crecer mientras que los anaerobios frecuentemente requieren valores redox negativos (-400 mV)^{13, 27, 100}.

d) El **pH**, o potencial de hidrógeno: que representa la concentración de iones de hidrógeno. El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante su procesado, almacenaje y distribución. Como el efecto de algunos otros factores depende en parte del pH, es a veces difícil separar el efecto del pH por sí mismo y el de otros factores influidos por él. Así por ejemplo, los microorganismos se ven afectados por el nivel de iones H^+ libres (el pH por sí mismo)²⁰. Se ha comprobado que, aunque la adición de ácidos fuertes tiene un efecto más intenso en el pH, al mismo pH son menos inhibidores que los ácidos débiles¹. La inhibición microbiana de los ácidos débiles es consecuencia no sólo de la creación de una elevada concentración de protones extracelulares, sino también de la concentración de ácido no disociado¹, la cual a su vez depende del pH²⁰. Algunos ácidos débiles (ácido acético o láctico, por ejemplo) se metabolizan dentro de la célula bacteriana, y liberan iones H^+ , que acidifican el interior de la célula hasta alcanzar niveles inhibitorios²⁰, en ciertos casos. Algunos microorganismos han evolucionado para crecer mejor a bajos o a altos valores de pH⁴⁹, de modo que los cambios en éste afectan de diferente manera a cada microorganismo. Los valores

bajos de pH pueden ayudar en la conservación de los alimentos de dos maneras: directamente, al inhibir el crecimiento microbiano, e indirectamente, a base de disminuir la resistencia al calor de los microorganismos, en los alimentos que vayan a ser tratados térmicamente¹⁰¹.

- e) la **temperatura de maduración**: determinada por dos necesidades opuestas –la necesidad de controlar la descomposición potencial del queso y el crecimiento de microorganismos patógenos, así como la necesidad de promover las reacciones de maduración y el crecimiento de la microbiota benéfica. Temperaturas altas promueven una maduración rápida pero también permiten la aceleración de la descomposición y el crecimiento de patógenos.³²

Durante la maduración se generan cambios bioquímicos primarios que consisten en fenómenos de glicólisis, proteólisis y lipólisis¹⁴, que si se controlan adecuadamente resultan en la producción de los sabores y texturas característicos y deseados para cada variedad de queso³². Estos cambios se deben a numerosas reacciones metabólicas entre las que están la desaminación, transaminación, descarboxilación, desulfuración, la L-oxidación y la esterificación (Figura 3).

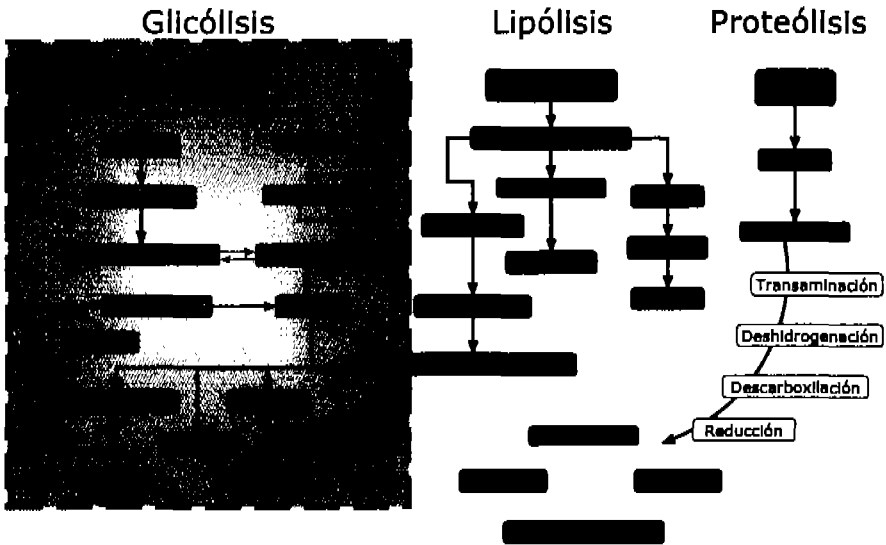


Figura 3. RUTAS BIOQUÍMICAS DURANTE LA MADURACIÓN DE UN QUESO⁵⁸
 Sombreados en naranja se muestran los compuestos que imparten sabor y olor.

Los agentes involucrados en la maduración del queso son enzimas derivadas del cuajo, enzimas propias de la leche y las enzimas provenientes de los cultivos iniciadores y secundarios o NSLAB (bacterias ácido lácticas no iniciadoras, siglas en inglés: Non Starter Lactic Acid Bacteria). El cultivo iniciador láctico alcanza su máximo crecimiento en las primeras semanas; las células dejan de crecer y lentamente son autolisadas por sus propias enzimas hidrolíticas, y los productos de tales reacciones son empleados por las NSLAB.¹⁴

3.3 BACTERIAS LÁCTICAS. SU IMPORTANCIA Y FUNCIÓN EN LOS ALIMENTOS

3.3.1 Generalidades

Las bacterias lácticas son los principales microorganismos que participan en la elaboración del queso¹⁴. En general se describen como bacterias Gram positivas, no móviles, no esporuladas, no pigmentadas, catalasa, reductasa y oxidasa negativas y no reducen nitratos, pueden ser cocos o bacilos y se caracterizan por producir ácido láctico^{32, 69}. Son anaerobias pero aerotolerantes y requieren de numerosos factores de crecimiento^{32, 34, 69}.

Se clasifican actualmente⁶⁹ en los géneros *Aerococcus*, *Alloicococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*; el género *Bifidobacterium* se ha considerado como una bacteria ácido láctica y comparte algunas de las características típicas, sin embargo no está relacionado filogenéticamente.

3.3.2 Actividad de las BAL

El metabolismo de azúcares de las BAL se lleva a cabo por dos vías diferentes y las divide en dos grupos: homolácticas y heterolácticas. La Glucólisis (Vía de Embden-Meyerhof) resulta casi exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final bajo condiciones estándares y es nombrada como fermentación homoláctica. La ruta de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa resulta en

cantidades significativas de otros productos finales como etanol, ácido acético y CO₂ además de ácido láctico y se denomina fermentación heteroláctica.^{32, 34, 69, 84}

Pueden producir compuestos aromáticos (carbonilos y alcoholes) importantes para el sabor de los quesos, y algunas producen diacetilo y acetoina a partir de citrato en presencia de azúcares. Poseen proteasas extracelulares y ligadas a la pared celular, que pueden hidrolizar parcialmente la caseína en péptidos asimilables, que son degradados subsecuentemente por peptidasas de la membrana y el citoplasma. Sus enzimas proteolíticas son liberadas al queso por lisis celular, y esto influye directamente en el sabor del queso.^{32, 34}

El aroma, sabor y la textura de los alimentos lácteos fermentados se debe, parcialmente, al crecimiento de las bacterias lácticas, que al metabolizar los carbohidratos generan algunos de los siguientes compuestos que aportan varias características en los quesos³⁴:

- Ácido acético
- Ácido Láctico
- Diacetilo
- Acetaldehído
- Etanol

La actividad de las bacterias lácticas limita y en ocasiones inhibe el crecimiento de otras bacterias, como las patógenas, tanto por efecto de la disminución en el pH como por ciertas sustancias inhibitorias¹ –ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono, bacteriocinas (nisina, pediocina, etc.) y

productos secundarios como hipotiocianato⁶⁹ y sustancias de bajo peso molecular (reuterina y ácido piroglutámico o PCA)-, producidas por algunas especies. El fenómeno de inhibición puede incluir uno o muchos mecanismos de los ya mencionados, incluyendo competencia nutricional. Los efectos inhibidores dependen de la naturaleza de la microbiota, de las cepas contaminantes a inhibir, las proporciones relativas de las bacterias presentes y las condiciones de cultivo¹⁰.

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteínica y poseen actividad antimicrobiana, son eficaces agentes bactericidas contra las bacterias Gram-positivas^{14, 34}. Son producidas por muchas especies bacterianas que han generado un gran interés en su investigación, debido principalmente a las características de antagonismo que han presentado éstos contra microorganismos patógenos presentes en alimentos, a la demanda de los consumidores por la producción de alimentos menos procesados, y a la bio-conservación, es decir, el uso de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos, para mejorar la seguridad y calidad de los alimentos que generalmente no son fermentados⁶¹.

El crecimiento y actividad de las bacterias ácido-lácticas a menudo se ven estimulados por la creación de condiciones selectivas (valores bajos de E_h , a_w , pH, temperatura; bajo contenido de azúcares y altas concentraciones de sal) que retardan el crecimiento y actividad de muchos organismos alterantes, por lo que aumentan la estabilidad del alimento¹⁴.

La relevancia de estas bacterias se reconoce desde que se sabe de su participación en la acidificación de los alimentos. De modo que ha sido necesario incrementar el conocimiento sobre su metabolismo e utilización de nutrientes a manera de lograr un mayor control de los procesos que las involucran.

Los procesos tecnológicos han progresado y han hecho mayor la mecanización, incrementado el tamaño de la producción y disminuido los tiempos de proceso. Todas estas acciones en la industria láctea se reflejan en una enorme demanda de cultivos iniciadores, además de un mayor conocimiento en la actividad, estabilidad, calidad y resistencia de las BAL. La importancia biotecnológica de estos microorganismos es muy amplia y está estrechamente ligada a su actividad⁶⁹:

- Producción de acidez
- Actividad proteolítica (proteinasas, peptidasas)
- Aportan sabor y aromas
- Formación de exopolisacáridos
- Producción de componentes inhibidores
- Efecto probiótico

Y su aplicación se emplea no sólo en la industria láctea, también en la transformación de los productos vegetales y cárnicos.

3.3.3 BAL reportadas en alimentos artesanales

Se sabe que las BAL, en particular los lactobacilos, juegan un papel importante en los procesos de preservación y fermentación de la carne. Su habilidad para disminuir el pH y producir bacteriocinas previene el crecimiento de patógenos y la descomposición por microorganismos, mejorando la calidad higiénica y la conservación de productos cárnicos. Además contribuyen al color y textura, desarrollados principalmente mediante su capacidad acidificante.³⁰

Al estudiar la microbiota participante en la fermentación artesanal de salchichas deshidratadas producidas en Argentina se observó que la población microbiana de BAL durante la fermentación estaba dominada por *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum* y *L. curvatus* (55%, 40% y 5%, respectivamente).se identificó además la presencia de *Staphylococcus saprophyticus*, representando a la especie dominante de micrococos, además de *S. sciuri*, *S. equorum*, *S. epidermidis*, y *S. pulvereri* También se encontró la presencia de *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* y *P. acidilactici*.³⁰

La leche fermentada tradicional de la comunidad Maasal en Kenia es el "kule naoto" y de este producto se aislaron cepas de BAL para ser caracterizadas fenotípicamente por su capacidad de fermentar distintos carbohidratos junto con otras pruebas bioquímicas. La microflora predominante en las muestras estudiadas perteneció al género *Lactobacillus*, seguidos por *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.⁵¹

En un estudio realizado por Madrau, Mangia et. al.⁵⁰ se llevó a cabo el aislamiento e identificación de las BAL en leche de oveja cruda y en el tradicional queso Pecorino Sardo, y encontraron que la microbiota se componía de diferentes especies: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus thermophilus* y *Enterococcus* spp.

Al estudiar la población bacteriana natural empleada en la producción del queso Toma piemontese (un queso protegido por la denominación de origen, producido en Piedmont, al norte de Italia), con el fin de obtener información acerca de las BAL involucradas en la fermentación tradicional de este queso³¹, se analizaron muestras de la cuajada y de los quesos. Se encontraron un total de 116 cepas de cocos y 11 lactobacilos. Se identificaron molecularmente y se observó que un 67% de los cocos aislados correspondían a cepas de *Lactococcus lactis* y *Lactococcus garvieae*, por otro lado se aislaron también enterococos, principalmente de las muestras de queso (y constituyeron un 16% de los cocos aislados), junto con cepas de *Streptococcus macedonicus* y *S. thermophilus*, éste último en una cantidad menor. Los lactobacilos (principalmente *L. paracasei*) se detectaron en pocas muestras y su incidencia fue muy baja.³¹

En un reporte sobre la diversidad bacteriana presente en un tradicional queso blanco y suave de Marruecos, producido en ocho diferentes regiones de este país, se encontró que la mayoría de las cepas aisladas pertenecieron a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*.⁶⁴

El queso artesanal Pecorino Siciliano se estudió para conocer la diversidad bacteriana y su dinámica; al identificar a las cepas aisladas se encontró la presencia de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* y *Leuconostoc mesenteroides*.⁶⁶

El queso Tetilla es elaborado con leche de vaca cruda y se produce en Galicia, al noroeste de España. Se realizó la identificación de los principales grupos microbianos de interés tecnológico y fueron caracterizados, encontrando un 39.8% de *Enterococcus*, 19% de *Lactococcus*, 12.3% de *Lactobacillus*, 8% de *Micrococcus* y 7.6% de *Leuconostoc*.⁶⁹

3.4 MICROORGANISMOS COLIFORMES

El grupo coliforme agrupa a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas: ser aerobias o anaerobias facultativas; ser bacilos Gram negativos; ser oxidasa negativos; no ser esporógenas; fermentar la lactosa a 35 °C en 48 horas, produciendo ácido láctico y gas. Hay cuatro géneros que representan a la familia de las enterobacterias: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*.⁴²

Las bacterias de este grupo se encuentran principalmente en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, pero también ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en suelos, semillas y productos vegetales.⁴²

Los coliformes se introducen en gran número al medio ambiente por las heces de humanos y animales. Por tal motivo suele deducirse que la mayoría de los coliformes que se encuentran en el ambiente son de origen fecal. Sin embargo, existen muchos coliformes de vida libre.¹³

Estos microorganismos pueden llegar a la leche por la contaminación tanto por los pelos y otras impurezas procedentes de la piel del animal durante la ordeña¹³, como por el aire, polvo o agua³⁴. El estiércol es la principal fuente de enterobacterias que contaminan la leche, sin embargo, su presencia no se debe obligatoriamente a una contaminación fecal¹³. Su desarrollo dependerá de los siguientes factores^{13,34}:

- Cuentas totales de microorganismos presentes en la leche.
- Condiciones de almacenamiento de la leche, previas a la producción de queso.
- Intensidad de la pasteurización (de llevarse a cabo).
- Niveles de recontaminación por equipos, personal, etc.
- Actividad de las bacterias lácticas: rapidez en la reducción del pH, pH y cantidad de ácido láctico finales, capacidad de producir sustancias inhibitorias; por ejemplo: ácido fórmico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y antibióticos.
- Las temperaturas de procesamiento, maduración y almacenamiento del queso.³⁴

En muchos casos la determinación de coliformes se ha empleado porque se les considera como indicadores de microorganismos patógenos⁴².

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

Como resultado del crecimiento y la actividad de bacterias lácticas durante la etapa de maduración del queso se producen ácido láctico y algunas sustancias inhibitorias que afectan el crecimiento de otros microorganismos. La presencia de coliformes se ve afectada por factores como la acidez y el pH. Por lo que se espera que la cuenta de microorganismos coliformes disminuya conforme transcurre la maduración. Se considera la cuenta de coliformes como un indicador de posibles patógenos presentes en el queso.

Las BAL por identificar podrían ser pertenecientes a los géneros reportados con anterioridad encontrados en otros quesos artesanales elaborados con leche cruda, especialmente de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA

5.1 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

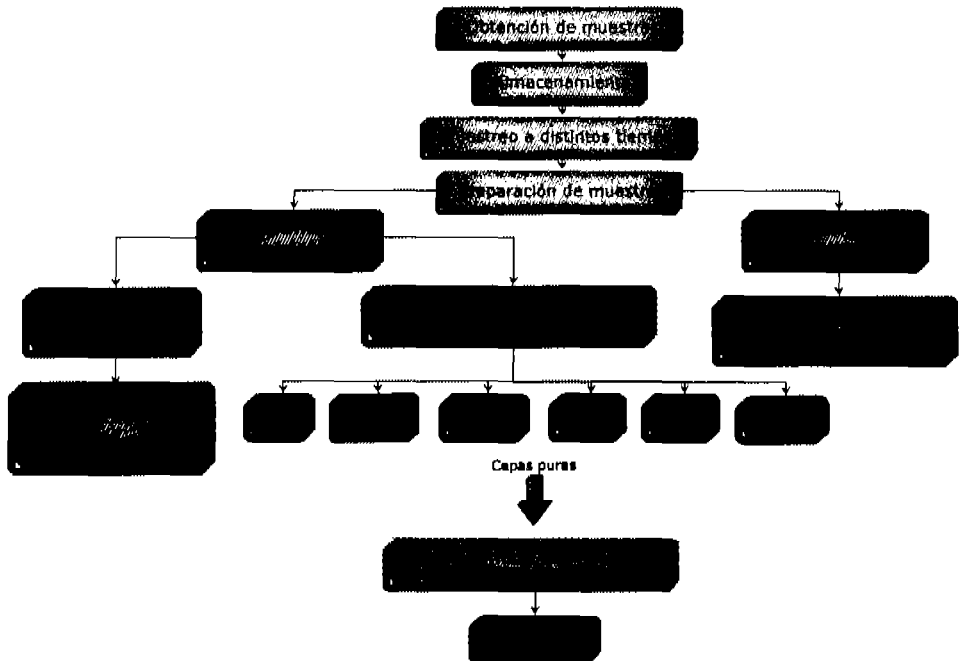


Figura 4. DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Estos análisis se realizaron durante cinco tiempos diferentes de la etapa de maduración del queso, entre las 3 semanas y los 3 meses de su elaboración (ver Tabla 5), con el fin de comparar los resultados de cada periodo y observar la dinámica de las poblaciones microbianas.

5.2 MUESTRAS

Las piezas de queso se compraron en los respectivos lugares de origen (ver Tabla 4) y se trasladaron en una hielera a la Ciudad de México, en donde se

acondicionó un cuarto para que se llevara a cabo la maduración de los quesos. Durante la maduración se realiza el "oreado" del queso, que consiste en limpiarlo y voltearlo, así que se simularon estas condiciones. La toma de cada muestra se hizo con un cuchillo esterilizado, se tomaron porciones representativas (ver Anexo 1), se introdujo en una bolsa estéril con cierre (ziploc) y se almacenó en congelación a una temperatura de -20°C , para ser analizada posteriormente.

Tabla 4. Muestras

Número de Muestra y procedencia del queso	Tipo	Fecha de Elaboración
1) Ranchería "La Tinaja", Michoacán.	Artesanal	28 · julio · 2005
2) Población de Cotija, Michoacán.	Semi-industrial	1 · agosto · 2005
3) Santa María del Oro, Jalisco.	Artesanal	3 · agosto · 2005

Las fechas de muestreo durante la maduración se presentan a continuación, con la correspondiente relación de los días transcurridos desde la elaboración de cada queso.

Tabla 5. Muestreos durante la maduración de los quesos

Tiempo	Fecha de Muestreo	Días de maduración		
		Queso 1	Queso 2	Queso 3
t_0	18-08-05	20	17	15
t_1	05-09-05	38	35	33
t_2	25-09-05	58	55	53
t_3	15-10-05	78	75	73
t_4	07-11-05	101	98	96

Para el aislamiento e identificación de las BAL se emplearon únicamente las muestras al tiempo 3 de los quesos 1 y 2, reconocidas como Región de Origen.

5.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

La experimentación se dividió en dos etapas, inicialmente se estudió la dinámica de las poblaciones microbianas en la que se realizó un análisis microbiológico general y la cuantificación de las BAL en el medio selectivo MRS. En la segunda etapa se realizó el aislamiento de las BAL en distintos medios de cultivo selectivos, para posteriormente lograr su identificación mediante el uso de técnicas de microbiología tradicional.

Durante todas las etapas del análisis microbiológico se trabajó en una campana de flujo laminar vertical, Nivel I de Seguridad [Industrias Adler S.A. de C.V., No. de serie: FLS/S].

5.3.1 Preparación de las Muestras

Técnica empleada: La descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994⁹¹ referente a la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Fundamento: Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra.

El material, reactivos, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica se mencionan a detalle en el Anexo 2.

5.3.2 Dinámica de Poblaciones Microbianas

Las muestras se procesaron como se mencionó anteriormente para analizar su calidad microbiológica en cuanto a la presencia de mesófilos aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras. Con las mismas muestras preparadas se realizó la cuantificación de las bacterias lácticas en el medio de cultivo selectivo de Man Rogosa Sharpe (MRS).

5.3.2.1 Pruebas Microbiológicas Generales

5.3.2.1.1 Determinación de mesófilos aerobios.

Técnica empleada: Método de cuenta en placa, de acuerdo a la descripción de la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994⁸⁹.

Fundamento: La técnica consiste en contar las colonias que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, y se presupone que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores (la variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc.). Dichos factores hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra

realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado⁸⁹.

Informe de la Prueba: Se reportó como: UFC/g, de bacterias mesófilas aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas por 48 horas a 37°C.

El material, reactivos, aparatos e instrumentos utilizados, el procedimiento de la técnica, así como el cálculo y expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 3.

5.3.2.1.2 Determinación de mohos y levaduras.

Técnica empleada: Método para la cuantificación de mohos y levaduras en alimentos, de acuerdo a la descripción de la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994.⁹²

Fundamento: El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico (agar papa – dextrosa), acidificado a un pH de 3.5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1 °C, lo que da como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

El material, reactivos, aparatos e instrumentos utilizados, el procedimiento de la técnica, así como el cálculo y expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 4.

Informe de la Prueba: Se reportó como: UFC/g, de levaduras (o mohos) en placa en agar papa dextrosa acidificado, incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.

5.3.2.1.3 Determinación de coliformes totales

Técnica empleada: Técnica del número más probable para la determinación de coliformes totales, de acuerdo a la descripción de la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994.⁹³

Fundamento: El método se basa en que las bacterias coliformes fermentan la lactosa incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 horas, con la consiguiente producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

El material, reactivos, aparatos e instrumentos utilizados, el procedimiento de la técnica, así como el cálculo y expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 5.

Informe de la Prueba: Se reportó como: NMP/g, de coliformes totales, incubados por 48 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.3.2.2 Cuantificación General de Bacterias Ácido Lácticas

Técnica empleada: De acuerdo a la metodología descrita en "The OXOID Manual"⁷⁹.

Fundamento: El agar MRS es un medio de propósito general para la cuantificación de lactobacilos³². La formulación MRS fue desarrollada por Man J. C., Rogosa M. y Sharpe M. Elizabeth (1969), con el fin de contar con un medio que promoviera un buen crecimiento de las bacterias ácido lácticas, en general. Este medio proporciona un crecimiento más profuso de todas las cepas de lactobacilos, especialmente de aquellas que crecen lenta y difícilmente como algunas cepas de *L. brevis* y *L. fermenti*. Los géneros que pueden desarrollarse son: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Su crecimiento se ve favorecido considerablemente mediante condiciones de microaerofilia. Se puede hacer más selectivo mediante un ajuste en el pH, ya que los lactobacilos tolerarán más bajos niveles de pH que los estreptococos (pH 5.0 - 6.5), y los pediococos y leuconostoc crecen mejor dentro de este rango. Los lactobacilos son microaerófilos y generalmente requieren de una sobrecapa de agar para ser cultivados en condiciones aeróbicas en medio sólido. Las colonias inmersas en el agar y las superficiales pueden ser compactas o irregulares, y son pequeñas, opacas y blancas.^{32, 79}

La técnica consiste en contar las colonias que presenten las características morfológicas correspondientes a las antes mencionadas, que se desarrollan en el medio selectivo MRS después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, se considera que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio^{32, 79}.

El material, reactivos, aparatos e instrumentos utilizados, el procedimiento de la técnica, así como el cálculo y expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 6.

Informe de la Prueba: Se reportó como: UFC/g, de bacterias ácido lácticas en agar MRS, incubadas por 48 horas a $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$; gram positivo, catalasa negativo.

5.3.3 Aislamiento, Cuantificación e Identificación de Bacterias Ácido Lácticas

5.3.3.1 Aislamiento Selectivo y Cuantificación de Bacterias Ácido Lácticas

Se usaron sólo dos de las tres piezas de queso Cotija, por ser ambas consideradas Región de Origen.

Las muestras se procesaron para aislar las bacterias lácticas al utilizar tres medios de cultivo selectivo (MRS, KAA y LM17) bajo 6 distintas condiciones de incubación en total (ver Figura 5).

Técnica empleada: De acuerdo a la metodología descrita para aislar y cuantificar BAL por Randazzo et. al.⁶⁵, también con la información publicada en el "*Fundamentals of cheese science*"⁶² y con las indicaciones del proveedor mencionadas en "*The OXOID Manual*"⁷⁹. Se emplearon los medios selectivos KAA, MRS y LM17 bajo distintas condiciones (Figura 5).

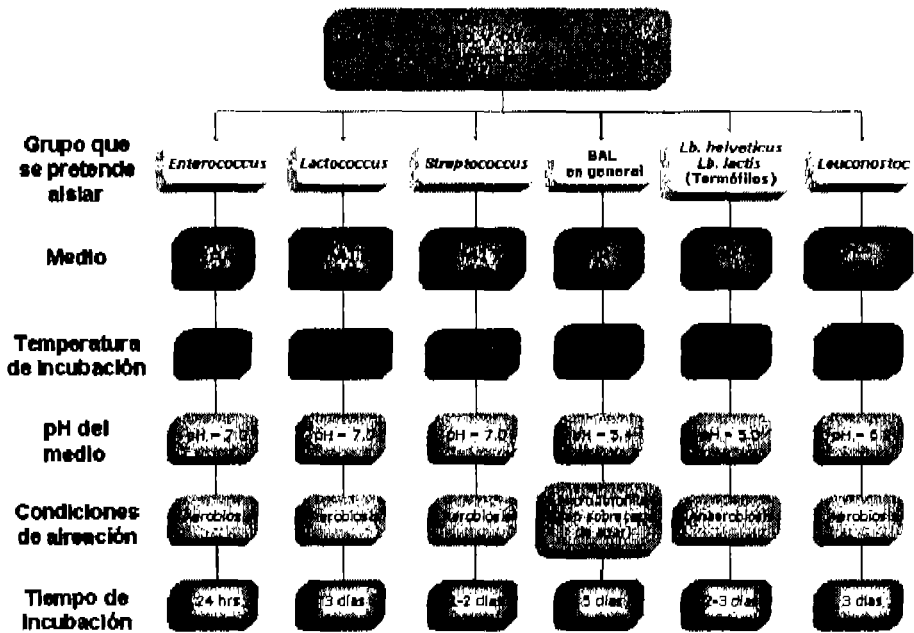


Figura 5. DIAGRAMA DEL AISLAMIENTO SELECTIVO DE BAL

Medios de cultivo para el aislamiento selectivo:

- Agar MRS: su fundamento y composición se mencionaron anteriormente.
- Agar MRS con vancomicina: su fundamento y composición es igual al anterior, pero se adicionó vancomicina [US Biological, Lote L4120813] en una relación de 20 µg por mL de medio, con el objetivo de hacer mayor su selectividad y favorecer el crecimiento de *Leuconostoc*.³²
- Agar MRS a pH 5: su fundamento y composición es igual que para el medio MRS normal, pero se acidificó con una solución de ácido clorhídrico 1N hasta pH 5.0 antes de ser esterilizado.

➤ Agar KAA: (Kanamycin Aesculin Azide). Fundamento: El agar KAA es un medio selectivo cuando se usa un suplemento de kanamicina y se emplea para el aislamiento de *Enterococcus* en alimentos. El sulfato de kanamicina se adiciona por separado al agar reconstituido. El medio contiene los componentes inhibitorios selectivos sulfato de kanamicina y azida de sodio. También contiene un sistema indicador para detectar el crecimiento de estreptococos hidrolizantes de esculina. Estos microorganismos producen áreas negras alrededor de las colonias debido a la formación de compuestos fenólicos de hierro, derivados de los productos de la hidrólisis de esculina y Fe^{2+} . Se consideran enterococos las colonias circulares, blancas o grises con un diámetro de alrededor de 2 mm, rodeadas de zonas negras de al menos 1 cm de diámetro.^{32, 79}

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Triptona	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato sódico	1.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato de amonio férrico	0.5 g
Azida de sodio	0.15 g
Agar	10.0 g
Agua destilada	500 mL
1 vial de suplemento de Kanamicina SR92 [Oxoid Lote 373788]	0.01g

➤ Agar LM17: Se recomienda su uso para favorecer el crecimiento y cuantificación de *Streptococcus* lácticos y sus bacteriófagos. *Fundamento:* los estreptococos lácticos son problemáticos nutricionalmente y requieren medios complejos para su óptimo crecimiento. Su naturaleza homofermentativa productora de acidez requiere que el medio esté bien amortiguado para que el pH del cultivo se mantenga por arriba de 5.7 durante el crecimiento activo. Esta estabilidad en el pH es importante porque un pH menor puede ocasionar daño y reducir la recuperación de los estreptococos lácticos. El agar LM17 contiene glicerofosfato disódico, el cual tiene suficiente capacidad amortiguadora para mantener el pH arriba de 5.7 en los cultivos en crecimiento activo, incluso después de 24 horas a 30 °C.⁷⁹

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Triptona	5.0 g
Peptona de Soya	5.0 g
Digerido de carne	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Ácido ascórbico	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.25 g
Glicerofosfato disódico	19.0 g
Agar	11.0 g
Agua destilada	950 mL
Solución estéril de lactosa al 1%	50 mL

Condiciones de aireación:

➤ **Aerobiosis:** Consiste en usar el oxígeno para oxidación del sustrato (por ejemplo azúcares para obtener energía). Se colocaron las cajas inoculadas y tapadas en posición invertida dentro de la incubadora.

➤ **Microaerofilia:** Ésta hace referencia a las condiciones de baja y estricta concentración de oxígeno que requieren determinados organismos para su desarrollo

Se la utiliza para el cultivo de bacterias que requieren de bajas concentraciones de oxígeno para su desarrollo. Se vertió una capa de unos 2 o 3 mm de agar, a una temperatura aproximada de 38 a 40°C aún fundido, sobre las cajas inoculadas para generar las condiciones de microaerofilia.

➤ **Anaerobiosis:** Los organismos anaerobios utilizan la respiración anaerobia, más comúnmente llamada fermentación, para obtener energía química. Un organismo anaerobio facultativo es el que crece tanto en presencia como en ausencia de oxígeno; pueden ser *aerotolerantes*: aunque pueden crecer en presencia de oxígeno, no pueden utilizarlo, sino que obtienen energía exclusivamente por fermentación; y *anaerobios facultativos*: pueden obtener energía tanto por respiración (en presencia de oxígeno), como por fermentación (en ausencia de oxígeno). Se colocaron las cajas inoculadas tapadas dentro de una jarra de anaerobiosis y luego se introdujeron a la incubadora.

El material, aparatos e instrumentos utilizados, el procedimiento de la técnica, así como el cálculo y expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 7.

Informe de la Prueba: Se reportó como: UFC/g, de bacterias ácido – lácticas en cada uno de los agares bajo las distintas condiciones.

5.3.3.2 Selección y Purificación de Cepas

Ya cuantificadas las BAL aisladas en los distintos medios de cultivo selectivo se procedió a su selección y purificación por medio de resiembras en los agares correspondientes.

El material, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica se mencionan a detalle en el Anexo 8.

5.3.3.3 Conservación de Cepas Seleccionadas en Perlas de Vidrio Perforadas (Chaquiras)

Una vez comprobada la pureza de las cepas aisladas se procesaron para lograr su conservación en chaquiras.

Técnica empleada: Se adaptó la metodología descrita por R. K. A. Feltham, et. al.²⁸ y D. Jones et. al.⁴³ como se explica en el Anexo 9.

Fundamento: El método se basa en el uso de un crioprotector para mantener en congelación una suspensión de bacterias en chaquiras dentro de un vial. La

técnica permite remover chaquiras individuales sin tener que descongelar toda la muestra. La recuperación del cultivo es rápida.

El material, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica se mencionan a detalle en el Anexo 9.

5.3.3.4 Identificación Bioquímica de las Bacterias Ácido Lácticas Seleccionadas

Para realizar la identificación bioquímica de las BAL se seleccionaron 14 de las cepas ya conservadas en chaquiras, 7 de las cuales ya habían sido secuenciadas como parte de otra investigación⁸⁷ en el grupo de trabajo. (Anexo 18)

La selección de las 7 no secuenciadas se basó en las características morfológicas observadas tanto en el agar como al microscopio, además de presentar una prueba de catalasa negativa y tinción Gram positiva. En la sección de resultados 6.1.4 se presenta la Tabla 10 en donde se muestran las cepas seleccionadas y sus características.

La selección de las pruebas bioquímicas realizadas, para la identificación de la mayoría de las cepas seleccionadas, se basó en el trabajo publicado por Manero y Blanch⁵², en donde se propone una clave de identificación para enterococcos mediante diversas pruebas bioquímicas. Se realizó entonces el patrón de degradación de carbohidratos y se observó el crecimiento de algunas cepas en agar BHI.

5.3.3.4.1 Patrón de fermentación de carbohidratos

Técnica empleada: Se utilizó el sistema API 50 CH para conocer el patrón de degradación de carbohidratos. Las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor, y los resultados se leyeron a las 24 y 48 horas de incubación a las temperaturas adecuadas para cada cepa. Se utilizó el software de identificación correspondiente para la identificación de algunas de las cepas.

Fundamento: El método está destinado a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos. Se usa el medio de cultivo 50 CHL que se presenta listo para su empleo y permite realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares de la galería API 50 CH, que está compuesta por 50 microtubos con ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. Se pone en suspensión el microorganismo a estudiar en el medio y después se inocular en cada microtubo de la galería, con lo que se rehidratan los substratos, pertenecientes a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos llevado a cabo en anaerobiosis produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. El primer tubo sin principio activo, sirve como testigo negativo. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda del programa informático de identificación APILAB Plus V.3.3.

El material, reactivos, medios de cultivo, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica y la expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 10.

Informe de la Prueba: Para el caso de las cepas con apariencia de bacilos el resultado del sistema informático se reportó como % de identificación con la cepa asignada. Para las cepas con morfología de cocos el resultado de cada prueba individual se informa como positivo o negativo.

5.3.3.4.2 Crecimiento en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI)

Técnica empleada: Se realizó el crecimiento en agar BHI de las cepas que presentaban la morfología de cocos al microscopio y además habían crecido previamente en agar KAA con la formación de halos negros alrededor de las colonias de color gris.

Fundamento: El empleo de agar BHI en esta prueba es para diferenciar entre las cepas que presenten colonias con pigmentación amarilla de las cepas que no lo hagan⁵². El agar BHI es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer. El agar es el agente solidificante. El agar cerebro corazón mantiene los mismos principios que el caldo para el cultivo de estreptococos y otras bacterias exigentes.^{79, 99}

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Infusión de cerebro de becerro	12.5 g
Infusión de corazón de ternera	5.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Glucosa	2.0 g
Fosfato disódico	2.5 g
Agar	10.0 g
Agua destilada	1000 mL

El material, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica y la expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 11.

Informe de la Prueba: Se reportó como cepa pigmento amarillo positivo o pigmento amarillo negativo en agar BHI incubada durante 24 horas a la temperatura correspondiente.

5.4 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Se prepararon las muestras para analizar algunas de sus propiedades fisicoquímicas: pH, a_w y acidez expresada como porcentaje de ácido láctico.

5.4.1 Preparación de las Muestras

Para realizar el análisis fisicoquímico se tomaron porciones de cada una de las muestras y se acondicionaron a la temperatura ambiente. Se fraccionaron las muestras con el fin de homogenizarlas con ayuda de una espátula y un cuchillo.

5.4.2 Determinación de la Actividad Acuosa (a_w)

Técnica empleada: Se usó un higrómetro electrónico.

Fundamento: El método se basa en determinar la actividad acuosa de las muestras, al realizar la lectura durante distintos intervalos. El higrómetro trabaja con un programa que evalúa la desviación estándar correspondiente a las tres últimas lecturas de la muestra. Una vez que la desviación estándar de las últimas tres lecturas de a_w de la muestra es menor a 0.005, se considera constante el valor y se muestra en la pantalla.

El material, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica y la expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 12.

Informe de la Prueba: Se reportó como el valor de a_w calculado por el higrómetro correspondiente para cada muestra.

5.4.3 Determinación del pH

Técnica empleada: Metodología desarrollada con anterioridad en el laboratorio 312^{35, 40}, para adecuar el método electrométrico propuesto en la norma mexicana NMX-F-099-1970⁹⁶ a las características de las muestras.

El material, reactivos, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica y la expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 13.

Informe de la Prueba: Se reportó como el valor de pH correspondiente para cada muestra, mostrado en el potenciómetro.

5.4.4 Determinación de la Acidez como Porcentaje de Ácido Láctico

Técnica empleada: Metodología desarrollada con anterioridad por Verónica García y Nayeli Hernández en el laboratorio 312^{35, 40}, para adecuar la técnica correspondiente descrita en la norma mexicana NMX-F-206-1986⁹⁷ a las características de las muestras.

El material, reactivos, aparatos e instrumentos utilizados, así como el procedimiento de la técnica y la expresión de los resultados se mencionan a detalle en el Anexo 14.

Informe de la Prueba: Se reportó como el porcentaje de ácido láctico (en Base húmeda) correspondiente para cada muestra.

La acidez no se expresó en términos de base seca debido a que la humedad no se determinó en este estudio.

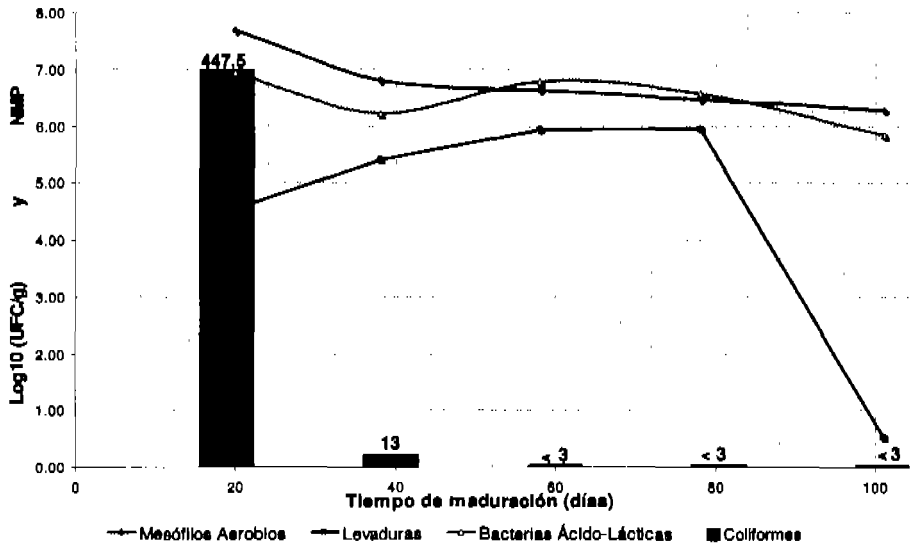
CAPÍTULO 6. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados de la siguiente manera. En la primera etapa del estudio la dinámica de poblaciones microbianas y el análisis fisicoquímico en el transcurso de la maduración durante aproximadamente 100 días. En la segunda etapa del estudio el aislamiento selectivo, la cuantificación y la identificación de las BAL al tiempo 3 (alrededor de 75 días de maduración).

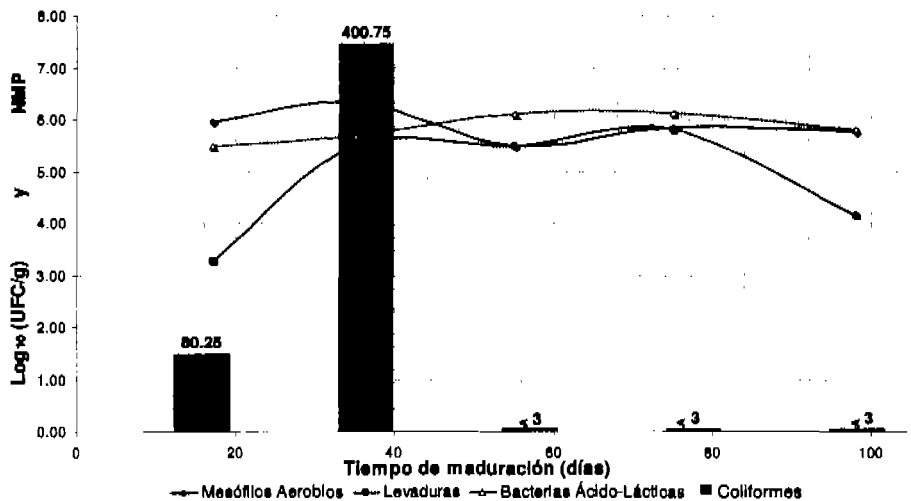
6.1 PRIMERA ETAPA

6.1.1 Dinámica de Poblaciones Microbianas: Análisis microbiológico general y cuantificación de BAL.

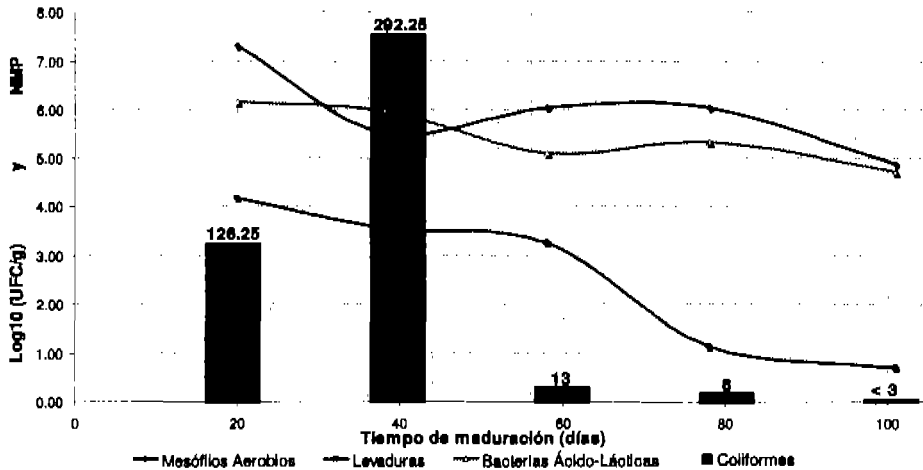
En las Gráficas 1, 2 y 3 se presenta la dinámica de poblaciones observada a través del análisis microbiológico general de las tres piezas de queso analizadas. En el Anexo 15 se presentan las tablas de datos en donde se muestran las cuentas microbianas obtenidas tanto para el análisis microbiológico general, como para la cuantificación general de las BAL.



Gráfica 1. Resultados microbiológicos para el queso 1. Las cuentas de BAL, Mesófilos Aerobios y Levaduras (Log_{10} UFC/g_{queso}); la cuenta de Coliformes (Número Más Probable/g), su valor se indica arriba de cada barra correspondiente. (\pm desviación estándar).



Gráfica 2. Resultados microbiológicos para el queso 2. Las cuentas de BAL, Mesófilos Aerobios y Levaduras (Log_{10} UFC/g_{queso}); la cuenta de Coliformes (Número Más Probable/g), su valor se indica arriba de cada barra correspondiente. (\pm desviación estándar).



Gráfica 3. Resultados microbiológicos para el queso 3. Las cuentas de BAL, Mesófilos Aerobios y Levaduras (Log_{10} UFC/ g_{Queso}); la cuenta de Coliformes (Número Más Probable/g), su valor se indica arriba de cada barra correspondiente. (\pm desviación estándar).

El recuento de bacterias aerobias mesófilas es el utilizado con mayor frecuencia para indicar y valorar la calidad de un producto de consumo. Cuentas altas de estos microorganismos pueden indicar materias primas contaminadas, tratamientos insatisfactorios o una alteración del producto ya muy avanzada. Además, la presencia de un número alto de bacterias mesófilas, que crecen bien a temperatura corporal o próxima, significa que pueden haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos. Por esto, este tipo de recuento suele ser un buen indicador de inocuidad. Al tratarse de un alimento artesanal fermentado, elaborado a partir de leche bronca era probable que la cantidad de mesófilos aerobios fuera muy alta al inicio de su maduración, y esta presencia se observa claramente en las tres gráficas. La numerosa población (que se mantiene en un orden logarítmico promedio de 6.2 durante la maduración

de los tres quesos) muestra correspondencia con la cantidad de BAL, en ocasiones ambas líneas en la gráfica presentan valores similares. Esto podría indicar que prácticamente la mayoría de los mesófilos cuantificados son las bacterias lácticas que participan en la maduración del queso.

Tradicionalmente los coliformes se han considerado como indicadores de contaminación fecal en razón de que, en los medios acuáticos, los coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Asimismo, se ha asumido que su número es proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan, mayor es la gravedad de la carga de heces. Los coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos, de modo que su presencia en los alimentos es recurrente, pero no deseable. En este queso en particular era de esperarse una cuenta inicial considerable, dado que no es sometido a ningún tratamiento térmico durante su proceso, y se esperaba observar su disminución durante la maduración debido a los cambios fisicoquímicos provocados por la actividad de las BAL. Este comportamiento se observa claramente en las tres gráficas, después de 60 días de maduración se logra una disminución mayor al 95% de la población inicial.

En la maduración de algunos quesos ciertas especies de levaduras y mohos juegan un papel muy importante, ya sea en el desarrollo de características y atributos deseables (por ejemplo: *Penicillium roqueforti*, *Pen. Camemberti*, *D. hansenii* y *Kluyveromyces lactis*)^{11, 32}, o como contaminantes indeseables (*Aspergillus niger*)⁷⁷ que ocasionan algunos defectos como el abombado,

formación de gas o pigmentos pardos (principalmente alteración por levaduras², por ejemplo: *Candida spp*, *Y. lipolytica*⁵⁷) o una lipólisis excesiva (por exceso del crecimiento de mohos maduradores⁷⁷). Respecto a la población de levaduras se observa que la cantidad inicial es elevada (mayor a 3 Log₁₀ UFC/g) en los tres casos, pero la cantidad final presente es diferente para la segunda pieza de queso en el último periodo de maduración evaluado. En las piezas 1 y 3 la población disminuye casi totalmente, pero en la pieza 2 la población aumenta una unidad logarítmica comparada con la población inicial.

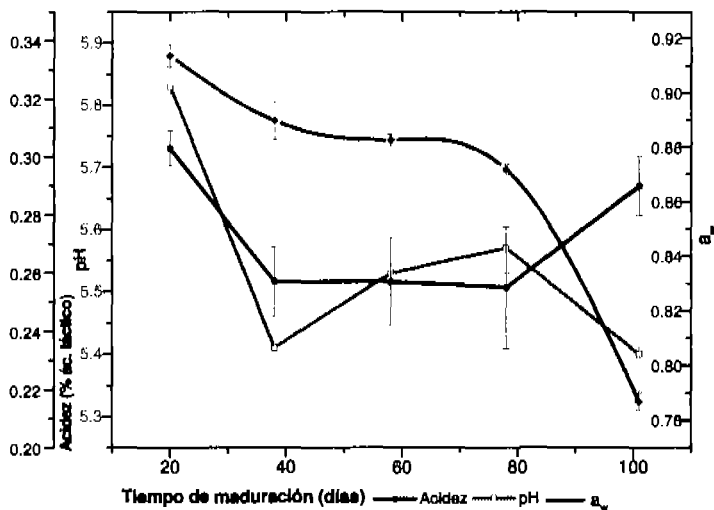
Como se puede observar en la Tabla C (ver Anexo 15), no se encontró la presencia de mohos en las piezas de queso analizadas durante los tiempos de muestreo. Su ausencia puede deberse a que no están presentes en la leche con que se elabora el queso, ya que la leche se fermenta sin la inoculación intencional de cultivos especiales, por lo que se esperaría que en su maduración participe sólo la microbiota de la leche y el ambiente correspondiente. Estos resultados indican que los mohos no participan en la maduración del queso Cotija. Sin embargo, su ausencia de crecimiento en el agar papa – dextrosa también puede deberse a que los mohos que podrían estar en el queso requieren de distintas condiciones para poder desarrollarse (por ejemplo: nutrientes especiales), y no por eso su participación pudiera ser nula en la maduración.

La concentración de BAL en las tres muestras varía continuamente durante el transcurso de la maduración. Este comportamiento podría deberse a que en un inicio el porcentaje de los tipos de BAL es uno y con el tiempo predominan otros. La evolución mostrada en las curvas correspondientes puede explicarse como el

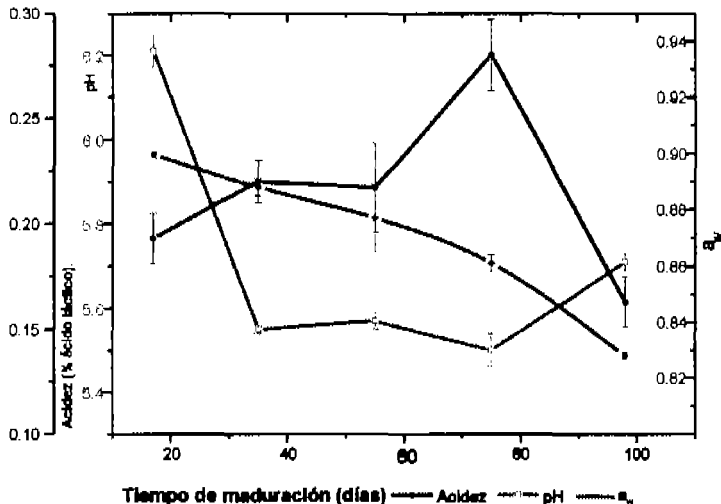
resultado de la variación numérica entre los distintos tipos de bacterias lácticas que pudieran estar presentes, y podrían haber proliferado en mayor cantidad unos que otros, conforme transcurre la maduración. En la literatura se reporta que dentro de las bacterias lácticas que participan en la maduración de distintos quesos, la proporción de estreptococos lácticos y lactobacilos varía de acuerdo al transcurso de la maduración, así como por las condiciones bajo las que ésta se lleva a cabo²⁰.

6.1.2 RESULTADOS FISICOQUÍMICOS

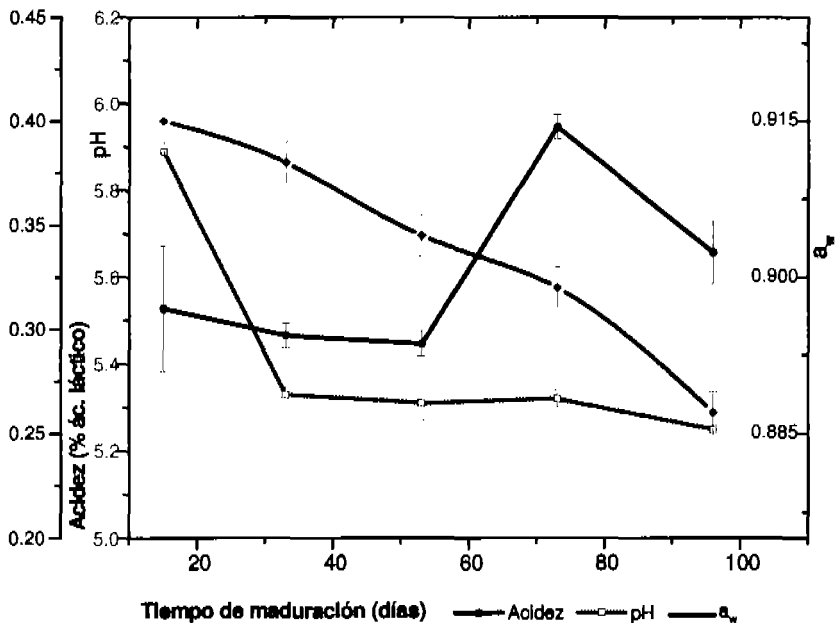
Los valores obtenidos para cada una de las determinaciones se muestran en las Gráficas 4, 5 y 6. En el Anexo 16 se presenta la tabla con sus datos correspondientes.



Gráfica 4. Resultados Fisicoquímicos para el Queso 1. Variación del pH, Acidez (% de ácido láctico y Actividad Acuosa durante la maduración del queso 1 (± desviación estándar).



Gráfica 5. Resultados Fisicoquímicos para el Queso 2. Variación del pH, Acidez (% de ácido láctico y Actividad Acuosa durante la maduración del queso 2 (\pm desviación estándar).



Gráfica 6. Resultados Fisicoquímicos para el Queso 3. Variación del pH, Acidez (% de ácido láctico y Actividad Acuosa durante la maduración del queso 3 (\pm desviación estándar).

6.1.3 COMPARACIÓN DE RESULTADOS FÍSICOQUÍMICOS Y LA CUENTA MICROBIANA

En esta sección se analizarán una a una las piezas de queso analizadas. A continuación se presentan las especificaciones sanitarias mencionadas en las normas para queso:

Tabla 6. Especificaciones sanitarias para quesos frescos, madurados y procesados^{96, 97}.

MICROORGANISMOS	LÍMITE MÁXIMO		
	Frescos	Madurados	Procesados
Coliformes fecales (NMP/g)	100	50	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	1000	100	< 100
Hongos y levaduras (UFC/g)	500	500	40
<i>Salmonella</i> en 25 g	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	Negativo	Negativo	Negativo
Mesófilos aerobios	*	*	1 x 10 ⁵

*No se indica

En general, se observó que durante la maduración en cada pieza de queso se pierde humedad, y el desarrollo y actividad microbiana promueven el aumento de acidez y la disminución del pH, por lo que se limitó el crecimiento de otros microorganismos, como los coliformes, cuya cantidad disminuye más de un 95% con respecto a la cuenta inicial poco después de los 60 días de haber sido elaborado el queso.

6.1.3.1 Queso 1.

Las tendencias de crecimiento para cada población de microorganismos determinada y los resultados fisicoquímicos durante los distintos tiempos de muestreo ya se presentaron en las Gráficas 1 y 4.

Mesófilos aerobios: Se observa una tendencia negativa en el crecimiento de este tipo de microorganismos. La cuenta obtenida durante el primer muestreo – después de 20 días de ser elaborado el queso- es considerablemente alta (4.9×10^7 UFC/g_{queso}) y mayor que los valores obtenidos para los otros dos quesos. La cuenta obtenida en el último muestreo –a los 101 días de su elaboración- es menor a la inicial, sin embargo, se observa que sólo logra disminuir poco más de un orden logarítmico: de 7.69 a 6.27. En las normas disponibles referentes a la calidad microbiológica de los quesos sólo se reportan valores aplicables para quesos procesados (ver Tabla 6), es decir, que su materia prima ha pasado por un proceso previo de pasteurización. Se considerará entonces únicamente como una referencia aproximada el valor presentado en dichas normas, debido a que no existe una que mencione el valor permitido para la cuenta aceptada de mesófilos aerobios presentes en un queso artesanal madurado, elaborado con leche bronca. Así, la cantidad presente en el queso de la ranchería "La Tinaja" tiene, a los 101 días de maduración, una cantidad mayor de mesófilos aerobios a la indicada para un queso procesado en la norma correspondiente NMX-F-092-1970⁹⁵ (mayor a 1×10^5 UFC/g, es decir, 1.27 órdenes lógarítmicos mayor).

Levaduras: En la Gráfica 1 se observa una curva de crecimiento típica. En el muestreo inicial –a los 20 días de elaboración- la cuenta es de 3.5×10^4 UFC/g_{queso} ($4.5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}_{\text{queso}}$) en los siguientes muestreos se aprecia la fase exponencial, en donde la cuenta aumenta poco más de un orden logarítmico, hasta llegar a un punto máximo; entre los 58 y 78 días se observa la fase estacionaria, y finalmente la población disminuye pronunciadamente –fase de mortandad- durante el último muestreo (101 días después de elaborado). La cuenta final: 3.3 UFC/g_{queso} ($0.52 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}_{\text{queso}}$) es realmente mínima y puede considerarse aceptable de acuerdo al valor establecido en la norma anteriormente mencionada. La disminución en la población inicial podría explicarse por el efecto del a_w , que presenta un valor de 0.883 a los 58 días y continúa disminuyendo hasta 0.787 al final de las determinaciones. De acuerdo a lo reportado, el valor límite de a_w para el crecimiento de la mayoría de las levaduras es alrededor de 0.83³².

Bacterias ácido – lácticas: La curva de crecimiento presenta dos puntos en los cuales la cantidad de unidades formadoras de colonias es mayor. Durante el muestreo inicial (8.3×10^6 UFC/g_{queso}) como punto máximo, y a los 58 días (6.2×10^6 UFC/g_{queso}). Finalmente, la cuenta disminuye alrededor de un orden logarítmico, desde la cuenta inicial.

Coliformes totales: La cuenta al inicio es muy elevada, y preocupante desde el punto de vista sanitario. Pero conforme transcurre la maduración del queso, en tan solo 18 días de diferencia entre el primer muestreo y el segundo, la cuenta

disminuye considerablemente de 447.5 a 12.25 NMP/g_{queso}, es decir, disminuye en un 97 %. Durante el último muestreo no se encontró su presencia en las muestras analizadas, entonces, de acuerdo a la norma correspondiente para coliformes en alimentos⁹³ el valor presente es menor a 3 NMP.

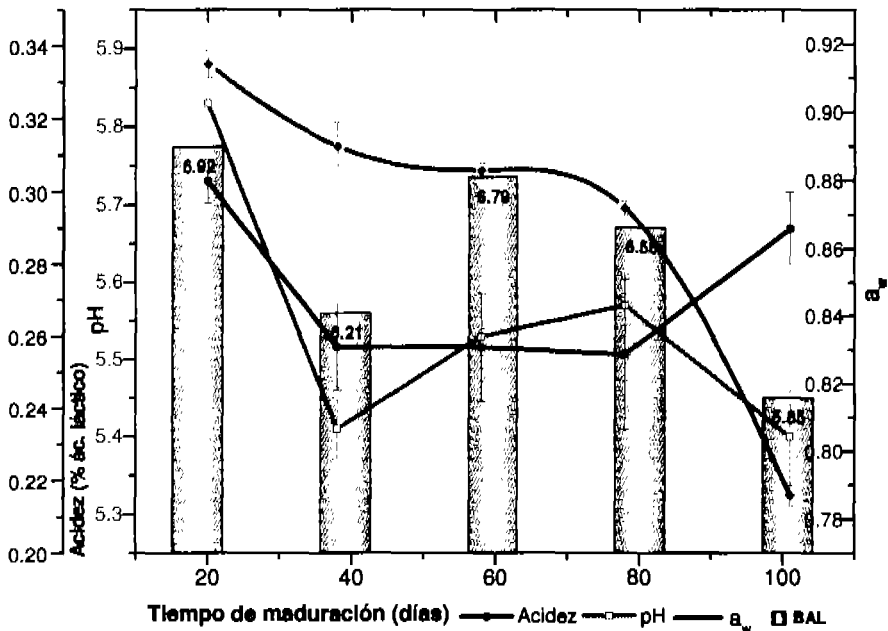
a_w: Este parámetro muestra un claro descenso durante el transcurso de la maduración, especialmente entre los 78 y 101 días, variando de 0.872 a 0.787. El valor inicial fue 0.914 y se debe a que es un alimento con un alto contenido de sal, entre 4.7 y 7.4%⁴¹.

pH: A partir de los 20 días el pH desciende y alcanza un valor mínimo de 5.41 durante el muestreo a los 38 días, sin embargo, a los 58 días aumenta ligeramente, y disminuye a los 101 días con un valor final de 5.4.

Acidez: La acidez determinada inicialmente disminuye a los 38 días de maduración (de 0.303 a 0.257% de ácido láctico) y se mantiene aproximadamente constante hasta los 58 días, pero aumenta al transcurrir 101 días con un valor final de 0.290% de ácido láctico.

Al principio de la maduración no se observa una relación inversamente proporcional entre el comportamiento de la acidez y el pH, generalmente, a mayor acidez es menor el pH, y esto no se observa en la gráfica correspondiente (ver Gráficas 4 y 8). Es hasta el final de las determinaciones, a los 101 días, que se observa una disminución en el pH a la par de un ligero aumento en la acidez.

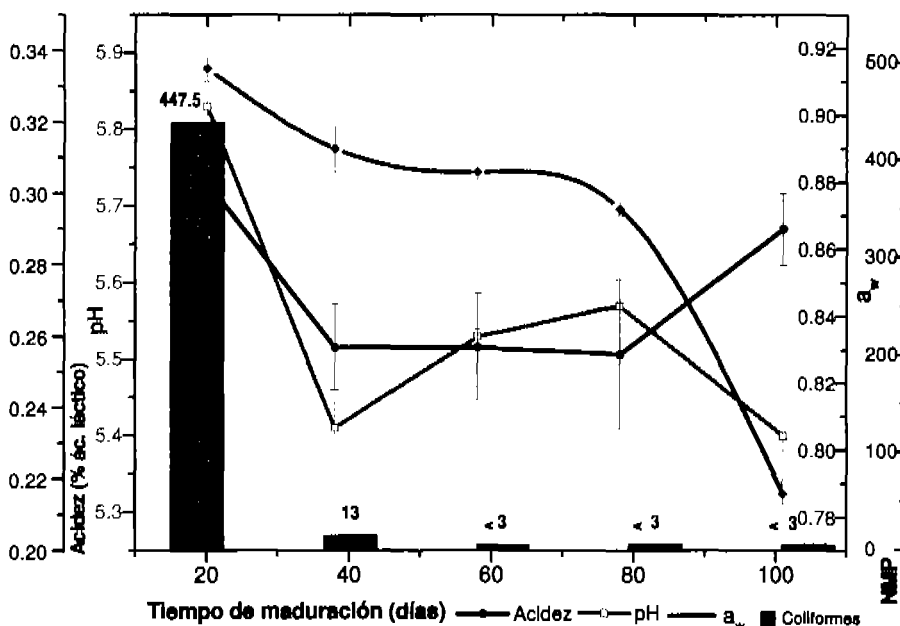
En la Gráfica 7 se puede observar la relación entre los valores fisicoquímicos y la población de BAL, donde aparentemente las BAL varían de forma similar al cambio en el pH, de modo que no coincide una población alta de BAL con una disminución de pH, y que se esperaría al presentarse una producción de ácido láctico por parte de las BAL. Además se observa que al disminuir el a_w la población de BAL disminuye también.



Gráfica 7. Resultados fisicoquímicos para el queso 1, comparados con la cuenta de BAL. El valor de las BAL está expresado en UFC/g y se indica arriba de cada barra correspondiente. Los valores de acidez, potencial de Hidrógeno y actividad acuosa (a_w) se graficaron \pm su desviación estándar.

Al comparar la cuenta de coliformes con los resultados fisicoquímicos (Gráfica 8), se puede observar que a los 38 días de maduración la disminución de pH

coincide con el decremento del 97% de la población inicial de coliformes, comportamiento que confirma la hipótesis. Sin embargo, a los 58 días la presencia de los mismos es casi nula (<3 NMP), pero el pH aumentó y la acidez es baja. Estos resultados fisicoquímicos entre los 58 y 78 días pueden deberse a las reacciones de trans y des-aminación, ocurridos durante la proteólisis, originada por la actividad enzimática, tanto de origen microbiano (hay evidencia de esta actividad en el queso Cotija⁴⁰), como de las enzimas propias de la leche con que se elaboró el queso. Al tiempo en que la disminución de coliformes es evidente, el valor de actividad acuosa correspondiente es de 0.880.



Gráfica 8. Resultados fisicoquímicos para el queso 1, comparados con la cuenta de coliformes. Los coliformes están expresados como el Número más probable y su valor se indica arriba de cada barra correspondiente. Los valores de acidez, potencial de Hidrógeno y actividad acuosa (a_w) se graficaron \pm su desviación estándar.

6.1.3.2 Queso 2

Las curvas de crecimiento de los microorganismos determinados y los resultados físicoquímicos ya se presentaron en las Gráficas 2 y 5.

Mesófilos aerobios: El comportamiento aparente del crecimiento de los mesófilos aerobios en esta muestra es muy variable, ya que al inicio del muestreo –a los 17 días de elaborado- la cantidad presente es ligeramente mayor a la del último muestreo –a los 98 días-, pero las cuentas determinadas en los muestreos correspondientes a los intervalos de tiempo intermedios difieren significativamente entre sí ($\alpha = 0.05$), aumentan ligeramente, disminuyen y aumentan una vez más, para finalmente disminuir. Por otro lado, el incremento mostrado a los 17 días de maduración corresponde con el aumento en la población de coliformes, levaduras y bacterias lácticas. El valor final es 6.0×10^5 UFC/g queso, mayor al valor permitido por la norma mexicana correspondiente para quesos procesados⁹⁴ (1×10^5 , ver Tabla 6), pero el queso Cotlja no puede clasificarse como tal.

Levaduras: En la curva de crecimiento de las levaduras se observa un aumento entre los 17 y 35 días de maduración, una aparente fase estacionaria entre los 35 y 55 días, y un ligero descenso a los 75 días. Sin embargo la cantidad final es elevada, mayor a la presente en las demás muestras y supera el límite máximo permitido en el CODEX⁹⁷ (ver Tabla 6).

Bacterias ácido – lácticas: La cantidad promedio, durante los distintos tiempos de maduración analizados, muestra poca variación.

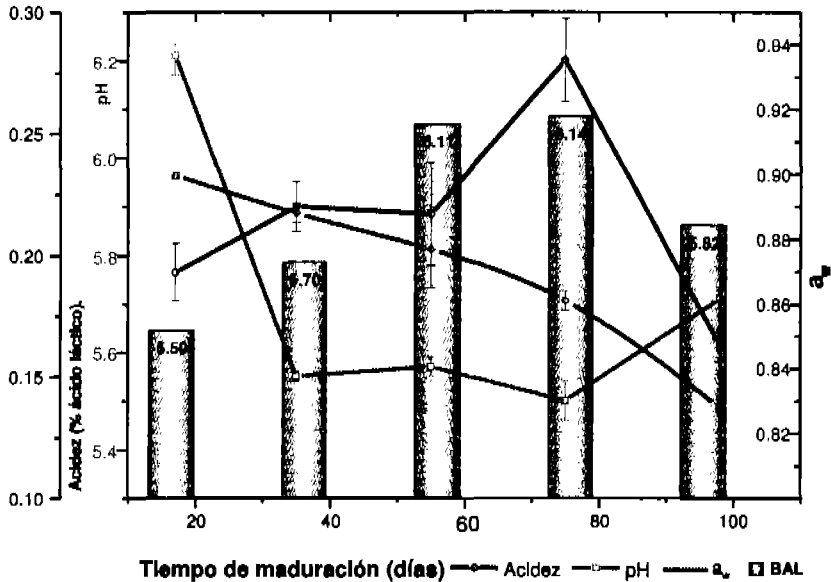
Coliformes totales: A los 35 días de maduración, su comportamiento muestra un aumento considerable en la población, cinco veces mayor que la población inicial; sin embargo, a los 55 días la cuenta disminuye en un 99 %.

a_w : Se observa que la actividad acuosa disminuye al avanzar el tiempo de maduración, aunque de manera menos pronunciada que en el queso 1.

pH: Inicialmente presenta un valor cercano a la neutralidad (6.21), pero al transcurrir 38 días de maduración, y hasta los 78, su valor disminuye y permanece prácticamente constante entre 5.50 y 5.57. Es durante el último muestreo que se observa un aumento en el pH.

Acidez: Aumenta desde el muestreo inicial hasta mostrar un valor máximo correspondiente a los 75 días de la maduración, pero disminuye abruptamente a los 98 días. Durante el último muestreo el pH aumenta a la par que disminuye la acidez, lo que puede estar provocado por los productos generados durante la proteólisis.

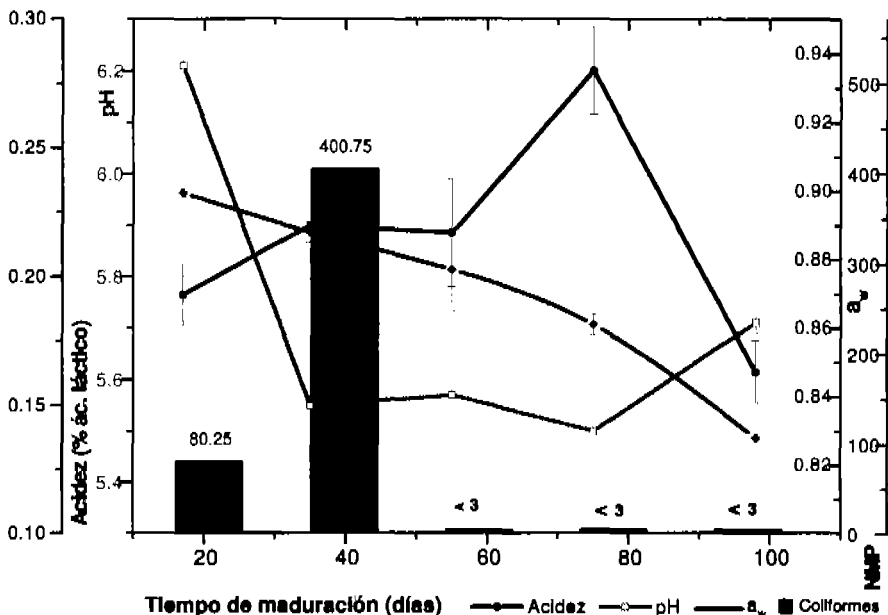
En la Gráfica 9 se observa una concordancia entre la población de BAL y la acidez determinada, al tenerse una población mayor de BAL la acidez es mayor, como un posible resultado de la actividad de las BAL. La actividad acuosa disminuye continuamente y al final se observa que también disminuye la población de BAL.



Gráfica 9. Resultados fisicoquímicos para el queso 2, comparados con la cuenta de BAL. El valor de las BAL está expresado en UFC/g y se indica arriba de cada barra correspondiente. Los valores de acidez, potencial de Hidrógeno y actividad acuosa (a_w) se graficaron \pm su desviación estándar.

Al comparar los resultados fisicoquímicos y la cuenta de coliformes (Gráfica 10), se observa que el aumento en la población de éstos ocurre a la par de la disminución del pH y al aumento de acidez a los 35 días, un comportamiento diferente al observado en el primer queso y aparentemente contrario a lo esperado y planteado en la hipótesis. Al observar la Gráfica 9 podemos ver que además en este punto la población de BAL aumentó, de manera que su actividad podría ser la causa de los cambios fisicoquímicos. A los 55 días el pH se mantiene prácticamente constante (alrededor de 5.5) al igual que la acidez, a pesar de que la población de BAL continúa aumentando, y se observa que la presencia de

coliformes disminuye casi totalmente, a un valor de 0.877 para el a_w . Se cumple entonces el comportamiento esperado y planteado en la hipótesis, y podría decirse que en este caso el comportamiento demuestra que el a_w es más determinante sobre la población microbiana que el pH o la acidez.



Gráfica 10. Resultados fisicoquímicos para el queso 2, comparados con la cuenta de coliformes. Los coliformes están expresados como el Número más probable y su valor se indica arriba de cada barra correspondiente. Los valores de acidez, potencial de Hidrógeno y actividad acuosa (a_w) se graficaron \pm su desviación estándar

6.1.3.3 Queso 3

Mesófilos aerobios: La tendencia de los valores obtenidos para las cuentas en esta pieza inicia considerablemente alta (2.0×10^7 UFC/g queso), y en el mismo orden logarítmico que la pieza 1 (7.69 – queso₁ y 7.3 – queso₃). Posteriormente a

los 33 días la cantidad de mesófilos aerobios disminuye alrededor de dos órdenes logarítmicos (hasta 5.5) y en los siguientes dos tiempos de maduración aumenta ligeramente para finalmente disminuir hasta un valor de 7.4×10^4 UFC/g_{queso}, que es aceptable de acuerdo a la cantidad establecida por las normas^{94, 95}.

Levaduras: La mayor cantidad de levaduras se presentó en el tiempo inicial, durante el transcurso de la maduración se observa un descenso gradual hasta un valor mínimo de 5 UFC/g_{queso} correspondiente a los 96 días de ser elaborado, similar al comportamiento durante los últimos muestreos en el queso 1. El valor final se considera aceptable de acuerdo a la norma⁹⁴.

Bacterias ácido – lácticas: La tendencia en la población es negativa (el orden logarítmico desciende de 6.16 a 4.71); la cuenta inicial es relativamente alta ($\sim 10^6$ UFC/g_{queso}), menor a la cuantificada en la pieza del queso 1 (6.92 Log₁₀UFC/g_{queso}), pero con una población mayor a la encontrada en el queso 2 (5.5 Log₁₀UFC/g_{queso}).

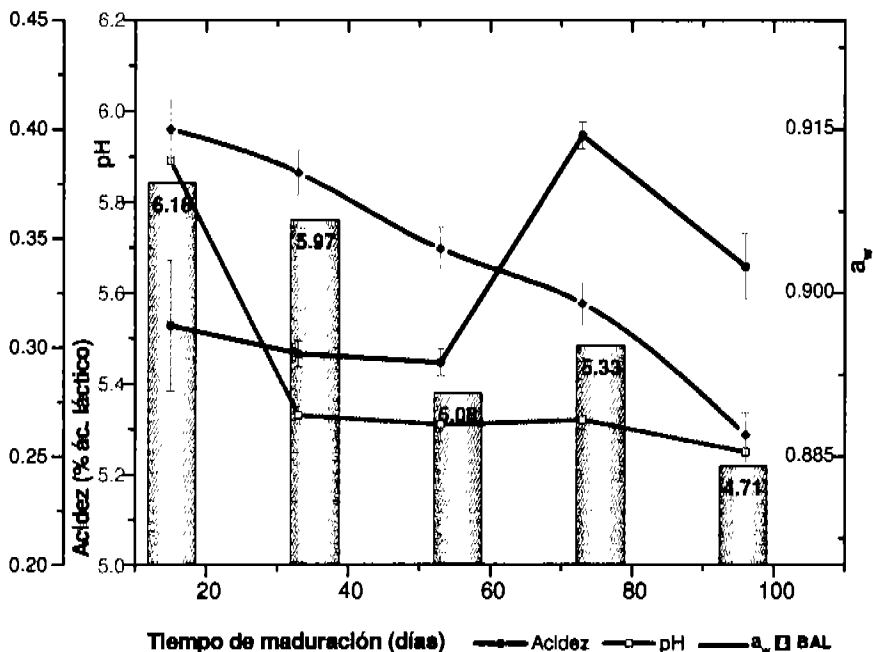
Coliformes totales: El comportamiento mostrado es similar al del queso 2, pero su disminución se observa gradualmente. La cuenta inicial se duplica a los 33 días de maduración, disminuye un 95 % a los 53 días, un 97 % a los 73 días y finalmente, poco más del 99 % a los 96 días, con un valor final menor a 3 NMP/g, correspondiente al valor mínimo cuantificable por el método del Número Más Probable.

a_w : Se observa la disminución gradual de la actividad acuosa, con un valor inicial de 0.915 a 0.887 como valor final.

pH: Se observa un descenso rápido en el pH a los 35 días (de 5.89 a 5.33). Los valores obtenidos durante cada muestreo se encuentran entre 5.25 y 5.89, al parecer no es grande la diferencia, sin embargo se observa una tendencia a disminuir desde el inicio.

Acidez: Inicialmente presenta valores similares, por lo que se puede considerar que permanece constante (entre 0.31 y 0.29% de ác. láctico), posteriormente muestra un aumento entre los 53 y 73 días de maduración. A los 96 días desciende a 0.337% de ácido láctico. De nuevo, este comportamiento en la acidez titulable puede deberse a que hay otras especies químicas (como fosfatos, citratos, carbonatos, etc.⁷⁷) y productos de las reacciones de trans y desaminación, liberados por la proteólisis durante la maduración.

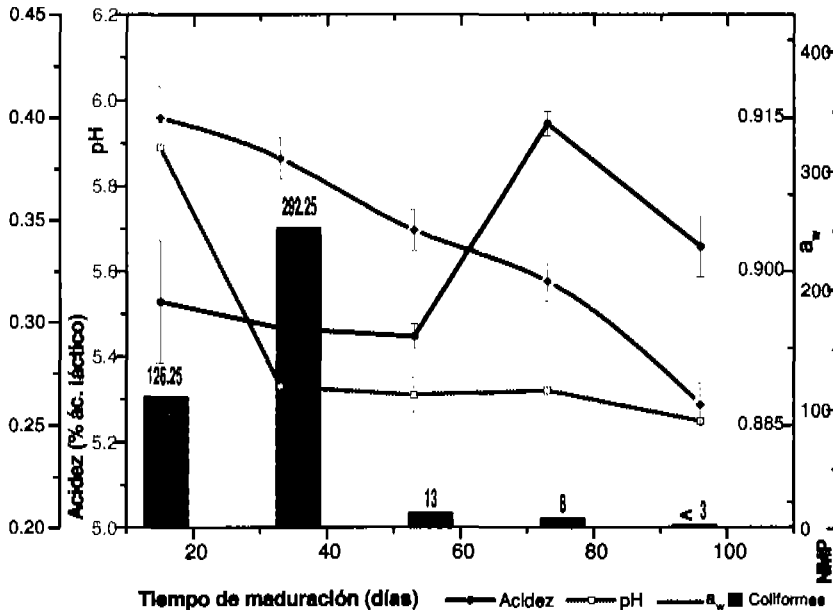
En la Gráfica 11 la disminución en la actividad acuosa en la última determinación coincide con el menor valor en la población de BAL.



Gráfica 11. Resultados fisicoquímicos para el queso 3, comparados con la cuenta de BAL. El valor de las BAL está expresado en UFC/g y se indica arriba de cada barra correspondiente. Los valores de acidez, potencial de Hidrógeno y actividad acuosa (a_w) se graficaron ± su desviación estándar.

Al comparar la población de coliformes con los resultados fisicoquímicos en la Gráfica 12 hay una aparente similitud con los resultados del queso 2: se observa que el aumento de coliformes coincide con la disminución del pH a los 33 días. A los 53 días el pH se mantiene prácticamente constante y los coliformes han disminuido en un 95% (12.25 NMP); es hasta los 96 días que se observa el menor valor de pH (5.31) y corresponde a la presencia casi nula de coliformes. En estas gráficas no es tan evidente el posible efecto de los productos provenientes de la proteólisis sobre la acidez determinada, observado en las otras dos muestras, pero la disminución de la acidez entre los 33 y 53 días puede estar relacionado

con éste fenómeno bioquímico. A los 96 días se presenta un valor de a_w de 0.887, y corresponde al tiempo en que la presencia de coliformes es escasa.



Gráfica 12. Resultados fisicoquímicos para el queso 3 comparados con la cuenta de coliformes. Los coliformes están expresados como el Número más probable y su valor se indica arriba de cada barra correspondiente. Los valores de acidez, potencial de Hidrógeno y actividad acuosa (a_w) se graficaron \pm su desviación estándar.

6.1.3.4 Comportamiento general en las piezas analizadas.

La actividad de las BAL, reflejada como el aumento de acidez y la disminución del pH durante la maduración, no fue tan evidente como se esperaba, sin embargo, sí se observó el efecto de su actividad, tanto en estos parámetros fisicoquímicos como en la posible producción de metabolitos Inhibidores, como podrían ser las bacteriocinas. Se ha comprobado que este tipo de bacterias ejercen una actividad benéfica tanto por la producción de metabolitos que

participan en la generación de sabores y aromas, como por la producción de compuestos con propiedades inhibitorias^{19,27,84}, y se ha estudiado especialmente su utilidad en productos procesados para evitar el desarrollo de patógenos. Estudios posteriores podrían desarrollarse para comprobar si las bacterias lácticas del queso Cotija demuestran esa actividad, así como su utilidad potencial. Hasta esta etapa de estudio puede suponerse que posiblemente el tipo de BAL predominantes durante la maduración del queso Cotija no son productoras de grandes cantidades de ácido láctico, y esto podría ser la causa de los resultados observados.

En las Gráficas 1,2 y 3 se observa que la cuenta de BAL en algunos de los tiempos muestreados aparenta ser mayor a la cuenta de mesófilos aerobios, sin embargo las barras de error para cada punto en la gráfica demuestran que las cuentas pueden encontrarse entre un rango que permite que la cuenta de BAL esté contenida en la cuenta de mesófilos aerobios.

El comportamiento individual tanto microbiológico como fisicoquímico de cada muestra analizada difiere considerablemente uno de otro, a pesar de presentarse similitudes entre algunas de sus características cuantificadas. Pero en general se observa que en todas las muestras, durante el transcurso de la maduración se logra la eliminación de los microorganismos coliformes, la cuenta de levaduras disminuye, al igual que lo hace la de mesófilos aerobios y de ninguno se lograron aislar mohos. En las tres muestras de queso la actividad acuosa disminuye, mientras que el pH y la acidez muestran comportamientos irregulares que pueden

ser producidos por la liberación de metabolitos diversos, como ácidos orgánicos y aminoácidos o productos nitrogenados, que promueven la disminución o aumento del pH respectivamente; además de que es probable que algunos de los microorganismos presentes usen el ácido láctico producido como una fuente de carbono, afectando así la determinación de la producción real de ácido y enmascarando el cambio en el pH y la acidez.

Los resultados demostraron que existe una relación entre la presencia de coliformes frente a la acidez y el pH, sin embargo su determinación se vuelve compleja al estar en el mismo medio productos que pueden interactuar como amortiguadores tanto del pH como de la acidez, o que ocasionen el aumento del pH y la disminución de la acidez, además de la ya mencionada posible degradación de ácido láctico. Por lo que la implementación de una metodología alterna para determinar principalmente la acidez podría ser más útil y adecuada en un medio tan complejo como el estudiado.

Por ejemplo, podría hacerse uso de técnicas instrumentales rápidas. En los laboratorios de algunas plantas industriales de quesería se emplean con eficacia espectrómetros infrarrojos (IR) y existen tres tipos básicos⁷⁷:

- a) Espectrómetros (NIR) de reflectancia del Infrarrojo próximo; que puede adaptarse tanto para muestras sólidas como líquidas⁷⁷.
- b) Espectrómetros (MFIR) infrarrojo de filtros múltiples; como su nombre lo indica emplean filtros (de referencia) seleccionados para los distintos picos de absorbancia de la muestra, y cuya composición se calcula a partir de la

absorbancia, mediante técnicas de correlación múltiple, para dar una lectura directa⁷⁷.

- c) Espectrómetros (FTIR) infrarrojos de transformación de Fourier; su aplicación al análisis de la leche y productos lácteos ofrece mayor flexibilidad y la mayor precisión potencial. Los filtros son sustituidos por una red de difracción, de modo que las longitudes de onda específicas pueden ser programadas, dependiendo de las propiedades de los componentes a medir⁷⁷.

Por otro lado, la actividad acuosa demostró tener gran influencia sobre la cuenta de coliformes, ya que coincidía su escasa presencia con valores de a_w inferiores a 0.890. De modo que éste demuestra ser un factor de gran importancia para asegurar la eliminación de estos microorganismos indeseables o patógenos en los alimentos. La actividad acuosa inicial que se observó, en las tres piezas de queso, presentó un valor ≤ 0.915 , que ya se considera un valor bajo, esto se debe a la gran cantidad de sal añadida durante la elaboración del queso. Y la disminución de esta propiedad al transcurrir la maduración se debe a la pérdida de humedad que se presenta en esta etapa.

La acidez titulable expresada como porcentaje de ácido láctico resulta una expresión arbitraria, ya que resulta que no todo el ácido titulado corresponde al ácido láctico. En realidad, también están implicados los ácidos grasos, proteínas, carbonatos, fosfatos, citratos y sulfatos de calcio y magnesio⁷⁷. Por lo tanto, el grado de acidez corresponde a la suma de todas las sustancias de reacción ácida

contenidas en el queso. Y esto explica el comportamiento observado al determinar esta propiedad en las piezas de queso analizadas.

Como la acidez generada no fue tan elevada como se hubiera esperado, se originó mayor interés por conocer el tipo de BAL presentes.

Adicionalmente, se considera que durante la adición de sal, en el proceso de elaboración del queso, se contribuye –accidentalmente- a incrementar la carga microbiana, ya que este aditivo comúnmente se manipula sin un cuidado higiénico y algunas partículas de polvo pueden adicionarse con la sal. Y por otro lado, también influye la higiene que muestre la persona que manipula el queso, quien realiza el amasado con las manos. De modo que existen diversas fuentes de inoculación natural al realizarse el queso Cotija.

Las piezas de queso estudiadas provienen de distintas zonas en la región productora, pero solo dos de ellas fueron elaboradas totalmente de forma artesanal y en la región de producción "genuina", por lo tanto se les considera como "Región de Origen". Éstas son las piezas de queso 1 y 3, correspondientes a "La Tinaja" y "Santa Ma. del Oro" respectivamente. Las diferencias más notables que presentan en comparación con la pieza de queso 2 "Cotija" son las siguientes:

- *Microbiológicamente*: la cuenta de levaduras, su desarrollo y comportamiento durante la maduración son similares entre las piezas 1 y 3, y difieren considerablemente en el comportamiento y cuenta al final del análisis del

queso 2. En las gráficas correspondientes a las piezas 1 y 3 se observa que la presencia de las levaduras disminuye a lo largo de la maduración hasta una cantidad mínima (3.3 y 5 UFC/g_{queso}), mientras que en la gráfica del queso 2 no se observa su disminución de manera tan evidente, y la cantidad final es alta (1.5×10^4 UFC/g_{queso}), e incluso mayor a la cuenta inicial.

- *Físicoquímicamente*: el valor de pH inicial y el pH mínimo alcanzado, ya que para las piezas de queso 1 y 3 el valor inicial fue similar (5.83 y 5.89, respectivamente) mientras que para el queso 2 el valor fue mayor (6.21). De igual forma el valor mínimo alcanzado se encontró entre 5.25 y 5.4 para los quesos 1 y 3, pero el segundo queso solo logró disminuir hasta 5.5.

Estas diferencias microbiológicas y físicoquímicas entre las piezas de elaboración artesanal (quesos 1 y 3), y la pieza de elaboración semiindustrial (queso 2) pueden deberse, no sólo al proceso que se siguió para su elaboración, sino también a la leche empleada como materia prima para su producción. En la leche se encuentran presentes tanto las enzimas y nutrientes fundamentales para la elaboración del queso, así como la microbiota que participará durante la maduración del mismo. Por lo tanto, existen distintas variables que determinan las diferencias observadas.

Se encontró además, que el comportamiento individual tanto microbiológico como físicoquímico de cada pieza analizada difiere entre cada una, incluso entre las piezas reconocidas como Región de Origen, por lo que se considera que

estudios posteriores y complementarios pueden ser necesarios para determinar a detalle las características microbiológicas y fisicoquímicas propias de un queso Cotija auténtico, ya que es necesario estudiar más piezas reconocidas como Región de Origen para poder establecer un comportamiento general de las piezas auténticas.

6.2 SEGUNDA ETAPA

6.2.1 Aislamiento Selectivo y Cuantificación de BAL

Como ya se ha mencionado anteriormente, las piezas de queso 1 y 3 se elaboraron artesanalmente en la región que se considera auténtica para su producción, además durante la primera etapa del estudio demostraron tener algunas similitudes en su comportamiento microbiológico y fisicoquímico. Y se trabajó con estas piezas durante la segunda etapa realizada para aislar e identificar a las BAL. De acuerdo con los resultados obtenidos para la dinámica de poblaciones se determinó emplear las muestras correspondientes al tiempo 3 de maduración de las piezas 1 y 3 (73 y 78 días respectivamente), debido a que la cuenta de coliformes en ambos quesos presentó el valor mínimo cuantificable por la metodología empleada y se mostraba además una disminución mayor al 90% de la misma población al inicio de la maduración.

La Tabla 7 presenta la cuenta de BAL determinada en las piezas 1 y 3 al tiempo t_3 de maduración (78 y 73 días, respectivamente). Se aislaron las BAL de cada medio de cultivo selectivo, bajo cada una de las condiciones de aislamiento correspondientes (ver Figuras 4 y 5). La presencia de las BAL es numéricamente

importante (aunque menor que en otros alimentos fermentados) en las piezas de queso Cotija analizadas, ya que puede observarse en la Tabla D que las cuentas al tiempo t_3 de los quesos 1 y 3 se encuentran en un rango de 6.58 y 5.33 Log_{10} UFC/g_{queso}, respectivamente.

Puede observarse en la Tabla 7 que las cepas cuantificadas presentan predominantemente la morfología de cocos. Las cepas aisladas en el medio selectivo MRS bajo las condiciones de pH 5, 42^o C y en anaerobiosis, no pudieron ser estudiadas para determinar su morfología. Y posteriormente no se realizó su purificación para conservarlas en chaquiras, debido a que su conservación requería de medios de cultivo líquido en condiciones de anaerobiosis y no se contaba con ellos.

TABLA 7. Cuantificación de BAL en distintos medios selectivos

	Medio	Grupo que se pretende aislar	Morfología al microscopio (*)	Cuenta Log ₁₀ (UFC/g queso)	Observaciones
Q U E S O 1	KAA	Enterococos	Cocos	5.54	En el medio con vancomicina crecieron distintos tipos de colonias, sólo los cocos podrían considerarse del género <i>Leuconostoc</i> .
	LM17 a 37°C	<i>S. thermophilus</i>	Cocos	5.69	
	LM17 a 22°C	<i>Lactococcus</i>	Cocos	5.85	
	MRS con sobrecapa	BAL en general	Bacilos cortos, largos y medianos	5.91	En la segunda muestra (queso 3) se observó más diversidad de colonias en los medios empleados.
			Cocos (diplococos)	5.01	
	MRS en anaerobiosis	Lb. Termófilos	No determinado	0.00	
	MRS + vancomicina	<i>Leuconostoc</i>	Bacilos cortos y bacilos medianos	5.19	
Q U E S O 3	KAA	Enterococos	Cocos	5.08	En ambas muestras de quesos se encontró crecimiento de levaduras en algunos de los medios. Su cuenta no se reporta, sin embargo no fue mayor a la cuenta de BAL.
	LM17 a 37°C	<i>S. thermophilus</i>	Cocos	4.99	
	LM17 a 22°C	<i>Lactococcus</i>	Cocos	5.19	
			Bacilos cortos	5.07	
	MRS con sobrecapa	BAL en general	Cocos	4.74	
			Bacilos cortos	3.82	
	MRS en anaerobiosis	Lb. Termófilos	No determinado	4.31	
	MRS + vancomicina	<i>Leuconostoc</i>	Cocos	4.38	
Bacilos cortos y largos			3.95		

(*) Todas las colonias observadas fueron resembradas al menos tres veces en los medios correspondientes y mostraron una prueba de catalasa negativa y tinción Gram positivo.

NSLAB: Bacterias ácido-lácticas no iniciadoras (siglas en inglés).

6.2.2 Conservación de BAL Seleccionadas en Perlas de Vidrio Perforadas

Tabla 8. Relación de Cepas Conservadas

Medio de Aislamiento	No. de Queso y No. de cepas conservadas	
	Queso 1	Queso 3
KAA	9	8
LM17 a 22°C	2	1
LM17 a 37°C	5	1
MRS	6	1
MRS + V	1	7

Se conservaron en chaquiras un total de 41 cepas, 23 fueron aisladas de la pieza 1, y 18 de la pieza 3. En la cuantificación general de BAL (ver Tabla D en Anexo 15) se observó que al tiempo 3 de maduración la población es menor en la pieza de queso 3 (5.33 Log₁₀ UFC/g) que en la pieza del queso 1 (6.58 Log₁₀ UFC/g). En la Tabla 7 se observa también que la cantidad de BAL aisladas bajo las distintas condiciones también es menor para el queso 3.

La selección de las cepas se basó en las características morfológicas y los resultados a la prueba de la catalasa y tinción Gram. Todas las cepas demostraron ser catalasa negativo y Gram positivo; adicionalmente, las colonias aisladas en el medio selectivo KAA mostraron la morfología característica, es decir, colonias circulares con pigmentación gris-negro y con un halo negro sobre el agar alrededor de la colonia, las colonias aisladas en el medio MRS y MRS con vancomicina se escogieron morfológicamente por presentar ligeras diferencias, algunas presentaban un borde liso, mientras que otras eran ligeramente rizadas en el borde.

6.2.3 Identificación Bioquímica de las BAL Seleccionadas

De las 41 cepas conservadas en chaquiras se seleccionaron 14 para ser identificadas. Por otro lado 7 de las 14 cepas seleccionadas fueron secuenciadas como parte de otro trabajo de investigación⁸⁷. Las cepas fueron seleccionadas bajo los criterios mencionados en la sección 5.3.3.4 del capítulo Metodología, y se identificaron bioquímicamente siete cepas del queso 1 y siete del queso 3. En la Tabla 9 se muestran las características de cada una.

Tabla 9. Características de las cepas seleccionadas para API

Medio de aislamiento	No. cepa	No. Queso	Características morfológicas en agar	Características al microscopio	Observaciones (ver Tabla 12)
KAA Incubación a T = 37° C pH = 7.0 por 24 hrs en Aerobiosis	8	1	Colonias circulares grises rodeadas de una zona negra en el agar. Borde liso. d ≤ 2mm	Cocos Gram (+) Agrupados en racimos	Secuenciada
	9	1	Colonias circulares grises rodeadas de una zona negra en el agar. Borde liso. d ≤ 2mm	Cocos Gram (+) Agrupados en racimos	Secuenciada
	2	3	Colonias circulares grises rodeadas de una zona negra en el agar. Borde liso. d ≤ 2mm	Cocos Gram (+) Agrupados en racimos	Secuenciada
	6	3	Colonias circulares grises rodeadas de una zona negra en el agar. Borde liso. d ≤ 2mm	Cocos Gram (+) Agrupados en racimos	Secuenciada
LM17 a 22° C Incubación a T = 22° C pH = 7.0 por 3 días en Aerobiosis	1	1	Colonias circulares, color crema semitranslúcidas brillantes. Borde liso. Plana. Acuosa. d ≤ 2mm	Cocos Gram (+) Sin agrupación aparente	Secuenciada
	11	3	Colonias circulares, color crema semitranslúcidas brillantes. Borde liso. Plana. Acuosa. d ≤ 2mm	Cocos Gram (+) Sin agrupación aparente	---

LM17 a 37 °C Incubación a T = 37° C pH = 7.0 por 1-2 días en Aerobiosis	3	1	Colonias circulares, color crema semitranslúcidas brillantes. Borde liso. Plana. Acuosa. $d \leq 2\text{mm}$	Cocos Gram (+) Sin agrupación aparente	Secuenciada
	7	3	Colonias circulares, color crema semitranslúcidas brillantes. Borde liso. Plana. Acuosa. Crecimiento en pares $d \leq 2\text{mm}$	Cocos Gram (+) Sin agrupación aparente	---
MRS Incubación a T = 30° C pH = 5.4 por 5 días en Microaerofilia (con sobrecapa de agar)	3	1	Colonias circulares, color blanco - crema. Borde liso. Acuosa. $d \geq 0.5 \leq 1\text{mm}$	Cocos Gram (+) Sin agrupación aparente	---
	10	1	Colonias circulares, color blanco - crema. Borde ligeramente irregular. Seca. $d \leq 2\text{mm}$	Bacilos medianos Gram (+) Sin agrupación aparente	---
	7	3	Colonias circulares, color crema. Borde rizado. Seca. $d \geq 1 \leq 3\text{mm}$	Bacilos largos Gram (+) Sin agrupación aparente	---
MRS + V Incubación a T = 30° C pH = 6.2 por 3 días en Aerobiosis	8	1	Colonias circulares, color blanco - crema. Borde liso. Cremosa. Crecimiento elevado. $d \geq 0.5 \leq 1\text{mm}$	Cocos Gram (+) Sin agrupación aparente	Secuenciada
	2	3	Colonias circulares, color blanco - crema. Borde liso. Cremosa. Crecimiento ligeramente elevado. $d = 1\text{mm}$	Cocos Gram (+) Sin agrupación aparente	---
	13	3	Colonias circulares, color blanco - crema. Borde liso. Crecimiento elevado. Cremosa. $d \geq 1\text{mm}$	Bacilos cortos Gram (+) Sin agrupación aparente	---

Quando en el otro trabajo de estudio⁸⁷ se obtuvieron los resultados de las 7 cepas secuenciadas se decidió sembrar en agar KAA 11 de las 14 cepas seleccionadas para identificación. Las 11 cepas presentaban morfología de cocos, fueron aisladas en distintos medios de cultivo y provenían de muestras diferentes

(ver Tabla 9). Se sembraron en el agar KAA para comprobar si eran capaces de crecer en él y ver si todas presentaban los rasgos característicos de colonias de enterococos.

Todas las 11 cepas crecieron en el agar KAA y mostraron la apariencia morfológica en agar y al microscopio característica de los enterococos: células Gram positivas, ligeramente ovoides, no esporuladas, en cadenas cortas o en pares, catalasa negativas, y en agar KAA se observaron colonias gris-negras con halos negros en el agar alrededor de la colonia^{39, 69, 79}.

Las tres cepas restantes se observaron al microscopio como bacilos y ninguna fue secuenciada.

Como se puede observar en la Tabla 7, la presencia de cocos es mayor a la de bacilos en las BAL cuantificadas durante el tiempo 3 de maduración en ambas piezas de queso, y esto también influyó en que se consideraran más cepas de cocos para realizar la identificación, ya que se observaron como cocos el 66.56% de las cepas cuantificadas para la pieza de queso 1, y el 65.5% para el queso 3.

6.2.3.1 Patrón de Fermentación de Carbohidratos

Los resultados completos de las pruebas API para cada cepa se muestran en el Anexo 17.

Los resultados para las cepas con apariencia de bacilos se introdujeron en el programa informático de Identificación correspondiente, y éstos se muestran a continuación.

Tabla 10. Identificación de Bacilos

Medio de aislamiento	No. de Queso	No. de cepa	Identidad	% de Identificación	Valor T*
MRS	1	10	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.9	0.76
MRS	3	7	<i>Lactobacillus pentosus</i>	91.6	0.80
MRS + V	3	13	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.9	0.76

* Índice "tipo" El sistema informático identifica una cepa desconocida basándose en la probabilidad de que las reacciones bioquímicas obtenidas coincidan con las de un organismo en la base de datos. De esta forma, se determina la identificación de la cepa evaluando cada resultado y se asigna un valor a dicho resultado, es decir, un valor de "tipicidad" o valor "tipo". Se asigna un valor de 1.0 al resultado más "típico", que será el de la base de datos consultada. En el caso de algún resultado incierto, un valor de 1.0 también se asigna porque esta prueba no puede contribuir a hacer la distinción entre especies. Se asigna un valor entre 0 y 1.0 para resultados atípicos. El índice "tipo" se genera mediante la suma de todos los valores "tipo" obtenidos. Un resultado perfecto en todos los valores proporcionará un índice tipo de 1.0. ⁴⁸

Para las cepas con forma de cocos no se empleó el programa Informático, únicamente se consideraron los resultados de algunas pruebas, de acuerdo a la clave de identificación propuesta por Manero y Blanch⁵², de modo que también se realizó la prueba de crecimiento en agar BHI.

6.2.3.2 Crecimiento en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI)

La apariencia de las colonias sembradas en el agar BHI y su morfología al microscopio se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Crecimiento de las cepas con forma de cocos en agar BHI

Medio de aislamiento	No. de Queso	No. de cepa	Apariencia en agar BHI	Pigmento amarillo	Morfología al microscopio
KAA	1	8	Colonias circulares, color crema, brillosas.	Negativo	Cocos Gram (+)
KAA	1	9		Negativo	Cocos Gram (+)
KAA	3	2		Negativo	Cocos Gram (+)
KAA	3	6		Negativo	Cocos Gram (+)
LM17 a 22 °C	1	1	Borde liso. Acuosas d ≤ 2mm	Negativo	Cocos Gram (+)
LM17 a 22 °C	3	11		Negativo	Cocos Gram (+)
LM17 a 37 °C	1	3	Algunas colonias presentan crecimiento en pares.	Negativo	Cocos Gram (+)
LM17 a 37 °C	3	7		Negativo	Cocos Gram (+)
MRS	1	3		Negativo	Cocos Gram (+)
MRS + V	1	8		Negativo	Cocos Gram (+)
MRS + V	3	2		Negativo	Cocos Gram (+)

6.2.3.3 Identificación de cepas de enterococos

Los resultados de la relación entre las pruebas de fermentación de carbohidratos y el crecimiento en agar BHI para cada cepa estudiada se muestran en la Tabla 12. Analizando la secuencia de pruebas bioquímicas consideradas para lograr la identificación de las cepas de enterococos (ver Figura 6) las 11 cepas con morfología de cocos mostraron el mismo patrón de resultados y se identificaron como *Enterococcus faecium*.

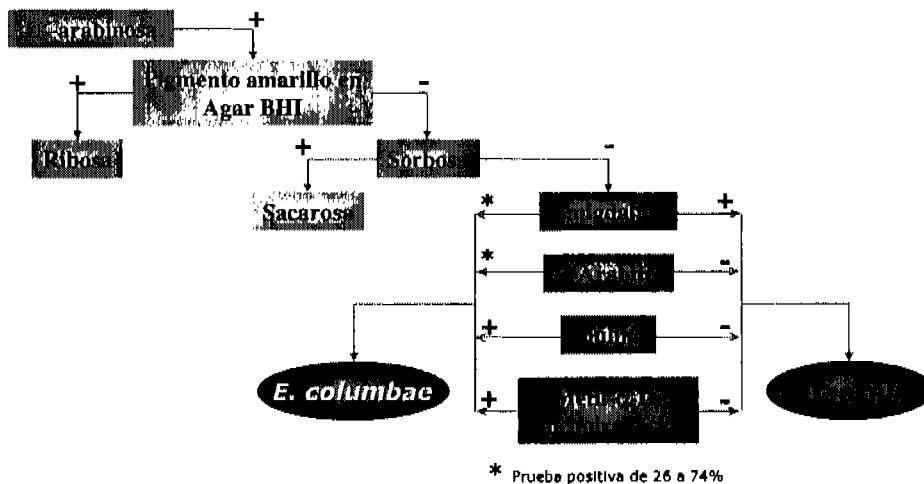


Figura 6. SECUENCIA DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONSIDERADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ENTEROCOCCOS

Tabla 12. Resultado de las Pruebas Bioquímicas Consideradas para la Identificación de Enterococcus y Comparación con la Secuenciación realizada previamente

No. de cepa y medio de aislamiento	Pruebas bioquímicas										Identidad bioquímica	Secuencia ⁸⁷
	LARA	Pigmento Amarillo en BHI	RIB	SBE	SAC	AMY	DARL	INU	MDG			
8 KAA	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	100 % <i>E. faecalis</i>
9 KAA	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	99 % <i>E. faecium</i>
2 KAA	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	99 % <i>E. faecium</i>
6 KAA	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	100 % <i>E. faecalis</i>
1 LM17 a 22° C	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	99 % <i>E. faecium</i>
11 LM17 a 22° C	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	No secuenciada
3 LM17 a 37° C	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	90 % <i>E. faecalis</i>
7 LM17 a 37° C	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	No secuenciada
3 MRS	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	No secuenciada
8 MRS + V	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	97 % <i>E. faecalis</i>
2 MRS + V	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	No secuenciada

LARA: L-Arabinosa

RIB: Ribosa

SBE: Sorbosa

SAC: Sacarosa

AMY: Amigdalina

DARL: D-Arabitol

INU: Inulina

MDG: Metil- α D-glucopiranosida

A continuación se enlistan las diferencias bioquímicas⁵² entre *E. faecium* y *E. faecalis*:

Degradación de:	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
L-arabinosa	+	-
Arbutina	+	-
Sorbitol	-	+
D-tagatosa	-	+

De acuerdo a la clave de identificación bioquímica para enterococos propuesta por Manero y Blanch⁵², la principal prueba bioquímica que diferencia a *E. faecium* de *E. faecalis* es el resultado a la degradación de L-arabinosa, *E. faecium* da un resultado positivo y *E. faecalis* negativo. En las tablas del Anexo 17 puede verse que los resultados de las 11 cepas de cocos concuerdan con los resultados de *E. faecium* a las pruebas bioquímicas que se muestran en la lista anterior, y se muestran sombreados los resultados a las pruebas correspondientes.

Sin embargo, en la Tabla 12 se observa que en algunos casos la identidad de la cepa no coincide entre el resultado obtenido mediante la secuenciación y el obtenido por las pruebas bioquímicas. Esto se observa en cuatro de las siete cepas secuenciadas, en donde se identifica a la cepa como *Enterococcus faecalis* mientras que el patrón obtenido en las pruebas bioquímicas indica que se trata de *Enterococcus faecium*.

El porcentaje de identidad con fiable para el resultado de la secuenciación debe ser mayor o igual al 97%, de modo que el resultado de la secuenciación para la cepa 3-LM17 a 37° C puede considerarse dudoso (su porcentaje de identidad es 90%); las otras seis cepas presentan un porcentaje de identificación aceptable.

Debido a que la sensibilidad y especificidad de la secuenciación es mucho mayor al resultado obtenido en las pruebas bioquímicas podría considerarse que la identidad real de las cepas 8-KAA, 6-KAA y 8-MRS+V es *Enterococcus faecalis*. Sin embargo, para el caso de este trabajo de investigación se considerarán los resultados obtenidos mediante la agrupación por la secuencia propuesta en base a las pruebas bioquímicas (ver Figura 6).

De este modo, la identidad de las tres cepas que coinciden por el método bioquímico y por la secuenciación es *Enterococcus faecium*.

Y considerando los resultados del patrón bioquímico para las otras cuatro cepas que no fueron secuenciadas se presume que se trata también de *Enterococcus faecium*, al igual que la cepa 3-LM17 a 37° C.

Las publicaciones de Manero y Blanch permiten comparar la correlación entre la identificación de enterococos mediante pruebas bioquímicas⁵² y métodos moleculares⁵³. En su estudio demuestran que el 91% de las cepas estudiadas se identificaron exitosamente mediante pruebas moleculares específicas y en concordancia con las pruebas bioquímicas de Identificación. Sin embargo hubo algunas cepas que presentaron discordancia entre las pruebas bioquímicas y las moleculares, por presentar resultados inesperados para algunas de las pruebas bioquímicas realizadas.

De este modo se puede entender que haya diferencia entre los resultados encontrados en este estudio para las pruebas bioquímicas y los resultados de secuenciación obtenidos en otro trabajo de investigación⁸⁸.

6.2.4 Presencia de *Enterococcus* en alimentos

A pesar de haberse utilizado varios medios y condiciones para el cultivo selectivo de diversos grupos de BAL, se encontró que la identidad de los microorganismos aislados principalmente pertenece al género *Enterococcus*, reportado con anterioridad como parte de la microbiota presente en varios quesos de elaboración artesanal.

Los enterococos son BAL que están presentes frecuentemente en productos lácteos y en otros alimentos fermentados⁶², y se encuentran presentes normalmente en el tracto intestinal y heces de humanos y animales^{32, 33, 69}. Algunas especies han sido aisladas del suelo, alimentos, agua y plantas, de las cuales se destaca su capacidad para crecer y sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales^{33, 69}.

6.2.4.1 Importancia de *Enterococcus* en leche y su presencia en productos lácteos

Los enterococos son importantes en la elaboración de productos lácteos debido a que tienen tanto efectos benéficos como efectos perjudiciales en el producto. Los efectos benéficos consisten en el desarrollo de sabores deseables, un impacto en la producción de bacteriocinas y probióticos, mientras que los efectos

perjudiciales pueden ocasionar la descomposición del producto. La leche bronca es uno de los muchos ambientes en los que se pueden encontrar los enterococos. Y sobreviven mejor en productos salados, como el queso.⁶⁷

Las cuentas de enterococos varían desde 10^4 a 10^8 UFC/g en diferentes cuajadas de quesos, y de 10^5 a 10^7 UFC/g en quesos maduros. Las cantidades varían de acuerdo al tipo de queso y la época de producción. En algunos quesos los enterococos son también la microbiota predominante en el producto ya maduro. La dominancia o persistencia de los enterococos en algunos quesos durante la maduración puede atribuirse a su gran rango de temperaturas de crecimiento, su alta tolerancia a la sal y acidez, y a su producción de enzimas proteolíticas involucradas en la degradación de la caseína. Sin embargo mientras se encuentra su presencia en algunos quesos, en muchos otros no hay enterococos presentes.⁶⁷

Durante la cuantificación de BAL realizada en este estudio se observó que para ambas muestras de queso las cuentas en agar KAA, empleado para el aislamiento de enterococos, fueron mayores a 5 unidades logarítmicas de UFC/g de queso. Estos valores coinciden con lo reportado en el párrafo anterior.

En un estudio⁶² se caracterizaron 68 cepas de enterococos aisladas de productos lácteos del noroeste de Italia. Se encontró que al identificarlas 35 cepas correspondían a *Enterococcus faecalis*, 27 a *E. faecium* y 6 a *E. durans*, mientras que al ser caracterizadas por su perfil de degradación de carbohidratos se

obtuvieron diferencias en un 17.6% de los casos. Además se determinó su actividad bioquímica y la mayoría de las cepas mostró una actividad de acidificación de la leche muy débil⁶². Estos resultados contribuyen a explicar un poco la razón por la que pudo ser tan baja la acidez reportada en las tres piezas de queso analizadas en este trabajo, y corroboran que, comúnmente, al realizar la identificación de cepas los resultados bioquímicos difieren de los moleculares.

Otros estudios han reportado la presencia del género *Enterococcus* en productos lácteos, en el Anexo 19 se mencionan algunos casos.

En el Anexo 20 se menciona sobre la presencia de *Enterococcus* en otros alimentos fermentados.

6.2.4.2 Patogenicidad intrínseca y virulencia potencial de los enterococos

Los enterococos son considerados como patógenos oportunistas emergentes en humanos, y están entre las bacterias más prevalentes involucradas en infecciones adquiridas en hospitales, como por ejemplo bacteremia, endocarditis bacteriana e infecciones del tracto urinario. Generalmente ocasionan problemas en pacientes que tienen enfermedades severas o con una inmunidad muy baja, *E. faecalis* es el responsable de la mayoría de las infecciones (80 a 90%), seguido de *E. faecium* (con 5 a 10%).³³

A menudo también ocasionan infecciones intra-abdominales y pélvicas, debido a que éstas usualmente son polimicrobianas^{9, 39}. Y también se ha reportado acerca

de infecciones de tejidos y heridas en pacientes con quemaduras y eventualmente en infecciones de pie diabético³⁹.

Su resistencia a muchos de los antibióticos usados comúnmente es la razón por la que es preocupante su presencia y es un factor que contribuye a la virulencia de los enterococos. Esta particularidad se debe a que los enterococos tienen una gran capacidad para intercambiar elementos extracromosomales, los cuales pueden codificar para factores de virulencia y resistencia a los antibióticos^{9, 33}. Es de gran importancia la resistencia de los enterococos a la vancomicina, ya que este antibiótico es considerado como el último recurso para el tratamiento de múltiples infecciones resistentes. Además, a pesar de que los enterococos poseen una patogenicidad intrínseca baja, la presencia de cepas con factores de virulencia potencial (tales como la habilidad de secretar gelatinasa, citolisina, hemolisina, y probablemente hialuronidasa, así como el superóxido extracelular y producir sustancias de agregación y proteínas de superficie extracelular) ha hecho surgir el debate respecto a la presencia de enterococos en alimentos^{9, 33, 39}. Pero es importante mencionar que un prerrequisito para que el enterococo cause enfermedad es la presencia de defectos en los mecanismos de resistencia del hospedero^{33, 39}.

Dos de las once cepas identificadas por métodos bioquímicos como *Enterococcus faecium* fueron aisladas del medio MRS con vancomicina, con lo cual se puede saber que al menos éstas cepas presentan la resistencia al antibiótico.

En años recientes, los enterococcos han estado implicados en infecciones nosocomiales, y por lo tanto es necesario evaluar sus aspectos sanitarios, particularmente los que implican la adquisición de determinantes de resistencia a nuevos antibióticos⁶². Con el fin de poder asegurar que su presencia incidental o su uso en productos alimenticios no pudiera tener algún efecto no deseado en la salud de sus consumidores.

La actividad benéfica de los enterococcos en los alimentos se menciona en el Anexo 21.

6.2.5 Presencia de *Lactobacillus pentosus* en alimentos

Se ha encontrado a *Lactobacillus pentosus* en una amplia variedad de alimentos fermentados, y como podrá observarse, al igual que el queso Cotija en su mayoría son productos elaborados artesanalmente en diversas partes del mundo.

A continuación se presentan los estudios en donde se ha reportado su presencia en algunos productos lácteos, mientras que en el Anexo 22 se mencionan los estudios en donde se encontró a *L. pentosus* en otros alimentos.

En un estudio se caracterizaron los lactobacilos aislados de quesos de cabra españoles y se identificaron 10 especies, entre las cuales se encontró la presencia de *L. pentosus*.⁷⁰ Y esta especie se identificó como parte de las cepas predominantes de lactobacilos aislados durante la elaboración y maduración de queso Manchego artesanal.⁷²

Durante la evolución de la población microbiana involucrada en la elaboración y maduración del tradicional queso Feta, producido en Grecia, se observó que *Lactobacillus pentosus* fue uno de los microorganismos presentes con mayor frecuencia durante la maduración del queso.⁵⁵

Lactobacillus pentosus se ha encontrado como una de las especies presentes con mayor frecuencia durante la maduración del queso Fiore Sardo.⁵⁴

El uso benéfico y la producción de bacteriocinas como resultado de la actividad de *Lactobacillus pentosus* se menciona en el Anexo 23.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Al concluir la determinación de la dinámica de las poblaciones microbianas presentes en las dos piezas de queso Cotija artesanal y en la pieza de manufactura semi-industrial, las cuentas microbianas durante los primeros 100 días de maduración demostraron, para los siguientes grupos, que en general:

- ❖ Los **mesófilos aerobios** presentan una numerosa población, que se mantiene en un valor promedio de $6.2 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}_{\text{queso}}$, durante la maduración de los tres quesos.
- ❖ Las **levaduras** presentan una población numerosa al inicio de la maduración (mayor a $3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}_{\text{queso}}$) en las tres piezas, y después de 100 días su presencia es prácticamente nula en las piezas de elaboración artesanal, mientras que en la pieza semi-Industrial es una unidad logarítmica mayor a la población inicial.
- ❖ No logró observarse la presencia de **mohos** durante su determinación en agar papa – dextrosa.
- ❖ El grupo de **BAL** es importante numéricamente (entre 5 y $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}_{\text{queso}}$).
- ❖ La población de **colliformes** disminuye conforme transcurre la maduración. Se observó una disminución en más del 95% de la población inicial a un tiempo cercano a los 60 días de ser elaborado el queso. Este periodo corresponde al establecido empíricamente por sus productores como el mínimo necesario para ser comercializado. Su ausencia se ve relacionada con:

- ✓ la producción de acidez en el medio;
- ✓ la disminución del pH, de un valor inicial de 5.8 a un mínimo de 5.4;
- ✓ la disminución de la actividad acuosa, de 0.91 a 0.89. La ausencia de coliformes se observa al alcanzarse un valor inferior de $a_w = 0.890$, de modo que se demostró que esta propiedad tiene una gran influencia sobre la cuenta de coliformes y que su variación es de gran importancia para asegurar la eliminación de los mismos en un alimento artesanal como el queso Cotija;
- ★ la posible producción de bacteriocinas provenientes de las BAL.

Las determinaciones fisicoquímicas mostraron que la actividad acuosa disminuye, mientras que el pH y la acidez muestran comportamientos irregulares probablemente producidos por la actividad enzimática que ocasiona la liberación de metabolitos diversos, y adicionalmente porque la determinación de la acidez titulable involucra otros componentes químicos que pueden alterar también los resultados. El empleo de otras metodologías para cuantificar el ácido láctico presente en las muestras podría ser de mayor utilidad para conocer con más precisión el valor de la acidez producida durante la maduración.

Se realizó la cuantificación e identificación de cepas de BAL aisladas de las dos piezas de elaboración artesanal. Este grupo microbiano permanece presente con una cantidad poblacional casi constante en los primeros 3 meses de maduración. Las cepas identificadas presentaron dos morfologías: cocos y bacilos; se observó a los primeros como la población predominante y pertenecieron al género

Enterococcus. Los cocos se lograron identificar mediante diversas pruebas bioquímicas como *Enterococcus faecium*, mientras que los bacilos se identificaron como *Lactobacillus pentosus* con un porcentaje de identificación de hasta 99.9%.

Pudo observarse el efecto de la actividad de las BAL, reflejada en los parámetros fisicoquímicos cuantificados y en su efecto sobre la población de microorganismos coliformes, como resultado de una posible producción de metabolitos inhibidores y/o bacteriocinas.

CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS Y PROYECCIONES A FUTURO

El conocimiento de los microorganismos autóctonos que juegan un papel en la fermentación, maduración y en los mecanismos que favorecen la producción de sabor en el tradicional queso Cotija es, hasta ahora, muy limitado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue, inicialmente, cuantificar y trazar la dinámica de crecimiento de las poblaciones microbianas de mayor importancia y posteriormente aislar e identificar a las BAL presentes en las piezas de queso Cotija estudiadas. Los trabajos realizados por otros estudiantes en el grupo de trabajo han contribuido también a generar esta valiosa información.

Al aportar más datos sobre la población microbiana natural presente en productos de origen lácteo puede ayudarse a prevenir la pérdida de la biodiversidad microbiana en alimentos tradicionales y consecuentemente evitar también la pérdida de la amplia variedad de quesos producidos por distintos métodos, cuyas características artesanales dependen de la región y las tradiciones locales, así como de la población microbiana autóctona que está presente tanto en la leche cruda como en el ambiente originario y que es seleccionada empírica e inintencionadamente por las características propias y naturales de elaboración del queso.

Los resultados de este trabajo representan entonces un acercamiento a la comprensión de la población microbiana involucrada en la elaboración del tradicional queso Cotija.

Además, estos y otros estudios futuros pueden servir como base para la selección de nuevas cepas con el fin de ser utilizadas tanto como cultivos específicos en la producción a gran escala de quesos tradicionales, o junto con los cultivos Inicialadores clásicos para mejorar la elaboración de los productos lácteos existentes.

De hecho, la diversidad de cultivos iniciadores para la fermentación en la industria láctea es escasa y hay una demanda en aumento, por parte de los fabricantes de queso, de nuevas cepas, cultivos Inicialadores y BAL no iniciadoras (BAL y NSLAB), que muestren efectos benéficos en las características del queso³¹.

Estudios posteriores podrían desarrollarse también para comprobar si las bacterias lácticas del queso Cotija presentan la producción de bacteriocinas, así como su utilidad potencial.

Una determinación posterior del desempeño tecnológico de las cepas aisladas, junto con nuevas investigaciones sobre otros grupos específicos de bacterias presentes en el queso, podrían conducir a la designación de cultivos específicos para emplearse en la producción del queso Cotija, con el fin de mejorar y estandarizar la calidad del producto, y a su vez preservar la población bacteriana natural que participa en su elaboración, protegiendo así las características organolépticas típicas de este queso artesanal. Y por último, contribuir a la selección de posibles nuevas cepas para la Industria láctea.

ANEXO 1. Toma de muestras a distintos tiempos de maduración.

Correspondiente a la sección: 5.2

Las piezas de queso se muestrearon considerando distintas secciones para cada tiempo. De cada sección se tomaron aproximadamente 100 g con el cuchillo estéril, haciendo un corte profundo como se muestra en la Figura A.

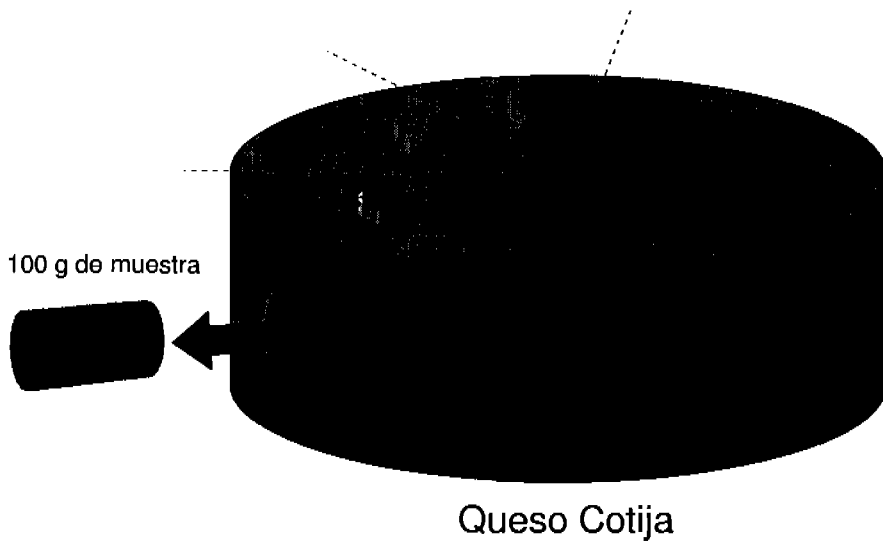


Figura A. Toma de muestras

ANEXO 2. Preparación de las Muestras. Correspondiente a la sección: 5.3.1

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Probeta de 100mL
- Vasos de precipitados de 1L y 500 mL
- Pipeta automática [Eppendorf, Multipette plus]
- Jeringas para la pipeta automática [Eppendorf, Combitip plus]
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm con tapones de metal en gradillas.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: espátulas y tenedor.

Reactivos: Agua peptonada al 0.1% como diluyente.

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Peptona [Difco Lote 770154, Detroit Michigan USA]	1.0 g
Cloruro de Sodio [J.T. Baker, S/No. Lote, Edo Méx. MÉXICO]	8.5 g
Agua destilada	1.0 L

Aparatos e Instrumentos:

- Autoclave [Yamato Sterilizer SM 300 y Amerex Instruments, Hirayama] con termómetro y manómetro.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g [Sartorius; 1209MP].
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher) [Seward, Stomacher 400 Laboratory blender].
- Bolsas estériles para homogeneizador peristáltico [Seward, Stomacher 400 Lab System].
- Micropipetas para distribuir 200 [Pipetman, Gilson] y 1000 μL [HTL, Bio-Rad]
- Puntas estériles para micropipeta de 200 y 1000 μl de capacidad.
- Agitador vortex [Thermolyne; M37615]

Procedimiento:

Se tomaron las porciones adecuadas de cada una de las muestras con una espátula estéril.

1. Se pesaron 10 g de la muestra por analizar en una bolsa plástica estéril para Stomacher.
2. Se adicionó un volumen de 90 mL de agua peptonada al 0.1% como diluyente, a una temperatura similar a la de la muestra (temperatura ambiente).
3. Se homogeneizó en el Stomacher a velocidad normal durante 60 segundos. (Dilución 10^{-1})
4. Se tomó 1 mL de la solución de la bolsa con una micropipeta con capacidad de 1000 μ L y se transfirió a un tubo de ensaye con 9 mL de agua peptonada al 0.1% estéril. (Dilución 10^{-2})
5. Se agitó el tubo preparado durante 10 segundos en el vortex y se tomó 1 mL con una punta nueva en la micropipeta, transfiriéndose a otro tubo con 9 mL de agua peptonada. (Dilución 10^{-3})
6. Se repitió el paso anterior hasta prepararse la dilución 10^{-6} .
7. Se prepararon dos series de diluciones (A y B) cada una hasta la dilución 10^{-6} .

ANEXO 3. Determinación de mesófilos aerobios. Correspondiente a la sección: 5.3.2.1.1

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- El material requerido para la preparación de muestras.
- Cajas Petri desechables estériles.
- Varillas de vidrio esterilizadas para distribuir el inóculo sobre el agar.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 y 500 mL con tapón de algodón y gasa.

Medio de cultivo: Agar triptona – extracto de levadura (agar para cuenta estándar) [Becton Dickinson & Co. Bioxon Lote 5040496, EUA y BD Difco Lote 5076111 EUA].

Formulación	
INGREDIENTE	CANTIDAD
Extracto de levadura	2.5 g
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

Aparatos e Instrumentos:

- Los necesarios en la preparación de las muestras.
- Incubadora [Gravity Convection, Incubator E-71] a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con termostato, provista con termómetro calibrado.
- Cuenta colonias con registrador digital [Scienceware, Colony counter F37862-0000, EUA].

Procedimiento:

1. Se tomaron con una punta estéril en la pipeta automática 0.15 mL de cada dilución preparada, se cambió de punta para cada dilución, y se colocó este volumen sobre el agar de cuenta estándar ya solidificado en una caja Petri.

2. Se distribuyó el inóculo con una varilla de vidrio esterilizada mediante movimientos circulares hasta la total absorción del inóculo en el medio.
3. Se inocularon las 6 diluciones correspondientes para las series preparadas A y B, cada una por duplicado.
4. Se incubaron las cajas inoculadas en posición invertida a 35 ± 2 °C durante 48 horas.
5. Al transcurrir el tiempo de incubación establecido se seleccionaron las cajas con un crecimiento de entre 25 y 250 UFC (unidades formadoras de colonias).
6. Se contaron todas las colonias desarrolladas en las cajas seleccionadas.
7. Se reportó el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de cada muestra analizada de acuerdo a los cálculos correspondientes.

Cálculos y Expresión de Resultados: Realizados de acuerdo a la norma NOM- 092-SSA1-1994:

- Después de la incubación, se seleccionaron como adecuadas las placas con un intervalo de 25 a 250 colonias, contabilizándolas con el cuenta colonias con registrador digital. Las placas de al menos una de tres diluciones debían estar en el intervalo establecido.
- Se multiplicó el número de colonias en cada placa por el inverso de la dilución correspondiente, se consideraron los criterios especiales mencionados en la norma para la obtención de resultados expresados como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de la muestra.
- Se redondeó la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo se muestren tres dígitos significativos al inicio de esta cifra, en donde los dos últimos son decimales. Para redondear, se elevó el segundo dígito decimal al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha fue cinco o mayor. Si el tercer dígito fue cuatro

o menos, se reemplazó el tercer dígito con cero y el segundo dígito se mantuvo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400).

Ejemplo del Cálculo:

Tabla A. Ejemplo para la Cuenta de Mesófilos Aerobios
en Agar Cuenta Estándar a 37° C

Queso 2 – Cotija al tiempo de maduración t_0

Serie	Dilución / número de colonias				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
A ₁	> 250	> 250	> 250	209	20
A ₂	> 250	> 250	> 250	168	25
B ₁	> 250	> 250	> 250	114	11
B ₂	> 250	> 250	> 250	129	8
□ Total	Incontable	Incontable	Incontable	155	16
Inverso de la dilución				1.55×10^5	1.6×10^6

El valor promedio de las dos diluciones es: 1.5750×10^6 .

La muestra de queso analizada pesó 10g por lo que en 1g de queso contiene: 1.5750×10^5 .

Pero como la cantidad inoculada en el agar fue de 150 μ L (0.15 mL), se convierte el resultado para 1 mL de la dilución, por lo que se tiene:

$$\frac{1.5750 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot 1 \text{ mL}}{0.15 \text{ mL}} = 1.05 \times 10^6 \text{ UFC.}$$

De modo que el resultado se reporta como 1.05×10^6 UFC/g queso 2 de bacterias mesófilas aerobias en placa en agar tripton- extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas por 48 horas a 37°C.

ANEXO 4. Determinación de mohos y levaduras. Correspondiente a la sección: 5.3.2.1.2

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron mediante una autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- El material requerido para la preparación de muestras.
- Cajas Petri desechables estériles.
- Varillas de vidrio esterilizadas para distribuir el inóculo sobre el agar.
- Matraz Erlenmeyer de 1000, 500 y 250 mL con tapón de algodón con gasa.
- Pipetas graduadas esterilizadas de 10 y 1 mL con tapón de algodón con gasa.
- Propipeta con capacidad de 10 mL [Bel-Art products, SCIENCEWARE, Fast Release Pipette Pump II Pipettor, EUA]

Medio de cultivo: Agar papa–dextrosa [Becton Dickinson & Co. Difco, Lt 5179955 EUA]

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Almidón de papa	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

Reactivos: Ácido tartárico estéril al 10 %.

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Ácido tartárico	10.0 g
Agua destilada	100.0 mL

Aparatos e Instrumentos:

- Los necesarios en la preparación de las muestras.
- Incubadora [Precision Gravity Convection Incubator, 4] a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ con termostato, provista con termómetro calibrado.
- Registrador mecánico [Bel-Art products, SCIENCEWARE, Colony counter F37862-0000, EUA].

Procedimiento:

1. Se tomaron con una punta estéril en la pipeta automática 0.15 mL de cada dilución preparada, se cambió de punta para cada dilución, y se colocó este volumen sobre el agar de cuenta estándar ya solidificado en una caja Petri.
2. Se distribuyó el inóculo con una varilla de vidrio esterilizada mediante movimientos circulares hasta la total absorción del inóculo en el medio.
3. Se inocularon las 6 diluciones correspondientes para las series preparadas A y B, cada una por duplicado.
4. Se incubaron las cajas inoculadas en posición invertida a 25 ± 2 °C durante 3, 4 y 5 días.
5. Al transcurrir el tiempo de incubación establecido se seleccionaron las cajas con un crecimiento de entre 15 y 150 UFC.
6. Se contaron todas las colonias desarrolladas en las cajas seleccionadas.
7. Se reportó el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de cada muestra analizada de acuerdo a los cálculos correspondientes.

Cálculos y Expresión de Resultados: Realizados de acuerdo a las normas NOM- 092-SSA1-1994 y NOM-111-SSA1-1994:

- Después de la incubación, se seleccionaron como adecuadas las placas con un intervalo de 10 a 150 colonias.
- Se multiplicó el número de colonias en cada placa por el inverso de la dilución correspondiente, al igual que para la cuenta de mesófilos aerobios.
- Los valores finales se redondearon de acuerdo a las indicaciones ya mencionadas en la determinación de mesófilos aerobios y el cálculo se realizó de igual forma.

ANEXO 5. Determinación de coliformes totales. Correspondiente a la sección: 5.3.2.1.3

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- El material requerido para la preparación de muestras.
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm con campanas de fermentación (tubos de Durham) y tapones de metal, en gradillas.

Medios de cultivo:

- Caldo lauril sulfato de sodio (medio de enriquecimiento selectivo) [Bioxon sin no.lote Edo. de Méx. MÉXICO].

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Perptona de caseína	20.0g
Lactosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.75 g
Fosfato monopotásico	2.75 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lauril sulfato de sodio	0.10 g
Agua destilada	1.0 L

- Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación) [Merck Lote: VM010854 302, ALEMANIA].

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Peptona	10.0g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	20.0 g
Verde brillante	0.0133 g
Agua destilada	1.0 L

Aparatos e Instrumentos:

- Los necesarios en la preparación de las muestras.
- Incubadora [Gravity Convection, Incubator E-71] a 37 ± 2 °C con termostato, provista con termómetro calibrado.

Procedimiento:

- Prueba presuntiva
1. Se tomó con una punta estéril en la pipeta automática 1 mL de cada dilución preparada, se cambió de punta para cada dilución, y se vertió este volumen dentro de un tubo de ensayo con 9 mL de caldo lauril sulfato estéril con una campana de fermentación.
 2. Se agitó el tubo inoculado en el vortex durante 10 segundos a una velocidad media.
 3. Se inocularon las 6 diluciones correspondientes para las series preparadas A y B, cada una por duplicado.
 4. Se incubaron los tubos inoculados a 35 ± 2 °C durante 48 horas y se observó si se encontraba la presencia de gas dentro de las campanas de fermentación y turbidez en el medio (resultado positivo).

➤ Prueba confirmativa.

1. De cada tubo que mostró formación de gas, se tomó 1 mL con una punta estéril en la pipeta automática y se vertió este volumen dentro de un tubo de ensayo con 9 mL de caldo lactosa bilis verde brillante estéril con una campana de fermentación. Esta operación se realizó por triplicado para cada tubo con resultado positivo en la prueba presuntiva.
2. Se incubaron los tubos inoculados a 35 ± 2 °C durante 48 horas y se observó si se encontraba la presencia de gas dentro de las campanas de fermentación y turbidez en el medio (resultado positivo).

Cálculos y Expresión de Resultados:

Se obtuvo el NMP (Número más probable) al comparar los resultados obtenidos con las tablas de la norma correspondiente.

TABLA B⁹³

Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0.1, 0.01 y 0.001 g)

combinación de positivos	3 tubos por dilución			combinación de positivos	3 tubos por dilución		
	índice del NMP por g	95% Límites de confianza			índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto	
0-0-0	<3	<0,5	<9	2-3-0	--	--	--
0-0-1	3	<0,5	9	3-0-0	23	4	120
0-1-0	3	<0,5	13	3-0-1	39	7	13
0-2-0	--	--	--	3-0-2	64	15	380
1-0-0	4	<0,5	20	3-1-0	43	7	210
1-0-1	7	1	21	3-1-1	75	14	230
1-1-0	7	1	23	3-1-2	120	30	380
1-1-1	11	3	36	3-2-0	93	15	380
1-2-0	11	3	36	3-2-1	150	30	440
2-0-0	9	1	36	3-2-2	210	35	470
2-0-1	14	3	37	3-3-0	240	36	130
2-1-0	15	3	44	3-3-1	460	71	240
2-1-1	20	7	89	3-3-2	1100	150	480
2-2-0	21	4	47	3-3-3	>1100	>150	>480
2-2-1	28	10	150				

- Se consideró la serie de tubos de la prueba confirmativa que dio formación de gas después del periodo de incubación requerido y se buscó el NMP en los cuadros correspondientes.
- Se tomaron en cuenta los criterios especiales mencionados en dicha norma. En cada caso se obtuvo un número de tres cifras, el cual es representado en los cuadros de la Tabla B.
- En la columna que indica el número de tubos positivos se busca el índice del NMP.

Los límites de confianza están representados también en los cuadros. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución.

La técnica de NMP también es llamada técnica de dilución en tubo, y tiene varias limitaciones²⁶, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado, y por lo anterior el NMP es el valor que resulta de la estimación de un contenido microbiano, con base en la probabilidad, cuando se aplica una técnica en tubo de dilución múltiple en el análisis de un producto. Esta técnica debe seleccionarse cuando la densidad esperada es como mínimo de una bacteria en 10 mL de producto líquido o de una bacteria por cada gramo de alimento sólido⁹³.

Ejemplo del Cálculo:

Tabla C. Prueba Confirmativa para Coliformes en Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante

Queso 3 – Sta. Ma. del Oro a t_0

Serie	Dilución / Número de pruebas positivas			NMP
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
A ₁	0	0	0	< 3
A ₂	3	0	0	23
B ₁	3	3	0	240
B ₂	3	3	0	240
\bar{x} Total				126.25

De modo que comparando la cantidad de pruebas positivas por cada serie con la tabla B el valor promedio obtenido para la cuenta presente es 126.25 NMP/g de coliformes totales, incubados por 48 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

ANEXO 6. Cuantificación General de BAL. Correspondiente a la sección: 5.3.2.2

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- El material requerido para la preparación de muestras.
- Cajas Petri desechables estériles.
- Varillas de vidrio esterilizadas para distribuir el inóculo sobre el agar.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 y 500 mL con tapón de algodón.

Medio de cultivo: MRS (de Man Rogosa Sharpe) [Oxoid Lote 369354 Basingstoke, Hampshire, INGLATERRA].

INGREDIENTE	CANTIDAD
Peptona	10.0 g
Polvo "Lab-Lemco"	8.0 g
Extracto de levadura	4.0 g
D-Glucosa	20.0 g
Acetato sódico $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.0 g
Citrato triamónico	2.0 g
Fosfato ácido dipotásico	2.0 g
Sulfato magnésico $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Sulfato manganoso $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05
Poliorbato 80	1 mL
Agar	10.0 g
Agua destilada	1.0 L

Aparatos e Instrumentos:

- Los necesarios en la preparación de las muestras:

- Incubadora [Precision® Gravity Convection Incubator, 4] a 29 ± 2 °C con termostato, provista con termómetro calibrado.
- Registrador mecánico [Scienceware, Colony counter F37862-0000, EUA].

Procedimiento:

1. Se tomaron con una punta estéril en la pipeta automática 0.15 mL de las diluciones preparadas 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , se cambió de punta para cada dilución, y se colocó este volumen sobre el agar MRS ya solidificado en una caja Petri.
2. Se distribuyó el inóculo con una varilla de vidrio esterilizada mediante movimientos circulares hasta la total absorción del inóculo en el medio.
3. Se inocularon las 3 diluciones correspondientes para las series preparadas A y B, cada una por duplicado.
4. Se permitió la total absorción del inóculo en el medio y posteriormente se vertió una sobrecapa de agar MRS de unos dos o tres milímetros de espesor, con el fin de generar condiciones de microaerofilia.
5. Se dejó solidificar el medio y posteriormente se incubaron las cajas inoculadas en posición invertida a 29 ± 2 °C durante 48 horas.
6. Al transcurrir el tiempo de incubación establecido se seleccionaron las cajas con un crecimiento de entre 25 y 250 UFC (unidades formadoras de colonias).
7. Se contaron todas las colonias desarrolladas en las cajas seleccionadas.
8. Se reportó el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de cada muestra analizada de acuerdo a los cálculos correspondientes.

Cálculos y Expresión de Resultados: Realizados de acuerdo a la norma NOM- 092-SSA1-1994 y como se especifica para la cuantificación de mesófilos aerobios.

ANEXO 7. Aislamiento Selectivo y Cuantificación de Bacterias Ácido Lácticas.

Correspondiente a la sección: 5.3.3.1

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- El material requerido para la preparación de muestras.
- Cajas Petri desechables estériles.
- Varillas de vidrio esterilizadas para distribuir el inóculo sobre el agar.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 y 500 mL con tapón de algodón.

Medios de cultivo: MRS [Oxoid Lote 369354 Basingstoke, Hampshire, INGLATERRA], KAA [Oxoid Lote 296092 Basingstoke, Hampshire, INGLATERRA] y LM17 [Oxoid Lote 381745 Basingstoke, Hampshire, INGLATERRA].

Aparatos e Instrumentos:

- Los necesarios en la preparación de las muestras.
- Incubadora [Precision® Gravity Convection Incubator, 4] a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con termostato, provista con termómetro calibrado.
- Incubadora [Gravity Convection, Incubator E-71] a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con termostato, provista con termómetro calibrado.
- Estufa [Riossa, EC] a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ con termostato, provista con termómetro calibrado.
- Registrador mecánico [Scienceware, Colony counter F37862-0000, EUA].

Procedimiento:

1. Se tomaron con una punta estéril en la pipeta automática 0.15 mL de las diluciones preparadas 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , se cambió de punta para cada

dilución, y se colocó este volumen sobre los 6 agares ya solidificados en cajas Petri: MRS, KAA, MRS a pH 5, MRS con vancomicina y LM17. Se sembró también la dilución 10^{-2} para el medio MRS con vancomicina.

2. Se distribuyó el inóculo con una varilla de vidrio esterilizada mediante movimientos circulares hasta la total absorción del inóculo en el medio.
3. Se inocularon las 3 diluciones correspondientes para las series preparadas A y B, cada una por duplicado para cada uno de los 6 agares.
4. Una vez absorbido totalmente el inóculo en el medio se procedió a verter una sobrecapa de agar MRS de unos dos o tres milímetros de espesor, con el fin de generar condiciones de microaerofilia sobre el medio MRS y se dejó solidificar. En el caso de los demás agares no se realizó este paso.
5. Se incubaron las cajas inoculadas en posición invertida a 29 ± 2 °C para el caso del medio MRS con sobrecapa de agar y MRS con vancomicina, a 37 ± 2 °C el medio KAA y un par (por cada dilución) de cajas petri inoculadas en el medio LM17, a 22 ± 4 °C el otro par en LM17 y a 45 ± 2 °C las del medio MRS a pH 5. El tiempo y condiciones de incubación para cada caso se mencionan en la Figura 4.
6. Al transcurrir el tiempo de incubación establecido para cada uno de los medios se seleccionaron las cajas con un crecimiento de entre 25 y 250 UFC.
7. Se contaron todas las colonias desarrolladas en las cajas seleccionadas.
8. Se reportó el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de cada muestra analizada de acuerdo a los cálculos correspondientes.

Cálculos y Expresión de Resultados: Realizados de acuerdo a la norma NOM- 092-SSA1-1994 y como se especifica en la cuantificación de mesófilos aerobios.

ANEXO 8. Selección y Purificación de Cepas. Correspondiente a la sección: 5.3.3.2

Material:

- Asas de siembra microbiológicas esterilizadas a la flama
- Cajas Petri estériles
- Portaobjetos

Reactivos:

- Reactivos de gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol – Acetona y Safranina
- Aceite de inmersión
- Peróxido de Hidrógeno [HYCEL de México, grado reactivo, Lote 43764]

Aparatos e Instrumentos:

- Las incubadoras necesarias para el aislamiento y cuantificación de BAL.
- Mechero Fischer
- Microscopio [Olympus CX31RTSF Tokio, JAPÓN]

Medios de cultivo: Los mismos empleados para el aislamiento selectivo y cuantificación de BAL

Procedimiento:

1. De las colonias aisladas de ambos quesos en cada uno de los medios se seleccionaron 10 colonias en base a su morfología.
2. Se observó la morfología de crecimiento en medio sólido y se realizaron la prueba de la catalasa y tinción Gram de las colonias seleccionadas y aisladas en cada uno de los medios empleados, para verificar que fueran BAL.
3. Todas las colonias se sembraron por estría, en el agar correspondiente, al menos 5 veces para su purificación.

ANEXO 9. Conservación de Cepas Seleccionadas en Perlas de Vidrio Perforadas

(Chaquiras). Correspondiente a la sección: 5.3.3.3

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Viales de plástico con fondo cóncavo y falldon con capacidad aprox. de 2 mL [Oxigen o Nalgene].
- Chaquiras lavadas, con 2 mm de diámetro interno.
- Puntas estériles para micropipeta de 200 y 1000µl de capacidad.
- Tubos para centrifuga [Nalgene] con capacidad de 15 mL.
- Asas de siembra microbiológicas.
- Pipetas Pasteur de vidrio estériles.

Reactivos:

- Agua destilada filtrada
- Solución jabonosa al 1% v/v.
- Solución de HCl 1 N.
- Glicerol anhidro [JT Baker MÉXICO].

Medios de Cultivo:

- Caldo MRS [Oxoid Lote 411168 Basingstoke, Hampshire, INGLATERRA]

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Peptona	10.0 g
'Lab-lemco' polvo	8.0 g
Extracto de levadura	4.0 g
Glucosa	20.0 g
Teen 80	1 mL

K ₂ HPO ₄	2.0 g
Acetato de sodio · 3H ₂ O	5.0 g
Citrato triamónico	2.0 g
Sulfato de magnesio · 7H ₂ O	0.2 g
Sulfato de manganeso · 4H ₂ O	0.05 g
Agua destilada	1 L

- Caldo APT [Becton Dickinson & Co. Difco, Lt 6135181 EUA]

Formulación

INGREDIENTE	CANTIDAD
Triptona	12.5 g
Dextrosa	10.0 g
Extracto de levadura	7.5 g
Citrato de Sodio	5.0 g
Tiamina hidroclicorada	0.001 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
Cloruro de manganeso	0.14 g
Sulfato de magnesio	0.8 g
Sulfato ferroso	0.04 g
Complejo: Mono oleato de sorbitan	0.2 g
Agua destilada	1 L

- Caldo MRS con 15% de glicerol.
- Caldo APT con 15 % de glicerol.

Aparatos e Instrumentos:

- Autoclave [Yamato Sterilizer SM 300] con termómetro y manómetro.
- Micropipetas para distribuir 200 [Pipetman, Gilson] y 1000 µL [HTL, Bio-Red].

- Agitador vortex [Thermolyne; M37615].
- Espectrofotómetro [Perkin Elmer Lambda 3A UV/VIS]
- Las incubadoras necesarias para el aislamiento y cuantificación de BAL.
- Congelador a -76 °C [Revco Technologies USA. Mod. Num.: NU-6613A34]

Procedimiento: Los pasos involucrados en la preparación de la suspensión de bacterias son:

1. Preparación de las chaquiras: Se lavaron en agua filtrada y se midió el pH del agua. Se preparó una solución jabonosa muy diluida en la que se lavaron las chaquiras, se enjuagaron hasta eliminar el jabón y posteriormente se enjuagaron con una solución de HCl diluido para neutralizar la alcalinidad restante. Se continuó el enjuague con agua filtrada hasta que el pH del agua de lavado fue igual al del agua filtrada al inicio. Se lavaron finalmente con agua destilada y se dejaron secar en una estufa a 45°C.
2. Preparación de los viales: Se llenaron los viales con 20 chaquiras cada uno, y se prepararon 3 viales por cada cepa a conservar. Se taparon y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
3. Preparación del medio de suspensión: Se prepararon caldo MRS con 15% de glicerol y caldo APT con 15% de glicerol para conservar a las cepas de bacterias lácticas aisladas.
4. Crecimiento de las bacterias: Se tomó cada colonia seleccionada y pura, crecida después de 24 horas en su agar selectivo correspondiente y se inoculó en un tubo de centrifuga estéril con 5mL de caldo MRS estéril ó 5mL de caldo APT estéril. El caldo empleado dependió de la cepa en estudio, ya que mostraron distinta capacidad de

crecimiento en ambos medios. Una vez inoculado el tubo se incubó en agitación alrededor de 24 horas bajo la temperatura correspondiente a su crecimiento óptimo.

5. Preparación de la suspensión de bacterias: Después de incubar cada cepa durante el tiempo adecuado se tomó una muestra de cada una para cuantificar su densidad óptica. Se preparó una celda de espectrofotómetro con 0.1 mL del caldo inoculado y 0.9 mL del mismo caldo estéril, se preparó otra celda como blanco con 1 mL de caldo estéril y se procedió a tomar su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. El fin de este paso es lograr obtener una suspensión bacteriana con una densidad óptica adecuada para asegurar que cada chaquira pueda portar numerosas células. Cada cepa reportó una absorbancia mínima de 0.3 a 600 nm para poder ser procesada para su conservación. Se procedió a centrifugar el tubo inoculado a 3600 rpm durante 15 minutos, se realizó después un lavado del pellet celular con agua peptonada al 0.1%, con el fin de eliminar residuos del medio. Se centrifugó nuevamente a 3600 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con el caldo apropiado (MRS o APT) con 15% de glicerol.

6. Distribución de la suspensión: Con una pipeta Pasteur estéril se tomó un volumen de la suspensión bacteriana en medio con glicerol y se procedió a llenar los viales correspondientes para cada cepa por triplicado. Una vez llenos se comprobó que ninguna chaquira tuviera aire en su interior, se logró expulsar el aire con golpes suaves en las paredes del vial. Se eliminó el exceso de suspensión en la superficie, hasta cubrir por completo el volumen ocupado por las chaquiras.

7. Congelación y almacenamiento de los viales: Cada vial preparado se etiquetó adecuadamente para identificar el número de cepa, el medio del que fue aislado y el número de la pieza de queso de donde se aisló. Se colocaron dentro de contenedores de cartón con tapa, para evitar la acumulación de hielo sobre los viales. Adicionalmente se etiquetó cada caja con las indicaciones de las cepas contenidas, del medio en el que se encuentran suspendidas y cuál es el medio óptimo para su recuperación. Los contenedores se colocaron en el ultracongelador a $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ANEXO 10. Patrón de fermentación de carbohidratos.

Correspondiente a la sección: 5.3.3.4.1

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron en autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Puntas estériles para micropipeta de 200 y 1000 μL de capacidad.
- Tubos para centrifuga [Nalgene] con capacidad de 15 mL.
- Asas de siembra microbiológicas
- Gradilla

Reactivos:

- Agua destilada estéril
- Solución fisiológica (NaCl al 0.85%) a pH 7
- Aceite de parafina estéril [BioMérieux Lot. 795355101]
- Galerías API 50 CH [BioMérieux]

Medios de cultivo:

- Medio API 50 CHL [BioMérieux]

Formulación	
Ingrediente	Cantidad
Polipeptona (Origen bovino/porcino)	10 g
Extracto de levadura	5 g
Tween 80	1 mL
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato sódico	5 g
Citrato diamónico	2 g

Sulfato de magnesio	0.20 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Púrpura de bromocresol	0.17 g
Agua desmineralizada	1000 mL

- Caldos MRS y APT estériles.

Aparatos e Instrumentos:

- Autoclave [Yamato Sterilizer SM 300] con termómetro y manómetro.
- Micropipetas para distribuir 200 [Pipetman, Gilson] y 1000 μL [HTL, Bio-Red].
- Agitador vortex [Thermolyne; M37615].
- Espectrofotómetro [Perkin Elmer Lambda 3A UV/VIS]
- Incubadora con agitación constante y baño de agua [Lab-line Instruments Inc. Shakerbath] a 22°C.
- Incubadora con agitación constante [New Brunswick Scientific. Innova 40] a 30°C.
- Incubadora con agitación constante [New Brunswick Scientific. Innova 4000] a 37°C.
- Programa informático de identificación [APILAB Plus V.3.3 BioMérieux Copyright 1990]

Procedimiento:

1. Se retiró del congelador a -76 °C uno de los viales de cada cepa a analizar. Se retiró una de las chaquiras y se introdujo a un tubo de centrifuga con 5 mL de caldo MRS o APT, según la cepa correspondiente. Se dejó en incubación a la temperatura adecuada de crecimiento por un tiempo entre 18 y 24 horas, de acuerdo al tiempo óptimo de cada cepa para encontrarse en el punto entre la fase logarítmica y la estacionaria de crecimiento.

2. Al transcurrir la incubación se centrifugó el tubo inoculado a 3600 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió con 2 mL de la solución fisiológica estéril para realizar un lavado. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y se realizó una segunda resuspensión en la solución fisiológica seguida de un segundo lavado y centrifugación.
3. El pellet celular se resuspendió de nuevo en 2 mL de solución fisiológica y esta suspensión celular se adicionó poco a poco, en volúmenes de 50 a 100 μ L, a un tubo con 5 mL de agua destilada estéril, hasta igualar una densidad óptica de 0.468 en espectrofotómetro a 600 nm. El volumen necesario para lograr esa densidad óptica se denominó como "n".
4. Se prepararon las galerías API 50 CH sobre las cámaras de incubación con un poco de agua destilada estéril dentro de los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda.
5. Se abrió una de las ampollitas con el medio API 50 CHL y se inoculó con una cantidad de suspensión igual a 2 veces el número de gotas necesarias (2n).
6. Se homogenizó el medio y se procedió a repartir con la micropipeta 100 μ L en cada uno de los microtubos de las galerías API 50 CH preparadas, y se cubrió cada uno con una o dos gotas de aceite de parafina para generar condiciones de anaerobiosis. Se etiquetó adecuadamente cada cámara de incubación sobre la lengüeta con la referencia de la cepa correspondiente.
7. Se incubaron a $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ó a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ según la cepa analizada durante 48 horas.

Expresión de Resultados:

1. Se observaron los resultados de la lectura de las galerías para cada cepa al transcurrir 24 y 48 horas de incubación. Se interpretó cada ensayo como positivo (+) o negativo (-) y se anotó en la hoja de resultados correspondiente.
2. Los resultados obtenidos para el caso de algunas cepas se compararon con la base de datos del programa informático de identificación, mientras que las demás cepas se sometieron a otras pruebas bioquímicas para su identificación.

ANEXO 11. Crecimiento en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI).

Correspondiente a la sección: 5.3.3.4.2

Material: Todo el material e instrumentos en contacto con las muestras bajo estudio se esterilizaron mediante una autoclave, durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Puntas estériles para micropipeta de 200 y 1000 μL de capacidad.
- Tubos para centrifuga [Nalgene] con capacidad de 15 mL.
- Asas de siembra microbiológicas
- Gradilla
- Portaobjetos de vidrio
- Cajas Petri desechables estériles
- Matraz Erlenmeyer de 1000 y 500 mL con tapón de algodón.

Medios de cultivo:

- Caldos MRS y APT estériles.
- Agar BHI

Aparatos e Instrumentos:

- Autoclave [Yamato Sterilizer SM 300] con termómetro y manómetro.
- Micropipetas para distribuir 200 [Pipetman, Gilson] y 1000 μL [HTL, Bio-Red].
- Agitador vortex [Thermolyne; M37615].
- Las incubadoras necesarias para el aislamiento y cuantificación de BAL.
- Mechero Fischer
- Microscopio [Olympus CX31RTSF Tokio, JAPÓN]

Procedimiento:

1. Se retiró del congelador a $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ uno de los viales de cada cepa a analizar. Se retiró una de las chaquiras y se introdujo a un tubo de centrifuga con 5 mL de caldo MRS o APT, según la cepa correspondiente. Se dejó en incubación a la temperatura adecuada de crecimiento por 24 horas.
2. Al transcurrir la incubación se tomó una asada del caldo y se sembró por estría sobre una caja petri con agar BHI previamente etiquetada con el número de la cepa correspondiente.
3. Se dejó en incubación durante 24 horas a la temperatura correspondiente para cada cepa.
4. Al término de la incubación se observó el crecimiento y pigmentación de las colonias en el agar BHI y se anotaron las observaciones.
5. Finalmente se realizó el frotis y tinción de Gram para cada cepa con el fin de comprobar su morfología al microscopio.

Expresión de Resultados:

1. Se observó la coloración de las colonias en el agar BHI y se reportó como pigmento amarillo positivo (+) o pigmento amarillo negativo (-).

ANEXO 12. Determinación de la Actividad Acuosa (a_w).

Correspondiente a la sección: 5.4.2

Material:

- Espátula
- Celdas de plástico para contener la muestra dentro del higrómetro.

Aparatos e Instrumentos:

- Higrómetro [Rotronic Instrument corp., Aw Quick. Censor Aw VC Rotronic].

Procedimiento:

1. 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: 0.982
--------------------------------	-------	---------------	---------------------

2. Se colocó una porción de la muestra fraccionada de queso Cotija dentro de la celda de plástico.
3. Se introdujo la celda con la muestra dentro de una cápsula provista de un censor para a_w , conectado al higrómetro.
4. Se realizó la lectura directamente en el higrómetro, obteniéndose los valores correspondientes a cada muestra.

Expresión de Resultados:

1. Se anotó el valor absoluto reportado por el aparato.

ANEXO 13. Determinación del pH. Correspondiente a la sección: 5.4.3

Material:

- Espátula
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Vasos de precipitados de 100 y 250 mL.
- Gasa
- Probeta graduada de 100 mL.

Aparatos e Instrumentos

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001g [OHAUS Voyager, V10640].
- Incubadora con agitación [Lab-Line Instruments inc., Lab-Line Orbit Environ Shaker].
- Potenciómetro [Beckman ϕ 34 pHMeter].

Reactivos:

- Agua destilada a pH 7 a una temperatura de 40°C.
- Solución buffer estándar a pH 7.
- Solución buffer estándar a pH 4.

Procedimiento:

1. Se calibró el potenciómetro con las soluciones buffer a pH 7 y 4.
2. Se colocaron 9g de la muestra fraccionada 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 ± 0.2 a 40 ± 2 °C.
3. Se agitó el matraz con el agua y la muestra a 250 rpm. durante 15 min. a una temperatura ≤ 30 °C en la incubadora.

4. La solución del matraz se filtró mediante un pedazo de gasa, con el objetivo de evitar el paso de los sólidos suspendidos y los glóbulos de grasa del queso.
5. Se hizo la lectura del filtrado en el potenciómetro provisto de un electrodo de membrana de vidrio junto con el electrodo tipo.

Expresión de los resultados:

1. La lectura se hizo directamente en el potenciómetro, se anotó el valor reportado.

ANEXO 14. Acidez como Porcentaje de Ácido Láctico. Correspondiente a la sección: 5.4.4

Material:

- Los necesarios para la determinación de pH.
- Bureta de 50 mL
- Pipeta de 25 mL

Aparatos e Instrumentos

- Los necesarios para la determinación de pH.

Reactivos:

- Solución valorada de NaOH 0.1N [HYCEL de México S.A. de C.V. Lote: 116731].
- Solución indicadora de fenolftaleína al 1% en etanol al 70%.

Procedimiento:

1. Se tomó una alícuota de 25 mL a partir del filtrado obtenido durante la determinación del pH, y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se adicionaron de dos a tres gotas del indicador de fenolftaleína..
3. Se tituló la solución del matraz con NaOH 0.1N hasta observar el punto de vire característico (rosa tenue).

Cálculos y Expresión de Resultados:

Se calculó la acidez expresada como porcentaje de ácido láctico a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{V \times N \times 90}{M \times 1000} \times 100$$

Donde:

V = Volumen en mililitros de hidróxido de sodio consumido en la titulación.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

90 = Equivalentes del ácido láctico.

M = Peso en gramos de la muestra.

ANEXO 15. Resultados de la Dinámica de Poblaciones. Correspondiente a la sección: 6.1.1

Tabla D. Resultados para la Dinámica de Poblaciones Microbianas

Muestra	Tiempo desde la elaboración (días)	Pruebas microbiológicas				
		Mesófilos aerobios (UFC/g queso)	Levaduras (UFC/g queso)	Mohos (UFC/g queso)	Coliformes (NMP/g queso)	BAL (UFC/g queso)
1	(t ₀) 20	4.87 x 10 ⁷	3.50 x 10 ⁴	Ausencia	447.5	8.26 x 10 ⁶
	(t ₁) 38	6.29 x 10 ⁶	2.56 x 10 ⁵	Ausencia	12.25	1.63 x 10 ⁶
	(t ₂) 58	4.22 x 10 ⁶	8.82 x 10 ⁵	Ausencia	<3	6.20 x 10 ⁶
	(t ₃) 78	2.96 x 10 ⁶	9.07 x 10 ⁵	Ausencia	<3	3.78 x 10 ⁶
	(t ₄) 101	1.88 x 10 ⁶	3.33	Ausencia	<3	7.13 x 10 ⁵
2	(t ₀) 17	1.05 x 10 ⁶	1.91 x 10 ²	Ausencia	80.25	3.16 x 10 ⁵
	(t ₁) 35	2.13 x 10 ⁶	3.31 x 10 ⁵	Ausencia	401	5.05 x 10 ⁵
	(t ₂) 55	3.13 x 10 ⁵	3.18 x 10 ⁵	Ausencia	<3	1.30 x 10 ⁶
	(t ₃) 75	7.13 x 10 ⁵	6.62 x 10 ⁵	Ausencia	<3	1.38 x 10 ⁶
	(t ₄) 98	6.01 x 10 ⁵	1.48 x 10 ⁴	Ausencia	<3	6.54 x 10 ⁵
3	(t ₀) 15	2.00 x 10 ⁷	1.45 x 10 ⁴	Ausencia	126.25	1.43 x 10 ⁶
	(t ₁) 33	3.13 x 10 ⁵	3.44 x 10 ³	Ausencia	292	9.32 x 10 ⁵
	(t ₂) 53	1.09 x 10 ⁶	1.75 x 10 ³	Ausencia	13	1.21 x 10 ⁵
	(t ₃) 73	1.10 x 10 ⁶	1.35 x 10 ¹	Ausencia	8	2.13 x 10 ⁵
	(t ₄) 96	7.36 x 10 ⁴	5.00	Ausencia	<3	5.17 x 10 ⁴

Tabla E. Resultados para la Dinámica de Poblaciones Microbianas
Expresados Logarítmicamente

Muestra	Tiempo desde la elaboración (días)	Pruebas microbiológicas		
		Mesófilos aerobios $\text{Log}_{10}(\text{UFC/g}_{\text{queso}})$	Levaduras $\text{Log}_{10}(\text{UFC/g}_{\text{queso}})$	BAL $\text{Log}_{10}(\text{UFC/g}_{\text{queso}})$
1	(t ₀) 20	7.69	4.54	6.92
	(t ₁) 38	6.80	5.41	6.21
	(t ₂) 58	6.63	5.95	6.79
	(t ₃) 78	6.47	5.96	6.58
	(t ₄) 101	6.27	0.52	5.85
2	(t ₀) 17	6.02	3.28	5.50
	(t ₁) 35	6.33	5.52	5.70
	(t ₂) 55	5.50	5.50	6.11
	(t ₃) 75	5.85	5.82	6.14
	(t ₄) 98	5.78	4.17	5.82
3	(t ₀) 15	7.30	4.16	6.16
	(t ₁) 33	5.50	3.54	5.97
	(t ₂) 53	6.04	3.24	5.08
	(t ₃) 73	6.04	1.13	5.33
	(t ₄) 96	4.87	0.70	4.71

Se calculó el logaritmo en base diez de las cuentas obtenidas para cada tipo de microorganismo cuantificado expresándolo como $\text{log}_{10}(\text{UFC/g})$ –con excepción de los microorganismos coliformes. Esto con el fin de facilitar la observación de las gráficas correspondientes (Gráficas 1, 2 y 3) y visualizar mejor la tendencia de crecimiento mostrada por la microbiota en cada pieza de queso analizada.

ANEXO 16. Resultados Fisicoquímicos. Correspondiente a la sección: 6.1.2

Tabla F. Resultado de las pruebas fisicoquímicas

Muestra	Tiempo desde la elaboración (días)	Pruebas fisicoquímicas		
		pH	% Ácido Láctico	Aw ; Temperatura (°C)
1	(t ₀) 20	5.83	0.303	0.914 ; 24.2
	(t ₁) 38	5.41	0.257	0.890 ; 21.9
	(t ₂) 58	5.53	0.257	0.883 ; 22.8
	(t ₃) 78	5.57	0.255	0.872 ; 22.6
	(t ₄) 101	5.40	0.290	0.787 ; 23.6
2	(t ₀) 17	6.21	0.193	0.8995 ; 24.55
	(t ₁) 35	5.55	0.220	0.888 ; 22.2
	(t ₂) 55	5.57	0.217	0.877 ; 22.9
	(t ₃) 75	5.50	0.280	0.861 ; 22.1
	(t ₄) 98	5.71	0.163	0.828 ; 23.8
3	(t ₀) 15	5.89	0.310	0.915 ; 24.65
	(t ₁) 33	5.33	0.297	0.911 ; 22.4
	(t ₂) 53	5.31	0.293	0.904 ; 22.7
	(t ₃) 73	5.32	0.397	0.899 ; 22.3
	(t ₄) 96	5.25	0.337	0.887 ; 23.4

ANEXO 17. Hojas de Resultados de las Pruebas de Fermentación de CHO's. Correspondiente a las secciones: 6.2.3.1 y 6.2.3.3

Tabla G. Cepa 8 aislada del queso 1 en el medio KAA. Incubación en medio 50 CHL a 37° C, por 48 hrs. (*E. faecium*)

0	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	43	44	45	46	47	48	49	
-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	GLY	ERY	DARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	MDM	MDG	NAG	AMY	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	

Tabla H. Cepa 9 aislada del queso 1 en el medio KAA. Incubación en medio 50 CHL a 37° C, por 48 hrs. (*E. faecium*)

0	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	43	44	45	46	47	48	49		
-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	GLY	ERY	DARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	MDM	MDG	NAG	AMY	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG		

Tabla I. Cepa 2 aislada del queso 3 en el medio KAA. Incubación en medio 50 CHL a 37° C, por 48 hrs. (*E. faecium*)

0	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	43	44	45	46	47	48	49		
-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	GLY	ERY	DARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	MDM	MDG	NAG	AMY	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG		

Tabla S. Cepa 8 aislada del queso 1 en el medio MRS + V. Incubación en medio 50 CHL a 29° C, por 48 hrs. (*E. faecium*)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG			

Tabla T. Cepa 13 aislada del queso 3 en el medio MRS. Incubación en medio 50 CHL a 29° C, por 48 hrs. (*Lb. pentosus*)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG			

Tabla U. CLAVE para identificar la relación de los ensayos para carbohidratos en cada galería

0	0	Testigo	10	GAL	D-Galactosa	20	MDM	Metil- α -D-Manopiranosida	30	MEL	D-Melibiososa	40	TUR	D-Turanososa
1	GLY	Glicerol	11	GLU	D-Glucosa	21	MDG	Metil- α -D-Glucopiranosida	31	SAC	D-Sacarosa	41	LYX	D-Lixosa
2	ERY	Eritrol	12	FRU	D-Fructosa	22	NAG	N-acetil-glucosamina	32	TRE	D-Trehalosa	42	TAG	D-Tagatosa
3	DARA	D-Arabinosa	13	MNE	D-Manosa	23	AMY	Amigdalina	33	INU	Inulina	43	DFUC	D-Fucosa
4	LARA	L-Arabinosa	14	SBE	L-Sorbosa	24	ARB	Arbutina	34	MLZ	D-Melezitosa	44	LFUC	L-Fucosa
5	RIB	D-Ribosa	15	RHA	L-Rhamnosa	25	ESC	Esculina + Citrato Férrico	35	RAF	D-Rafinosa	45	DARL	D-Arabitól
6	DXYL	D-Xilosa	16	DUL	Dulcitol	26	SAL	Salicina	36	AMD	Almidón	46	LARL	L-Arabitól
7	LXYL	L-Xilosa	17	INO	Inositol	27	CEL	D-Celobiososa	37	GLYG	Glicógeno	47	GNT	Gluconato Potásico
8	ADO	D-Adonitol	18	MAN	D-Manitol	28	MAL	D-Maltosa	38	XLT	Xilitol	48	2KG	2-Cetogluconato Potásico
9	MDX	Metil- β -D-Xilopiranosida	19	SOR	D-Sorbitol	29	LAC	D-Lactosa (origen bovino)	39	GEN	Gentiobiososa	49	5KG	5-Cetogluconato Potásico

ANEXO 18. Caracterización de BAL por métodos moleculares⁸⁷. Correspondiente a la sección: 5.3.3.

Como parte de otra investigación⁸⁷ en el grupo de trabajo se procesaron 24 cepas, es decir, el 58.5% del total de cepas ya conservadas en chaquiras. Se empleó la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)⁸⁴ para correr el ADN de las cepas seleccionadas. Éstas se agruparon de acuerdo a la posición de las bandas que presentaron, juntando en un mismo grupo a las bandas con igual posición. Se seleccionaron 7 cepas (por presentar un patrón electroforético diferente por el método de DGGE y haberse aislado de distintas piezas de queso en diferentes medios selectivos) y se procesaron para conocer su identidad mediante la secuenciación de la región V3⁶⁸ del gen ribosomal 16S rARN⁸⁷.

Los métodos moleculares aportan información valiosa acerca de las comunidades microbianas, en oposición a las técnicas basadas únicamente en el cultivo en placa. El gen 16S rARN es el blanco de los cebadores para diversos estudios, porque estos genes están presentes en todos los organismos, tienen regiones bien definidas para la clasificación taxonómica que no son sujetas a la transferencia horizontal, presentan una frecuencia de mutación muy baja, y porque se cuenta con una amplia base de datos disponible. Teóricamente, usando el DGGE se puede separar ADN con un par de bases de diferencia. Al secuenciar las bandas seleccionadas por el DGGE se puede obtener información acerca de microorganismos específicos.⁴⁴

ANEXO 19. Importancia de *Enterococcus* en leche y su presencia en productos lácteos.

Correspondiente a la sección: 6.2.4.1.

Al identificar las cepas de BAL aisladas en muestras de “kule naoto” -la leche fermentada tradicional de la comunidad Maasai en Kenia- se encontró que dentro de las cepas cocoides un alto porcentaje perteneció al género *Enterococcus faecium*.⁵¹

Enterococcus faecalis, *E. faecium* y *E. durans* son las especies encontradas con mayor frecuencia en los alimentos lácteos, en donde pueden tener un papel importante en la determinación del sabor y textura del queso. Las actividades proteolítica y esterolítica que algunas cepas de enterococos poseen, así como su habilidad para metabolizar el citrato, pueden contribuir a la maduración del queso y el desarrollo de sabor.⁶²

Debido a estas interesantes cualidades metabólicas, se ha propuesto que los enterococos se empleen como parte de los cultivos iniciadores en diferentes quesos europeos, como por ejemplo el queso Feta^{46, 74, 75, 76}, el Mozzarella⁸³ y el Cebreiro¹⁷.

Se han encontrado presentes en grandes cantidades en quesos tradicionales producidos en el área del Mediterráneo, hechos tanto con leche pasteurizada como cruda.^{5, 6, 36, 37, 78}

Los resultados del estudio de Madrau, Mangia et. al.⁵⁰ mostraron que la actividad fermentativa en el queso Pecorino Sardo se lleva a cabo principalmente por cocos mesófilos y termófilos, mientras que en las últimas fases de maduración predominaron los bacilos. Se

encontró la presencia de enterococos tanto en la leche como en el queso y sus cuentas incrementaron significativamente durante el periodo de maduración estudiado.

Se ha descrito, además, que es común observar la recuperación de especies de enterococos en quesos elaborados con leche cruda de oveja^{15, 58}. La presencia de *Enterococcus* spp. ha demostrado ser importante en el desarrollo de sabor durante la maduración de los quesos, a pesar de que en algunos casos también pueden ocasionar la descomposición del queso³⁶.

En el estudio de la diversidad bacteriana en el queso artesanal Pecorino Siciliano se encontró la presencia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus hirae*.⁶⁵

Además, se ha reportado que *Enterococcus faecium* se encontró presente en todas las etapas de elaboración y maduración del queso griego tradicional Feta.⁵⁵

Al estudiar la diversidad bacteriana presente en un queso suave tradicional de Marruecos se encontró también la presencia de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.⁶⁴

En el queso Tetilla se observó que una de las especies más frecuentemente encontradas fue *Enterococcus faecalis*, y se encontró también *Enterococcus faecium*.⁵⁹

ANEXO 20. Enterococcus presentes en otros alimentos fermentados. Correspondiente a la sección: 6.2.4.

En un estudio realizado para conocer la microbiota participante en la fermentación artesanal de salchichas deshidratadas producidas en Argentina se encontró la presencia de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.³⁰

Se llevó a cabo un trabajo en el que se identificaron cepas de enterococcus aisladas de una gran variedad de alimentos de origen animal, frescos y preparados. Su identificación se llevó a cabo usando pruebas bioquímicas y se encontraron cepas principalmente de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. Casi todas las cepas aisladas de quesos duros madurados y de preparaciones combinadas con queso y carne se identificaron como *Enterococcus faecium*, mientras que *Enterococcus faecalis* fue la especie más frecuente aislada de crustáceos. En carne y productos cárnicos *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* fueron menos frecuentes.²¹

ANEXO 21. Actividad de los enterococos en alimentos. Desarrollo de sabor, probióticos y producción de bacteriocinas. Correspondiente a la sección: 6.2.4.

Los enterococos presentan una mayor actividad proteolítica que otras BAL y esto se considera importante para la maduración de los quesos. El efecto benéfico de los enterococos en la elaboración de quesos también se ha atribuido a la hidrólisis de la grasa en la leche, mediante estererasas. Adicionalmente, los enterococos producen componentes saborizantes típicos, como acetaldehído, acetoina y diacetilo. El papel benéfico de los enterococos en el desarrollo de aroma en los quesos ha propiciado la inclusión de cepas de enterococos en ciertos cultivos iniciadores.⁶⁷

Muchas cepas relacionadas en la producción de queso tienen la habilidad de producir bacteriocinas en contra de patógenos o bacterias que descomponen los alimentos, por lo que ofrecen una herramienta para mejorar la calidad sanitaria del alimento.^{37, 75, 76}

Los enterococos producen una amplia variedad de péptidos antimicrobianos que se han descrito para muchas otras de las cepas de BAL y se ha descrito además la actividad de los enterococos en contra de *Cl. tyrobutyricum*.⁶⁷

Además pueden ser usados exitosamente como probióticos^{33, 39}. Tanto *E. faecalis* como *E. faecium* se han utilizado como probióticos, la cepa SF68 de *E. faecium* se ha estudiado a detalle para el tratamiento de la diarrea⁶⁷.

ANEXO 22. Presencia de *Lactobacillus pentosus* en alimentos. Correspondiente a la sección: 6.2.5.

Se ha reportado que *Lactobacillus pentosus* es responsable de la mayoría de las fermentaciones a las que son sometidas las aceitunas de mesa en su proceso de elaboración, un sector con una producción mundial de aproximadamente 1.700.000 toneladas al año.⁹⁸

Se sabe que *Lactobacillus pentosus* participa en la fermentación del Paocai, un alimento chino elaborado con col, medianamente salado y de fermentación ácido-láctica.⁸⁶

También se ha reportado que *Lactobacillus pentosus* está presente como una bacteria dominante en la población microbiana que participa en la fermentación de una bebida tradicional llamada Cauim. Esta bebida es elaborada por la tribu Tapi'itãwa o Tapirapé, en Brasil y se prepara principalmente con mandioca, además de arroz, maíz y cacahuete.³

Se aisló a *Lactobacillus pentosus* en un estudio para caracterizar y definir las propiedades bioquímicas de las BAL predominantes en mandioca fermentada de Sudáfrica, Benin, Kenia y Alemania.⁴⁵

Se realizó un estudio de la diversidad de BAL presentes en las masas para preparar los panes tradicionales Carasau, Moddizzosu, Spianata y Zichi, elaborados en Sardinia, Italia. Y se observó que *Lactobacillus pentosus* predominó en la microflora láctica en la mayoría de las muestras de masa analizadas.¹⁶

Al estudiar la microbiota presente en salchichas fermentadas, elaboradas tradicionalmente en Grecia, se observó que las BAL eran las especies dominantes al final de la fermentación, y su identificación reveló que la mayoría de los lactobacilos aislados pertenecían a las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lb. pentosus*.²⁵

La presencia de *Lactobacillus pentosus* como parte de la población de BAL aisladas durante la fermentación espontánea de las berenjenas “Almagro”.⁷⁰

Por otro lado, se ha encontrado también a *Lactobacillus pentosus* al realizar la caracterización de BAL aisladas de la materia prima cruda (pescado, arroz, ajo y hojas de plátano) con que se elabora el *som-fak*, un producto tailandés de pescado fermentado. Y se observó además que la fermentación del alimento estuvo dominada por *Lactobacillus pentosus* y *Lb. plantarum*.⁶⁵

ANEXO 23. *Lactobacillus pentosus*. Uso benéfico y producción de bacteriocinas.

Correspondiente a la sección: 6.2.5.

Una empresa japonesa, productora de bebidas, anunció un estudio realizado en el que se descubrieron propiedades únicas de la actividad de *Lactobacillus pentosus*¹⁰⁴. Los experimentos se llevaron a cabo con animales y seres humanos, para probar la efectividad de algunos productos fermentados con una cepa de *L. pentosus* (la S-PT84) elaborados con ajonjolí, soya o el alga marina konbu. Y los resultados demostraron que al ingerir estos productos fermentados se observó una activación efectiva de las células "Natural Killer", un tipo de linfocitos relacionados a las funciones inmunes, concluyendo que la actividad de esta cepa ayuda a incrementar el sistema inmune.¹⁰⁴

El Boza es una bebida tradicional fermentada con bajo contenido de alcohol, producida en Bulgaria y preparada a partir de una combinación de diferentes cereales como cebada, avena, mijo, maíz, trigo o arroz. Al identificar a las BAL que participan en su elaboración se encontró la presencia de *L. pentosus*¹². Se realizó también un estudio para detectar las BAL productoras de bacteriocinas en esta bebida y *L. pentosus* demostró esta actividad⁸⁰. Posteriormente se determinaron las condiciones necesarias para optimizar la producción de la bacteriocina producida por *L. pentosus*⁸¹ aislado del Boza.

Está reportada la producción de la bacteriocina B96 de cepas de aisladas de *L. pentosus* durante la fermentación de aceitunas verdes en salmuera. Y se considera que al conocer las condiciones adecuadas para optimizar su producción podrían usarse dichas condiciones

para favorecer la producción de la bacteriocina “in situ” y contribuir a incrementar el control microbiológico del proceso de elaboración de aceitunas.²¹

De un jamón fermentado tradicional chino, llamado Xuan-Wei, se ha aislado a *Lactobacillus pentosus* y se ha estudiado su capacidad para producir una bacteriocina, denominada “pentocina 31-1”, con una gran capacidad antimicrobiana, activa contra bacterias Gram positivas, incluyendo a *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Escherichia* spp.^{47, 87}.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Adams, M. R., Moss, M. O. (2000) **Food Microbiology**. 2nd ed. Royal Society of Chemistry. UK. pp. 318-324.
- 2 Alais Ch. (1985) "Ciencia de la leche". **Principios de técnica lechera**. 4^a edición. Ed. Reverté. S.A. España. pp. 332, 763-764.
- 3 Almeida, Euziclei G., Rachid, Caio C.T.C., Schwan, Rosane F. (2007) *Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians*. **International Journal of Food Microbiology**, 120, No. 1-2, 146-151.
- 4 Álvarez, Rubén B., Barragán, Esteban L. y Chombo, Patricia M. (2005) **Reglas de uso Marca Colectiva**. Queso Cotija Región de Origen. México.
- 5 Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., & Dellaglio, F. (2001). *Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses*. **Journal of Dairy Research** 68, 303–316.
- 6 Andrighetto, C., Zampese, L., & Lombardi, A. (2001). *RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy)*. **Letters in Applied Microbiology** 33, 26–30.
- 7 Asociación Regional de Productores de Queso Cotija. Tríptico informativo.
- 8 Barragan, Esteban. (2005) *Proyecto Tepalcatepec (CER) Obtención de la Marca Colectiva del queso Cotija En Redes*. Publicación bimestral, año 1, núm. 6, Zamora, Michoacán. México.
- 9 Becerril, Luis Antonio. (2007) **Estudio de la patogenicidad de cepas de Streptococcus y Enterococcus aislados de pozol procedente del sureste de la**

República Mexicana. Tesis de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.
Facultad de Química. UNAM.

- 10 Beliard, E. Thuault, D. (1995) En: Bourgedis, C. M., Larpent, J. P. **Microbiología Alimentaria. Vol. II. Fermentaciones alimentarias.** España. pp 309-321.
- 11 Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L. and Cogan T. M. (2001) *Recent advances in cheese microbiology.* **International Dairy Journal** 11, 259-274.
- 12 Botes, Angela, Todorov, Svetoslav D., Mollendorff, Johan W. von, et. al. (2007) *Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza.* **Process Biochemistry**, Vol. 42, No. 2, 267-270.
- 13 Brown, M. H. y Emberger, O. (1980) En: **Ecología Microbiana de los Alimentos, Vol. 1.** International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Ed. Acribia. España.
- 14 Byong H. Lee. (2000) **Fundamentos de Biotecnología de Alimentos.** Ed. Acribia. España. pp. 239-246.
- 15 Caridi, A. (2003). *Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro.* **International Journal of Dairy Technology** 56 (2): 105-110.
- 16 Catzeddu, Pasquale, Mura, Enrica, Parente, Eugenio, et. al. (2006) *Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results.* **Systematic and Applied Microbiology**, Vol. 29, No. 2, 138-144.
- 17 Centeno, J. A., Cepeda, A., & Rodríguez-Otero, J. L. (1995). *Identification and preliminary characterization of strains of enterococci and micrococci isolated from Arzua raw cow's-milk cheese.* **Nahrung** 39, 55-62.

- 18 Champagne, Claude P., Goulet, Jaques (1991) En : Brochu É., Dumais R., Julien J., et. al. **Ciencia y Tecnología de la Leche. Principios y Aplicaciones.** Ed. Acribia. España. pp. 81, 84-85.
- 19 Cogan, T. M., Barbosa M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli P. S, et. al. (1997) *Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products.* **Journal of Dairy Research** 64, 409-421.
- 20 Corlett, D. A. JR., y Brown, M. H. (1980) En: **Ecología Microbiana de los Alimentos, Vol. 1.** International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) Ed. Acribia. España.
- 21 Delgado, Amélia, Brito, Dulce, Peres, Cidália. (2005) *Bacteriocin production by Lactobacillus pentosus B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration.* **Food Microbiology**, Vol. 22, No. 6, 521-528.
- 22 Devriese, Luc A., Pot, Bruno, Van Damme, Luc. et. al. (1995) *Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin.* **International Journal of Food Microbiology** 26, 187-197.
- 23 Dilanjan, Sawen C. (1984) **Fundamentos de la Elaboración del Queso.** Ed. Acribia. España. pp. 94-99.
- 24 Domig, Konrad J., Mayer, Helmut K., Kneifel, Wolfgang. (2003) *Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of Enterococcus spp. 2. Pheno- and genotypic criteria.* **International Journal of Food Microbiology** 88, 165-188.
- 25 Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., et. al. (2005) *Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage.* **Meat Science**, Vol. 69, No. 2, 307-317.

- 26 Estrada, Cindy A. M. (2006) **Comparación de técnicas para cuantificar microorganismos coliformes y determinación de la calidad microbiológica en quesos artesanales.** Proyecto final de Labdea, Facultad de Química, UNAM.
- 27 Farfas, M.E., de Ruiz Holgado, A.A.P. y Sesma, F. (1994) *Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens.* **Journal of Food Protection** 57, 1013-1015.
- 28 Feltham, R. K. A., Power, Annet K., Pell, Patricia A. and Sneath, P. H. A. (1978) *A Simple Method for Storage of Bacteria at -76 °C.* **Journal of Applied Bacteriology** 44, 313-316.
- 29 Fennema Owen R. (1996) **Food Chemistry.** Third edition. Marcell Deker Inc. USA, p. 42.
- 30 Fontana, Cecilia, Cocconcelli, Pier Sandro, Vignolo, Graciela. (2005) *Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages.* **International Journal of Food Microbiology** 103, 131– 142.
- 31 Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati A., et. al. (2003) *Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese.* **Food Microbiology** 20, 397–404.
- 32 Fox F. Patrick. et.al. (2000) **Fundamentals of Cheese Science.** Aspen Publication. USA, pp. 153-154, 163-164, 206-209,236-237,537.
- 33 Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003) *Enterococci in foods, a conundrum for food safety.* **International Journal of Food Microbiology** 88, 105-122.

- 34 García, G. M., Revah, S.M, Gómez, R.L., (2004) *Productos Lácteos*. En: López-Munguía C. A., et. al. Compiladores. **Bioteología Alimentaria**. Ed. Limusa. México. pp. 179-193.
- 35 García, Verónica. (2006). **Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- 36 Giraffa, G., Carminati, D., & Neviani, E. (1997). *Enterococci isolated from dairy products: A review of risk and potential technological use*. **Journal of Food Protection** 60, 732–738.
- 37 Giraffa, G. (2003). *Functionality of enterococci in dairy products*. **International Journal of Food Microbiology** 88, 215–222.
- 38 Giraffa, G., Olivari, A. M., & Neviani, E. (2000). *Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses*. **Food Microbiology** 17, 671–677.
- 39 Hardie, J. M., Whiley, R.A. (1997) Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology** 83 (s1), 1S–11S.
- 40 Hernández, Nayeli. (2006). **Estudio de cepas proteolíticas aisladas de queso Cotija**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- 41 Hernández, Verónica. (2006). **Comparación de la composición química de diversas muestras de queso Cotija**. Proyecto final de Labdea, Facultad de Química, UNAM.
- 42 Jay, James M., Loessner, Martin J., Golden, David A. (2005) **Modern Food Microbiology**. 7th ed. Food Science Text Series. USA pp. 476-484.
- 43 Jones, D., Pell, P. A., and Sneath, P. H. A. (1991) *Maintenance of Bacteria on Glass Beads at -60 °C to -76 °C*. En: B. E. Kirsop, A. Doyle. **Maintenance of**

- microorganisms and cultured cells. A Manual of Laboratory Methods.** 2nd Ed. Academic Press Limited. UK. pp. 45-50.
- 44 Kirk, Jennifer L., Beaudette, Lee A., Hart, Miranda, et. al. (2004) *Methods of studying soil microbial diversity.* **Journal of Microbiological Methods** 58, 169-188.
- 45 Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Pinto, C., et al. (2007) *Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures.* **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 114, No. 3, 342-351.
- 46 Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., & Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. (1993). *Effect of type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of Feta cheese.* **Food Microbiology** 10, 31–41.
- 47 Liu, Guorong, Lv, Yanni, Li, Pinglan, et. al. (2007) *Pentocin 31-1, an anti-Listeria bacteriocin produced by Lactobacillus pentosus 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product.* **Food Control**, In Press, Corrected Proof, Available online 1 May 2007
- 48 Lowe, Peter, Engler, Catherine, Norton Robert. (2002) *Comparison of Automated and Nonautomated Systems for Identification of Burkholderia pseudomallei.* **Journal of Clinical Microbiology** Vol. 40 No. 12, 4625–4627.
- 49 Madigan, Michael T., Martinko, John M., Parker, Jack. (2006) **Brock Biology of Microorganisms.** 11th edition. Pearson Prentice Hall, USA.
- 50 Madrau, M.A., Mangia, N.P., Murgia, M.A., et. al. (2006) *Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of*

- physicochemical parameters during ripening. International Dairy Journal* 16, 876–885.
- 51 Maina, Julius M., Schillinger, Ulrich, Museve Phillip K., et. al. (2004) *Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. International Journal of Food Microbiology* 94, 269– 278.
- 52 Manero, Albert y Blanch, Anicet R. (1999) *Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key. Applied and Environmental Microbiology* 65, 4425–4430.
- 53 Manero, Albert, Blanch, Anicet R. (2002) *Identification of Enterococcus spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes. Journal of Microbiological Methods* 50, 115– 121.
- 54 Mannu, Luisa, Comunian, Roberta, Scintu Maria Francesca. (2000) *Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. International Dairy Journal*, Vol. 10, No. 5-6, 383-389.
- 55 Manolopoulou, Eugenia, Sarantinopoulos, Panagiotis, Zoidou, Evagelia, et. al. (2003) *Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. International Journal of Food Microbiology*, Vol. 82, No. 2, 153-161.
- 56 Marilley L., Casey M. G. (2004) *Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. International Journal of Food Microbiology* 90, 139– 159.
- 57 Martorell Guerola, Patricia. (2006) **Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de**

- alimentos.** Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología y Ecología. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions. España.
- 58 Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S., Oliver, G. (2001). *Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina.* **Journal of Food Protection** 64 (4): 559–563.
- 59 Menéndez, S., Godínez, R., Centeno, J. A., Rodríguez-Otero, J. L. (2001) *Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' rawcowsmilk cheese.* **Food Microbiology** 18, 151 -158.
- 60 Mc Faddin, Jean F. (2003) **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- 61 Montville, T.J. y Winkowski, K. (1997). *Biologically based preservation systems and probiotic bacteria.* En: **Food microbiology, fundamens and frontiers.** Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (Eds). ASM Press, Washington, D.C. pp. 557-577.
- 62 Morandi, Stefano, Brasca, Milena, Andrighetto, Christian, et. al. (2006) *International Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products.* **Dairy Journal** 16, 867–875.
- 63 Muyzer, Gerard. (1999) *DGGE / TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.* **Current Opinion in Microbiology** 2, 317-322.
- 64 Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., Swings, J. (2005) *Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben).* **FEMS Microbiology Letters** 251, 267–271.

- 65 Paludan-Müller, Christine, Huss, Hans Henrik, Gram, Lone. (1999) *Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. International Journal of Food Microbiology*, Vol. 46, No. 3, 219-229.
- 66 Randazzo, Cinzia L., Vaughan, Elaine E. and Caggia, Cinzia. (2005) *Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. International Journal of Food Microbiology* Vol. 109, issues 1-2, p 1-8.
- 67 Roginski, Hubert, Fuquay, John W., Fox, Patrick F. (2003) **Encyclopedia of Dairy Sciences. Vol. II.** Academic Press. USA. pp. 900-901.
- 68 Salama, Maysoon, Sandine, William, Giovannoni, Stephen. (1991). *Development and Application of Oligonucleotide probes for Identification of Lactococcus lactis subsp. cremoris. Applied and Environmental Microbiology* 57 (5): 1313-1318.
- 69 Salminen, Seppo, Wright, Atte von. (1998) **Lactic Acid Bacteria. Microbial and Functional Aspects.** 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. USA.
- 70 Sánchez, Isabel, Seseña, Susana, Palop, Llanos. (2003) *Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. International Journal of Food Microbiology*, Vol. 82, No. 2, 181-189.
- 71 Sánchez, Isabel, Seseña, Susana, Poveda, Justa M., et. al. (2005) *Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. International Journal of Food Microbiology* 102, 355– 362.
- 72 Sánchez, Isabel, Seseña, Susana, Poveda, Justa M., et. Al. (2006) *Genetic diversity, dynamics, and activity of Lactobacillus community involved in traditional*

- processing of artisanal Manchego cheese* **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 107, No. 3, 265-273.
- 73 Santos, M. Armando y Villegas de Gante, Abraham. (1997) *El Queso Cotija, Propuesta para su Fabricación a Partir de Leche Pasteurizada, Lácteos y Cárnicos Mexicanos* 12 (3): 7-11.
- 74 Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2001). *Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance*. **International Dairy Journal** 11, 621–647.
- 75 Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2002). *Effect of Enterococcus faecium on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese*. **International Journal of Food Microbiology** 76, 93–105.
- 76 Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2002). *Bacteriocin production by Enterococcus faecium. FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making*. **International Journal of Food Microbiology** 72, 125–136.
- 77 Scott, R. (2002) **Fabricación de queso**. 2ª Edición. Ed. Acirbia. España. pp. 21, 24, 26-28, 106-107.
- 78 Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Andrighetto, C., & Lanorte, M. T. (2000). *A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino)*. **Journal of Applied Microbiology** 89, 267–274.
- 79 **The OXOID Manual**. (1990) 6th Ed. Alphaprint, Alton, Hants. United Kingdom.

- 80 Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2006) *Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocinas*. **Process Biochemistry**, Vol. 41, No. 1, 11-19.
- 81 Todorov, Svetoslav D., Dicks, Leon M.T. (2007) *Bacteriocin production by Lactobacillus pentosus ST712BZ isolated from boza*. **Brazilian Journal of Microbiology** 38, 166-172.
- 82 Vanderzant, Carl. Splittstoesser, F. Don. (1992) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3rd edition. APHA. USA.
- 83 Villani, F., & Coppola, S. (1994). *Selection of enterococcal strains for water-buffalo mozzarella cheese manufacture*. **Annali di Microbiologia e Enzimologia** 44, 97-105.
- 84 Webb, Byron H., Johnson, Arnold H., Alford, John A. (1978) **Fundamentals of Dairy Chemistry**. 2nd ed. The Avi Publishing Company, Inc. USA. pp. 73-81, 779-783.
- 85 Wilderdyke, M. R., Smith, D. A. and Brashears, M. M. (2004) *Isolation, Identification, and Selection of Lactic Acid Bacteria from Alfalfa Sprouts for Competitive Inhibition of Foodborne Pathogen.*, **Journal of Food Protection** Vol. 67, No. 5, 947-951.
- 86 Yan, Ping-Mei, Xue, Wen-Tong, Tan, Sze-Sze, et. al. (2008) *Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai*. **Food Control**, Vol. 19, No. 1, 50-55.
- 87 Zhou, Kang, Zhou, Wei, Li, Pinglan, et. al. (2007) *Mode of action of pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocin produced by Lactobacillus pentosus from Chinese*

traditional ham. Food Control, In Press, Corrected Proof, Available online 15 August 2007

- 88 **Zuñiga, Berenice. (2006). Caracterización de bacterias ácido lácticas en el queso Cotija por métodos moleculares.** Cuarto tutorial del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.

NORMAS CONSULTADAS:

- 89 CODEX-STAN-A-006-1978. Norma General del CODEX para el queso. Rev.1-1999.
- 90 NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- 91 NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- 92 NOM-111-SSA1-1994 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- 93 NOM-112-SSA1-1994 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- 94 NOM-121-SSA1-1994. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados.
- 95 NMX-F-092-1970. Calidad para quesos procesados.
- 96 NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados.
- 97 NMX-F-206-1986. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo.

FUENTES DE INTERNET

- 98 Arroyo, Francisco N. López, Durán, M. del Carmen Quintana, Garrido, Antonio Fernández. (2006) *Diseño D-óptimo para modelar los efectos de la temperatura, NaCl y de ácidos sobre el crecimiento de L. pentosus IGLAC01*. [en línea] Publicado: 2006 [consultado agosto 2007]. **I Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria**. “De la granja a la mesa, ida y vuelta” CIBSA 2006. Disponible en: <http://redsicura.iata.csic.es/xarxa/ocs/viewabstract.php?id=7&cf=1>
- 99 Cortés, José A. *BHI, Agar*. [en línea] Publicado: 2001, actualizado: 29 septiembre 2005 [consultado 3 junio 2007]. **Recursos didácticos para Biología**. Ensayos microbiológicos. Buscador medios de cultivo para Microbiología. Disponible en: <http://www.joseacortes.com/microbiologia/buscamedios/ficha.php?nombre=BHI,%20Agar>
- 100Lima, Julio. *Potencial de Óxido – Reducción*. [en línea] H. von der Becke, C., Motto, A. Mar del Plata, Argentina. Publicado: 19 mayo 1999, actualizado: 9 febrero 2002 [consultado 24 nov. 2005]. Apuntes de estudio de la asignatura “**Procesos de la Industria de los Alimentos**”, “**Principales Variables de la Tecnología Alimentaria**”. Glosario de Bioingeniería del Conocimiento. Disponible en: <http://www.geocities.com/ohcop/poteoxre.html>
- 101Lima, Julio. *pH y acidez*. [en línea] H. von der Becke, C., Motto, A. Mar del Plata, Argentina. (op. cit) Disponible en: www.geocities.com/ohcop/pehachey.html
- 102Orbera Raton, Teresa de los Milagros. **Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos**. *Revista Cubana de Salud Pública*. [en línea] julio-septiembre 2004,

vol. 30, no. 3 [consultado 17 Agosto 2007], Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000300016&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0864-3466.

103 Secretaría de Economía. *Catálogo* [en línea] de Normas Oficiales Mexicanas y Normas Mexicanas [consultado 20 sep 2005] Disponible en <<http://www.economia-noms.gob.mx/>>

104 *Suntory Confirms That Lactobacillus Pentosus S-PT84 Boosts Immune System* [en línea] Publicado: 31 Marzo 2005 [consultado 28 Agosto 2007]. **Medical News Today**, Disponible en: <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/22063.php>>