



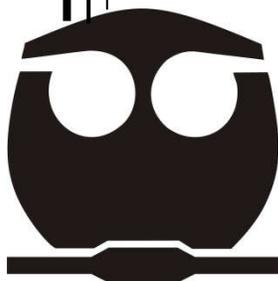
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS
FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE
TRES MUESTRAS DE "QUESO DE PORO" E
IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS
PRESENTES EN LAS MISMAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A
DIANA KARINA ZAMORA CHÁVEZ



MÉXICO, D.F.

2011



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	MARIA ELENA CAÑIZO SUÁREZ
Vocal	BEATRIZ DE GUADALUPE SERRANO LÓPEZ
Secretario	JOSÉ MARIANO GARCÍA GARIBAY
1er. Suplente	AURORA IRMA ORTEGON AVILA
2do. Suplente	ALEIDA MINA CETINA

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biotecnología Alimentaria, Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Iztapalapa).

Asesor
Dr. José Mariano García Garibay

Supervisor Técnico
Dra. Judith Jiménez Guzmán

Sustentante
Diana Karina Zamora Chávez

DEDICATORIAS

A MIS PAPÁS:

Porque siempre me han apoyado en las buenas y en las malas, siempre están ahí, para regañarme, animarme o felicitar me, se que por más errores y caídas que tenga en mi vida nunca me van a dejar sola.

A MI MAMÁ: ANGELES CHÀVEZ LAGUNA

Por esforzarte TANTO por mi, por asistir a mis festivales, por cuidarme cuando me enfermo, por dar todo tu tiempo y sueños por mi, sin importar lo que tengas que hacer siempre estas ahí.

A MI PAPÁ: ADOLFO ZAMORA BRINGAS

Por esforzarte TANTO trabajando para darnos una vida mejor de que la que tuviste, por ayudarme con las materias que se me dificultaran a lo largo de mis estudios, por que aunque estés cansado siempre tienes tiempo para mi y gracias por estar en todo momento pendiente de mi.

A MIS HERMANOS JORGE Y GUADALUPE:

Porque estuvieron en todo momento para pelear, reír y disfrutar los momentos que hacen especial nuestra relación. Siempre están para lo que necesito y me ayudan en muchas cosas, que no me da tiempo de hacer.

A JUAN ANTONIO DE LOS SANTOS GONZÁLEZ

Por que desde hace mucho tiempo estas con migo, pero hace poco decidimos formar una nueva familia, ahora nos cuidas y te esfuerzas por nosotros todos los días, por mas cansado que estés trabajas mucho y tratas de acompañarnos en todo momento gracias por compartir todos los momentos especiales con nosotros.

Por lo anterior doy gracias a dios, por la maravillosa familia que me toco, porque con sus defectos y virtudes me ayudaron a llegar a donde estoy y se que siempre puedo contar con ella.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos que me acompañaron y ayudaron desde el inicio de la carrera, y aunque no son QA's estuvieron ahí siempre.

- **QFB. Lourdes Julián de la Cruz** gracias por ser mi mejor amiga y estar siempre cuando tengo un problema, para ser dama de honor o simplemente para platicar y compartir buenos momentos.
- **QFB. Edgar Hernandez García**, gracias por estar ahí cuando necesite ayuda de alguien.
- **IQ y Q. Arturo Pozos Hernandez** A ti te agradezco el tenerme TANTA paciencia con operaciones y cálculos matemáticos que no entendía y por tomarte el tiempo para explicarme cada uno de ellos hasta que los comprendiera.

A **Raquel Gonzales Vazquez** que no estuvo desde el inicio de la carrera conmigo pero me ayudo a hacer mas liviana y fácil la estancia en la Facultad con sus ocurrencias.

Gracias al **Dr. Francisco José Fernández Perrino** por que sin conocerme fue paciente y dedico su tiempo a enseñarme a trabajar con el ADN.

Por su asesoría a:

Dr. José Mariano García Garibay

Dra. Judith Jiménez Guzmán

A los miembros del jurado:

Presidenta: **María Elena Cañizo**

Vocal: **Beatriz de Guadalupe Serrano López.**

Por tomarse el tiempo en leer mi tesis y brindarme la oportunidad de presentarla.

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES	6
3.1 Queso de Poro	6
3.1.1 Elaboración de “queso de Poro”	8
3.2. Leche	10
3.2.1 Propiedades Físicas	11
3.2.2 Propiedades Químicas	11
3.3 Queso	13
3.3.1 Clasificación	15
3.3.2 Elaboración de queso	16
3.3.3 Microbiología del queso	17
3.3.3.1 Microorganismos en el queso	18
3.3.3.2 Alteraciones microbiológicas en quesos	23
3.3.3.3 Proteólisis, lipólisis y glucólisis	27
3.3.3.3.1 Proteólisis	28
3.3.3.3.2 Lipólisis	35
3.3.3.3.3 Glucólisis	37
3.3.4 Enzimas	39
3.3.5 Formación de ojos	42
3.4 Identificación molecular	44
3.4.1 Fundamentos de la aplicación de de r ARN´s en hongos	45

3.4.1.1 Organización estructural de los genes de r ADN	47
3.4.2 Extracción y purificación del ADN	48
3.4.3 Amplificación (Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR))	49
3.4.4 Detección de DNA	51
3.4.5 Determinación de la secuencia del ADN	53
3.4.6 Identificación de Levaduras	55
4 OBJETIVOS	57
4.1 Objetivo General	57
4.2 Objetivos Particulares	57
5 MATERIALES Y MÉTODOS	58
5.1. Caracterización Fisicoquímica	58
5.1.1 Determinación de Acidez	58
5.1.2 Determinación de la Actividad acuosa (Aw)	59
5.1.3 Determinación de Proteína	59
5.1.3.1 Determinación de Proteínas Totales (Extracción con UREA) ...	59
5.1.3.2 Determinación de Proteínas Solubles (método de extracción con citratos)	60
5.1.3.3 Determinación de Proteína método de Lowry	60
5.1.4 Determinación de Humedad (Método gravimétrico)	61
5.1.5 Determinación de Grasa.	62
5.2 Caracterización Microbiológica.	63
5.2.1 Preparación de la muestra para su análisis	63
5.2.2 Cuenta de Microorganismos (bacterias lácticas, coliformes totales, mesófilos aerobios, anaerobios, hongos y levaduras)	63

6.4 Identificación de las levaduras	87
6.4.1 Extracción del ADN	87
6.4.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	89
6.4.3 Purificación del ADN	90
6.4.4 Cepas identificadas	91
6.4.4.1 Queso Usumacinta	91
6.4.4.2 Queso Teresita	95
6.4.4.3 Queso Tigre	100
6.4.4.4 Comparación de Microorganismos Presentes en las tres muestras de queso	104
7. CONCLUSIONES	109
8. PERSPECTIVAS	110
9. APÉNDICE	111
10. BIBLIOGRAFÍA	116

1. RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron tres muestras comerciales de “Queso de Poro” provenientes del estado de Tabasco, las cuales fueron: Queso Teresita, Queso Usumacinta y Queso Tigre. A estas muestras se les efectuaron los siguientes análisis fisicoquímicos: acidez, A_w , humedad, grasa y proteína, así como las determinaciones microbiológicas correspondientes. Esto se realizó para establecer las características propias de las muestras de “Queso de Poro”.

Entre los resultados obtenidos se observó que las muestras presentaron bajos valores de acidez (queso Usumacinta 0.32, queso Teresita 0.47, queso Tigre 0.58) esto sugiere que la flora existente en estos quesos son levaduras, ya que estos microorganismos metabolizan el ácido láctico.

De acuerdo a la determinación de humedad del extracto magro podemos concluir que los quesos Usumacinta y Teresita podrían clasificarse como quesos semiduros ya que poseen humedad de 57.95% y 58.91% respectivamente, en cambio la muestra de queso Tigre podría clasificarse como un queso duro con una humedad de 48.96%, la causa de que las muestras tengan un contenido de humedad diferente puede deberse a que el proceso con el cual se produce el “Queso de Poro” no se encuentra estandarizado y dependiendo del productor varía el tiempo en que se corta la cuajada, tiempo y temperatura de almacenamiento, tipo de desuerado, dando lugar a la variación de la cantidad de suero retenida en el queso.

Referente a la determinación de grasa del extracto seco (queso Usumacinta 57.23%, Teresita 52.52%, Tigre 59.88 %) y de acuerdo con lo descrito en la literatura se sugiere clasificar al “queso de Poro” como un queso súper graso.

En cuanto a la determinación de proteína en extracto seco se observa que las muestras contienen entre 42.31% y 50.07%, esto es de gran importancia debido a que las proteínas son un sustrato para la proteólisis que ocurre durante la maduración mediante la cual se generan compuestos participes en el sabor y olor del queso.

Con respecto a la actividad acuosa (A_w) los valores de las muestras de queso se encuentran entre 0.94 y 0.96, estos favorecen el crecimiento de bacterias y levaduras, lo cual también es muy importante para el desarrollo de olores y sabores característicos del queso. Por otra parte, también se determinaron mesófilos aerobios, mesófilos anaerobios, bacterias psicrotróficas, coliformes totales, bacterias lácticas, hongos y levaduras. Los resultados de las cuentas de hongos y levaduras se compararon con las especificaciones de la NOM-121-SSA1-1994 para quesos, encontrándose que las cuentas de éstos se encuentran muy por encima de los límites permitidos. Las determinaciones de los mesófilos aerobios, mesófilos anaerobios, coliformes totales, bacterias lácticas, bacterias psicrotróficas, se realizaron para caracterizar dichas muestras. En el caso de las bacterias psicrotróficas, no se observó crecimiento; esto se puede deber al hecho de que en el estado de Tabasco donde se produce el “Queso de Poro” la temperatura ambiente es alta, alrededor de 32°C y estas bacterias no tienen las condiciones óptimas para crecer.

Las levaduras que se lograron aislar en las tres muestras de queso se sometieron a una identificación molecular; con esto se logró identificar 15 de las 20 levaduras aisladas. Entre las especies identificadas se encontraron levaduras del género *Candida* (*Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*); levaduras

del género *Kodamaea*, *Kluyveromyces* y *Debaryomyces*. A las levaduras aisladas se les determinaron propiedades lipolíticas y proteolíticas; sólo una de las cepas del género *Saccharomyces* presentó actividad proteolítica, pero no se logró identificar la especie; el resto de las levaduras aisladas solamente presentaron actividad lipolítica, lo cual es de gran importancia para el desarrollo del sabor y olor en las muestras de queso estudiadas.

2. INTRODUCCIÓN

En México existen más de 30 variedades regionales de quesos que no son conocidas, por lo que la mayoría de la población no valora sus cualidades nutricionales, debido a que no existe una investigación que las rescate de su confinamiento regional antes de que puedan desaparecer totalmente.

Debido a que buena parte de estos quesos se elaboran con leche “bronca” (sin pasteurizar) no son totalmente inocuos. Por lo tanto, se debe pugnar para que los quesos mexicanos genuinos se produzcan a través de procesos estandarizados que garanticen inocuidad, cuidando no afectar las características organolépticas que dan origen a estos productos.

El “Queso de Poro”, originario del estado de Tabasco es denominado con este nombre porque durante su maduración se forman unos pequeños poros en la pasta del queso y es uno de los quesos más populares de la zonas aledañas al municipio de Balancán por sus características de sabor y aroma, las cuales son generadas mediante un peculiar proceso de elaboración, pues para elaborar este queso se emplea leche bronca, inoculada con el suero del día anterior; cabe mencionar que durante este proceso no se contempla la refrigeración. La maduración completa de este queso comprende por tradición dos semanas, aunque en ocasiones presenta una maduración adicional por el retraso en su distribución. La primer semana consta del salado por frotación, después de este proceso el queso se cubre con un capa de cera; la segunda semana se deja madurar dos días, el tiempo restante es el de transportación a Villahermosa, ya que en aquellas épocas (años 40) el viaje de Balancán a Villahermosa duraba 3 días en barco por el río.

Los productores de “Queso de Poro” del estado de Tabasco buscan obtener la denominación de origen para dicho queso, pero debido a que este producto es elaborado con leche bronca no está contemplado en la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, es por ello que mediante este trabajo de investigación se realizó la caracterización microbiológica e identificación de las levaduras presentes en el “Queso de Poro” de tres marcas comerciales de gran distribución en la región, con el fin de investigar si levaduras específicas pudieran emplearse como inóculo en la elaboración del queso utilizando leche pasteurizada. Para ello se emplearon las técnicas microbiológicas clásicas (Cuentas en placas con agar), así como técnicas de biología molecular (Identificación de ADN), se evaluaron las propiedades proteolíticas y lipolíticas de las cepas aisladas para saber de esta manera cuales son las que contribuyen a la maduración del queso y si estas son inocuas para el consumidor, por lo tanto, podrían ser útiles como inóculo en un queso elaborado con leche pasteurizada.

También se considero importante la caracterización fisicoquímica de las muestras determinando humedad, grasa, Aw, acidez y proteína.

3. ANTECEDENTES

3.1 Queso de Poro

El “Queso de Poro” es un queso fresco o ligeramente madurado, elaborado con leche entera cruda de vaca.

Popularmente se le conoce como “Queso de Poro”, ya que durante su maduración se forman unos pequeños poros en la pasta del queso. A menudo experimenta una maduración involuntaria y no controlada adicional por la tardanza de su distribución y comercialización.

Se presenta al mercado en piezas pequeñas, con un peso que oscila entre 150g y 1kg. Las piezas vienen parafinadas (parafina transparente) y envueltas en papel amarillo, bajo el cual luce su etiqueta.

El “queso de Poro” es un producto regional que se elabora en la zona de los ríos del estado de Tabasco (figura 1); concretamente en los municipios de Balancán, Tenosique y Emiliano Zapata (figura 2). En su fabricación se emplean leche de ganado cruzado cebú- pardo suizo (Rodríguez, 2007).



Figura 1: Ubicación del Estado de Tabasco (color anaranjado) en la República Mexicana



Figura 2. Localización de Balancán, Tenosique y Emiliano Zapata (color gris) en el estado de Tabasco

3.1.1 Elaboración del “Queso de Poro”

Los pasos en la elaboración del queso son:

1. Adición de suero (ácido) del día anterior sin refrigeración a la leche cruda, este sirve como inóculo.
2. Fermentación durante toda la noche a temperatura ambiente (coagulación ácida).
3. Cortado y desuerado de la cuajada, se coloca en unos moldes de desuerado y se escurren durante 24 h. a temperatura ambiente.
4. Moldeado, se efectúa en moldes de madera rectangulares, durante esta etapa el queso se hincha y desborda, los sobrantes se cortan.
5. Prensado, se lleva a cabo en un molde diferente empleando prensas rústicas de madera resistente o piedras, aquí el queso tarda 24 h.
6. Desmoldado y salado por frotación, que consiste en frotar la superficie de los quesos con sal cristalina uniformemente. El salado se realiza tres veces durante cinco días, alternados. Durante el salado el queso se orea y eso es parte del proceso de maduración.
7. Madurado, este proceso dura 2 días.
8. Parafinado, se lleva a cabo sumergiendo las piezas de queso, previamente lavadas y oreadas, en un baño de parafina blanca fundida. El objeto es formar una barrera contra la deshidratación del producto y la invasión de mohos. Una vez parafinado el queso, en ocasiones, se madura una semana más.
9. Empacado, el queso parafinado se envuelve en papel celofán amarillo, debajo se coloca una etiqueta de identificación comercial.
10. Distribución del “queso de Poro”.

Durante la elaboración del “Queso de Poro; Existen diversos procesos que le confieren características propias. (Diagrama 1)

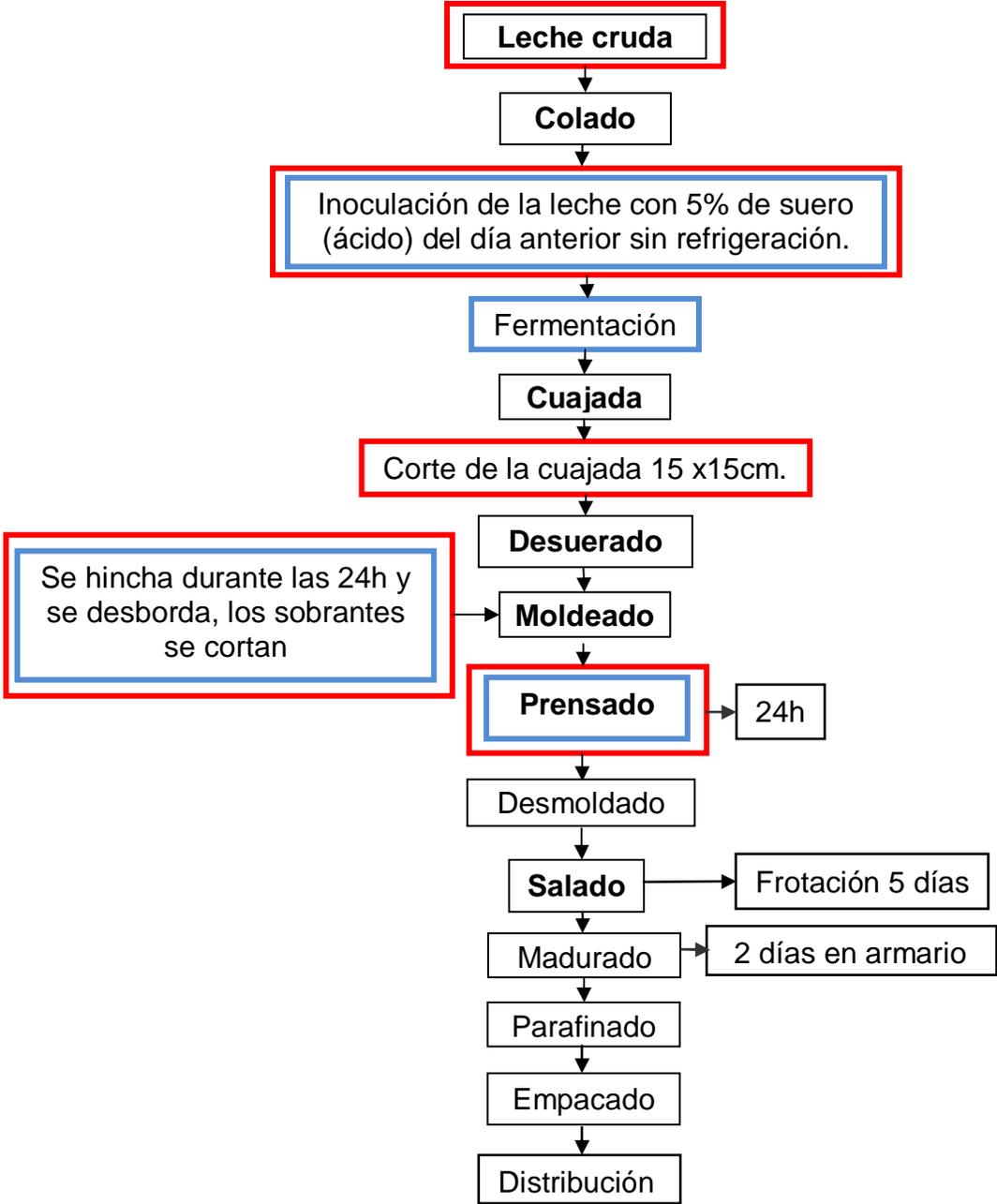


Diagrama 1: Elaboración del “Queso de Poro”. Principales puntos que le confieren al queso sus características (cuadros azules) y puntos en los que el queso (producto) pierde inocuidad (cuadros rojos).

El “Queso de Poro” se comercializa a los pocos días de producido; sin embargo, por problemas de distribución puede ocurrir que su venta se retarde varias semanas; durante ese tiempo la pasta del queso continúa el proceso de maduración.

3.2 Leche

Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor ligeramente dulce y pH casi neutro. Esta sustancia es segregada por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, poco después del calostro, cuando nace la cría (Santos, 1991). La leche es un alimento diseñado para las crías recién nacidas y contiene, en una forma fácilmente absorbible, todos los nutrientes y agentes activos que el recién nacido necesita para el crecimiento y el mantenimiento corporal. La composición de la leche es por tanto característica para cada especie y por lo tanto diferente entre ellas (Buchheim y Shlimme, 2002).

Los principales factores que influyen sobre la composición y propiedades de la leche de vaca son:

- ❖ Factores genéticos como la especie, raza.
- ❖ Factores fisiológicos como la fase de lactación, la edad de la vaca, el número de lactaciones y la gestación.
- ❖ Los estados patológicos, en especial la mastitis.
- ❖ Factores ambientales y de manejo, como la alimentación, el clima, el sistema de ordeño, etc. (Walstra, 2001).

3.2.1 Propiedades Físicas:

Aspecto: La leche fresca normalmente presenta una coloración blanca aporcelanada; sin embargo, cuando es muy rica en grasa adquiere una coloración ligeramente amarilla debido al caroteno contenido en la grasa de la leche de vaca. La leche pobre en grasa o descremada es de tono ligeramente azulado.

Olor: La leche fresca prácticamente es inodora, pero debido a la presencia de grasa, ésta conserva con facilidad los olores del ambiente o de los recipientes que la contienen. El proceso de acidificación le da un olor especial, muchas veces a “establo” o heces de vaca, fundamentalmente por el desarrollo de bacterias coliformes.

Sabor: La leche fresca y limpia tiene un sabor ligeramente dulce y neutro por la lactosa que contiene, aunque fácilmente adquiere sabores a establo, hierba, etc. (Keating, 1999).

3.2.2 Propiedades Químicas:

Una vez ocurrido el parto, la vaca secreta a través de la glándula mamaria diversas sustancias. Durante los primeros dos o tres días produce calostro, que es un líquido con un alto contenido de sólidos (proteínas, grasa, carbohidratos), de olor fuerte y sabor amargo, abundante en inmunoglobulinas, (las cuales fortalecen el sistema inmunológico del becerro). La composición promedio del calostro es: 79% de agua, 10% de proteínas, 7% de grasa, 3% de lactosa y 1% de cenizas. Por su gran proporción de inmunoglobulinas el calostro es sumamente sensible a la

desnaturalización térmica. Pasando este período, el animal sintetiza propiamente la leche durante toda la lactancia que varía de 180 a 300 días (depende de varios factores como la época del año, número de parto, alimentación, zona geográfica, raza, etc.), con una producción media diaria de 3 a 25 litros (vacas que pastorean, sin atención médica ó vacas estabuladas en buenas condiciones de salud y de alimentación, respectivamente). La leche se sintetiza fundamentalmente en la glándula mamaria, pero una parte de sus constituyentes también proviene del suero de la sangre.

En general, la leche está constituida por agua, grasa, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, además de otras sustancias que están presentes en menor concentración y que en conjunto forman un sistema fisicoquímico estable (Tabla 1). Los sólidos totales representan del 11 al 15 % de su composición y varían de acuerdo con diversos factores, como la raza y edad de la vaca, tipo y frecuencia de alimentación, estado de lactación, enfermedades, temperatura ambiente, época del año, hora del día de la ordeña, etc. (Badui, 2006).

TABLA 1. Composición de la leche de vaca

Elemento de la leche	% Aproximado	Componentes	
Grasa	3.9	Triglicéridos y algunos diglicéridos,	
Proteína	3.23	Caseínas	2.56 %
		α_{s1} - caseína	1.08 %
		α_{s2} - caseína	0.25 %
		β -caseína	0.79 %
		κ -caseína	0.31 %
		γ -caseínas	0.13%
Lactoalbúminas	0.52 %		
α -lactalbúmina	0.15 %		
β -lactoglobulina	0.34 %		
Albúmina sérica	0.03 %		
Lactoglobulinas	0.12 %		
Minoritarias	0.03 %		
		Trazas de otras sustancias nitrogenadas	
Lactosa	5.1		
Sales (minerales)	0.9	Cálcio, magnésio, sódio, potássio, fosfato, citratos, sulfatos (magnésio, cobre, cobalto)	
Agua	86.87		
Elementos minoritarios			
Pigmentos	Carotenos, riboflavinias, xantofilas		
Enzimas	Lipasas, proteasas, reductasas, fosfatasas, lactoperoxidasa, catalasa, oxidasas.		
Vitaminas	Liposolubles: A, D, E, K Hidrosolubles: grupo B y C		
Gases	CO ₂ , O ₂ , N ₂ y otros gases		
Células	Células epiteliales, bacterias (biota ubre normal),contaminantes (levaduras y mohos)		
Contaminantes	Semillas, paja, hojas, desinfectantes, estiércol, urea y tierra		

Fuente: (Scott, 2002; Amiot, 1991)

3.3 Queso

Es el producto fresco o madurado obtenido por coagulación y separación del suero de cualquiera de los siguientes productos: leche, crema, leche descremada (total o parcialmente), suero de mantequilla o de una mezcla de cualquiera de ellos (Cenzano, 1992). Según la NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios quesos frescos,

madurados y procesados, especificaciones sanitarias. Los quesos son productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, microorganismos lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento térmico, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos, pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

Los quesos constituyen una forma artesanal de conservación de las proteínas y de la materia grasa de la leche, así como de una parte del calcio y del fósforo, cuyas cualidades nutritivas y organolépticas son apreciadas por el hombre en casi todas las regiones del mundo.

Todas las sustancias que le confieren a la leche su gran valor nutricional también están presentes en el queso y en muchos casos de forma aún más apetitosa y nutritiva. Esto se debe a que durante la maduración del queso tienen lugar transformaciones bioquímicas de sus componentes.

La fabricación de queso es una actividad muy antigua, hoy en día las presentaciones de queso más populares se elaboran industrialmente y se ha desarrollado un gran número de diferentes variedades de queso. Sin embargo, en algunos casos las diferencias son muy pequeñas y residen prácticamente en la forma o tipo de envasado; no obstante, todas las variedades de queso comparten una tecnología básica común, en la que generalmente los cultivos fermentadores, compuestos por bacterias lácticas, desempeñan un papel fundamental. (Schmidt, 1995; Mahaut y col., 2003; Varnam y Sutherland, 1995).

3.3.1 Clasificación

Debido a que actualmente existe una gran variedad de quesos en todo el mundo, ha sido difícil establecer una clasificación estricta que permita distinguirlos; sin embargo, se han utilizado los siguientes criterios para tratar de distinguirlos.

- País de origen.
- Tipo de leche (vaca, cabra, oveja).
- Tipo de coagulación (ácida, ácido-enzimática, enzimática).
- Consistencia, esto se relaciona con el contenido de humedad (%). Los principales grupos son:

Quesos muy duros.....	<51 % de humedad
Quesos duros.....	49-56 % de humedad
Quesos semiduros.....	54 -63 % de humedad
Quesos semiblandos.....	61-69 % de humedad
Quesos blandos.....	67-76 % de humedad
Quesos frescos.....	73-83 % de humedad

- El porcentaje de grasa en base seca. Dividiéndose en los siguientes grupos:

Queso extra grasos.....	60-85 % de grasa
Queso súper grasos.....	50-60 % de grasa
Queso grasos.....	45-50 % de grasa
Quesos semigrasos.....	25-45 % de grasa
Quesos semimagros.....	10-25 % de grasa
Quesos magros.....	<10 % de grasa

- Características internas:

Textura abierta o cerrada, ojos grandes, medios o pequeños, ojos rasgados o grietas de la cuajada, madurado por mohos azules o blancos, color de la cuajada, presencia de hierbas o especias.

- Características externas:

Corteza dura o blanda, lisa (suave) o rugosa, revestimiento bacteriano o de mohos, impregnado con especias, hierbas o cenizas, tipo de revestimiento final (plástico, cera, hojas).

- Peso, forma y tamaño del queso.

(Belitz y Grosch, 1997; Keating, 1999; Rodriguez, 2007; Scott, 2002; Norma general del codex para el queso.)

3.3.2 Elaboración de queso

Todos los procesos de manufactura o fabricación de alimentos deben tener un procedimiento estándar escrito, programa o modelo de operación. En quesería se ha usado el término receta para referirse a la manufactura de una variedad específica de queso, particularmente cuando se opera a pequeña escala o artesanalmente.

Se pueden distinguir cinco operaciones fundamentales comunes en la fabricación de quesos:

- 1.- La preparación de la leche
- 2.-La coagulación
- 3.- El desuerado.

4.-El salado y la maduración.

En principio casi todos los tipos de queso se elaboran de la misma forma siguiendo estas operaciones, pero la enorme variedad de quesos existentes se debe a las variaciones particulares para cada una de las operaciones, así como en el tipo de leche y microorganismos utilizados. El diagrama 2, muestra el proceso general de la elaboración de queso. (Scott, 2002; García y col., 2004).

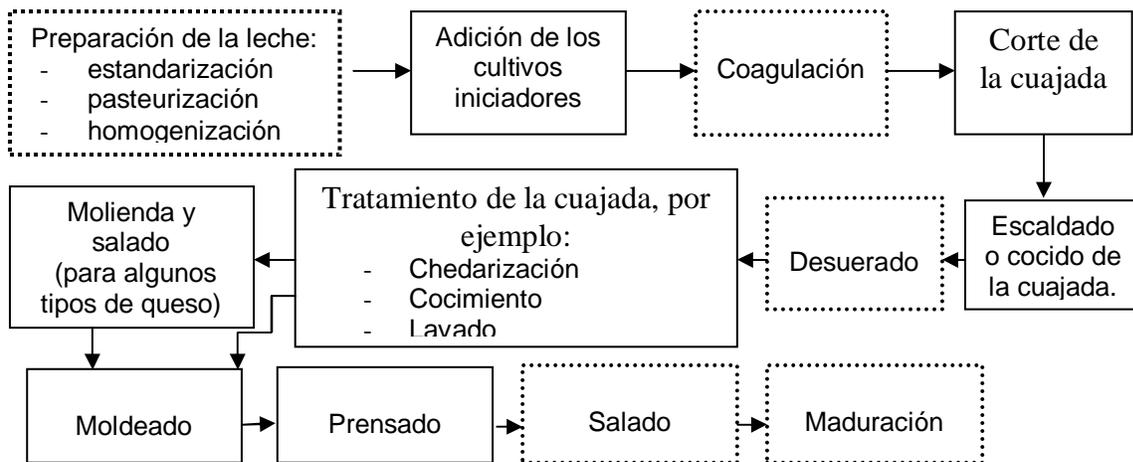


Diagrama 2. Elaboración general de queso (García, 2004)

3.3.3 Microbiología del queso.

Los quesos, desde el punto de vista microbiológico deben considerarse como medios de cultivo sólidos en los que se multiplican algunos microorganismos: bacterias lácticas, micrococos, coliformes, levaduras y mohos. Esta multiplicación se acompaña de la degradación de las proteínas y lípidos de la leche. En el momento del consumo, el metabolismo de estos microorganismos puede estar todavía activo, o por el contrario haberse detenido por el salado, desecación o calentamiento del queso.

Diversos factores influyen en la presencia y supervivencia de patógenos en el queso como: características del patógeno, tolerancia al calor, ácido, sal, número inicial presente, estado fisiológico que influye en la capacidad de sobrevivir a las operaciones del proceso y temperatura de almacenamiento. De acuerdo a datos epidemiológicos, incidencia en la leche y características de los microorganismos, los patógenos se clasifican en tres grupos; microorganismos de alto riesgo *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7; microorganismos de medio riesgo *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*, es una forma de β -hemolítico, *S. zooepidemicus*, causa enfermedades graves relacionadas al consumo de leche cruda, *Yersinia enterocolitica*, *Brusela. abortus*, *Coxiella burnetii* y *Aeromonas hydrophila*, etc.), microorganismos de bajo riesgo son *Staphylococcus aureus* y *Cl. Botulinum*. (ICMSF,1998).

3.3.3.1 Microorganismos en el queso

La microbiota de los quesos se compone de un gran número de microorganismos de distintos orígenes (leche, atmósfera de los locales, material de quesería, cultivos, etc.) pertenecen a grupos y especies muy diversos.

La maduración de la leche consiste en el desarrollo de microorganismos lácticos. Este proceso es muy importante porque es imposible producir quesos de calidad sin la intervención de microorganismos. La fermentación láctica debe de interrumpirse en el momento adecuado; el tiempo varia de acuerdo al tipo de queso que se desee elaborar.

Al principio de la maduración el pH se asocia a los tratamientos previos; este puede ir de 4.3 a 4.5 para los quesos frescos, hasta 5.0 a 5.2 para quesos prensados y cocinados que han sufrido tratamientos que provocan fuerte expulsión de suero (corte en granos pequeños, cocimiento, prensado) o reduzca la concentración de lactosa en la fase líquida (deslactosado). En ambos tipos de tratamiento se reduce la cantidad total de lactosa disponible para la producción de ácido láctico, esto implica mayor pH. En la maduración del queso el pH sube debido al consumo de ácido láctico y la formación de compuestos alcalinos. Esta neutralización permite el crecimiento de bacterias menos acidorresistentes. El pH determina el desarrollo de los microorganismos ya que estos son muy sensibles, a cambios de pH. Las levaduras y los hongos se desarrollan mejor en ambientes ácidos mientras la mayoría de las bacterias prefieren medios próximos a la neutralidad.

Durante los primeros días de la maduración del queso, aumenta la cantidad de microorganismos, y la cuenta microbiana disminuye considerablemente al final de esta etapa; la microbiota varía cualitativamente a medida que avanza la maduración debido a que ocurren cambios en las condiciones (temperatura, humedad, pH, etc.) así como en los nutrientes. (Keating, 1999; García y col., 2004; Santos, 1991).

Entre la microbiota podemos definir cinco grandes grupos (Tabla 2):

- **Bacterias Lácticas:**

- **Homofermentativas** (*Lactococcus* (*Lc.*)): Constituyen la flora dominante en la mayoría de los quesos. Se trata de especies mesófilas (*Lc. Lactis*, *Lc. Cremoris* y *Lc. Diacetylactis*) cuya función principal es la de transformar la lactosa en ácido láctico (>90%) y producir enzimas proteolíticas que intervienen en la maduración de la pasta.

- **Lactobacilos y estreptococos termófilos:** Tienen un papel acidificante y proteolítico. Al principio de la maduración son numerosos los estreptococos lácticos, no obstante, estos desaparecen progresivamente; su papel en la maduración parece ser escaso; sin embargo, los productos de la fermentación láctica de los estreptococos intervienen en la formación del aroma de algunos tipos de queso.

Después de los estreptococos predominan los lactobacilos (*L. casei*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*) productores de enzimas proteolíticas y lipolíticas endocelulares, que se liberan en el medio tras la muerte de las bacterias; su papel es importante en la maduración de los quesos que no poseen una microflora superficial activa.

- **Heterofermentativas:** Producen ácido láctico (<50%) y a menudo se asocian a los lactococos en la producción de componentes aromáticos (etanol, ácido acético, diacetilo y acetoina) y CO₂, ejemplo *Leuc. Cremoris*.

- **Bacterias propiónicas (*Propionibacterium*):**

Las bacterias propiónicas son microorganismos anaerobios que producen ácido propiónico y gas carbónico. Contribuyen al sabor y al aroma.

- **Micrococos y bacterias corineformes:**

Estas bacterias de superficie son aerobias y halófilas (microorganismos que viven en medios con gran cantidad de sales); están dotadas de actividad proteolítica y lipolítica y pueden degradar aminoácidos.

- **Levaduras:**

Las levaduras se encuentran tanto en el interior como en la superficie del queso. Estos microorganismos se adaptan a diversos sustratos. Las encontramos sobre todo en las superficies de los quesos y tienen diversas funciones: consumo de ácido láctico, formación de etanol y de productos secundarios por fermentación de lactosa, esterificación y acciones proteolíticas y lipolíticas. Cuando son abundantes pueden provocar defectos debido al hinchamiento precoz en la cuajada en vías de desuerado.

- **Mohos:**

Representados principalmente por las dos especies del género *Penicillium*.

- ***Penicillium camemberti***: Moho superficial del queso tipo camembert, realiza el consumo de ácido láctico y degradación de las proteínas, hidrólisis de triglicéridos y oxidación de ácidos grasos.
- ***Penicillium roqueforti***: Moho interno de las pastas azules, igualmente dotado de la actividades proteolíticas y lipolíticas así como degradación oxidativa de ácidos grasos. (Mahaut y col., 2003, Alais, 1991).

Tabla 2. Principales grupos microbianos que intervienen en la maduración de los quesos

Grupo microbiano	Principales funciones
BACTERIAS	
Mesófilos	
Lactococos	
<i>Lc. lactis spp lactis</i>	Acidificación, contribución a la proteólisis
<i>Lc. lactis spp cremoris</i>	
<i>Lc. lactis spp lactis biovar diacetylactis</i>	
Leuconostocs	
<i>Leuc. Lactis</i>	Producción de compuestos del aroma
<i>Leuc. Cremoris</i>	
<i>Leuc. dextranicum</i>	
Lactobacilos	
<i>L. casei</i>	Producción de compuestos del aroma
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. brevis</i>	
Termófilos	
<i>L. helveticus</i>	Contribución a la proteólisis
<i>L. delbrückii spp bulgaricus</i>	
<i>L. delbrückii spp lactis</i>	
Estreptococos	
<i>S. termophilus</i>	Apertura de pasta
Micrococos	
<i>M. caseolyticus</i>	Degradación de aminoácidos, proteólisis
<i>M. conglomeratus</i>	
<i>M. freudenreichii</i>	
Bacterias corineformes	
<i>Corynebacterium</i>	Apertura de la pasta
<i>Brevibacterium linens</i>	
<i>Microbacterium</i>	
<i>Arthobacter</i>	
Bacterias propiónicas	
<i>P. freudenreichii</i>	Producción de compuestos del sabor y del aroma
<i>P. jensenii</i>	
LEVADURAS	
<i>Kluyveromyces</i>	Desacidificación, Proteólisis, Lipólisis, Producción de compuestos del aroma, Enmohecimiento superficial.
<i>Debaryomyces</i>	
<i>Saccharomyces</i>	
<i>Pichia</i>	
<i>Candida</i>	
<i>Geotrichum candidum</i>	
MOHOS	
<i>Penicillium camemberti</i>	Enmohecimiento superficial. Aspecto azulado, desacidificación, proteólisis, lipólisis, producción de compuestos de aroma
<i>Penicillium roqueforti</i>	

(Lc. = Lactococcus, L. = Lactobacillus, Leuc. = Leuconostoc, Sc. = Streptococcus.)

(Mahaut y col., 2003; Ellner R., 2000)

3.3.3.2 Alteraciones microbiológicas en quesos

La alteración de quesos de pasta dura y semidura son principalmente de dos tipos, el crecimiento superficial de microorganismos, normalmente mohos, y la producción de gas debida al crecimiento de microorganismos en el interior de la pasta del queso.

El crecimiento de mohos produce una alteración muy visible, en algunos casos, se acompaña de una lipólisis y proteólisis intensa. *Penicillium sp.* es el responsable de la alteración de un 60-80 % de los casos y también *Aspergillus sp.* es un contaminante frecuente. La alteración por mohos puede ser un problema importante especialmente en el queso preenvasado y hay que tomar rigurosas medidas higiénicas en las plantas de envasados. Entre estas precauciones se incluye la esterilización del aire por filtración, la desinfección mediante rayos ultravioleta de las superficies de trabajo y cuando está permitido el tratamiento antimicótico del material de envasado. La incidencia de las alteraciones causadas por mohos se ha reducido en gran medida por la expansión del envasado al vacío y en atmósferas modificadas. A pesar de ello, el poco crecimiento de los mohos presentes en el momento del envasado, puede ser suficiente para causar una alteración visible como manchas de colores variados sobre la superficie del queso y los envases con fugas son un continuo problema. Como sistema de control se ha propuesto la irradiación con rayos gamma.

La formación de hilos es un problema esporádico causado por el crecimiento de mohos en los pliegues y arrugas de las películas plásticas de envasado. El efecto da lugar a la aparición de hilos manchas negras, marrones o verdes y se asocia con

la formación de suero libre que se separa del queso cuando se envasa al vacío; la incidencia depende de la tecnología de fabricación. Los mohos capaces de producir esta alteración son relativamente pocos, pero están presentes en el ambiente de las fábricas estos son de las especies de *Cladusporium* y *Penicillium* pero también puede aparecer *Pahoma*, las levaduras más frecuentes son especies de *Candida*.

La gran incidencia de las alteraciones del queso causadas por mohos ha despertado una preocupación sobre la posibilidad de que estos produzcan micotoxinas. Los controles realizados han dado diferentes resultados, pero parece que aproximadamente el 20% de los mohos que normalmente causan alteración (*Penicillium* y *Aspergillus*), producen metabolitos potencialmente tóxicos.

Las levaduras y las bacterias pueden también desarrollarse en el exterior de los quesos de pasta dura, especialmente si la superficie es húmeda. La alteración consiste en la aparición de viscosidades, decoloraciones y “podredumbres” debidas a la proteólisis; además pueden formarse aromas y sabores anormales en algunas variedades de quesos como el Stilton blanco; el papel que desempeñan las levaduras como microorganismos que alteran el producto no está muy claro porque las levaduras están presentes prácticamente siempre y se considera que contribuyen al aroma deseable del queso. La decoloración de la superficie se debe normalmente a microorganismos pigmentadores como *Aurebacterium liquefaciens*, *Brevibacterium linens* o con menos frecuencia, a cepas de *Lactobacillus brevis* productoras de carotenoides. En el queso Gouda con nitratos, se presenta una decoloración especial color rosa, que ha sido atribuida a la reducción de los nitratos a nitritos por la acción bacteriana, esta tarea la realiza predominantemente *Micrococcus* procedentes de los estantes de las cámaras de maduración. A valores de pH entre 2.5 y 6.7, el nitrito

reacciona con el colorante del recubrimiento del queso produciendo un compuesto rosa.

La alteración de los quesos de pasta dura por formación de gas en el interior, se puede producir tanto en la cuajada o en el queso al principio de la maduración (hinchazón precoz), también durante la maduración (hinchazón tardía). La causa mas frecuente de la hinchazón precoz es la presencia de *Enterobacteriaceae* y en los casos extremos, la producción de gas tiene lugar durante la fermentación, pero con la intervención de otros microorganismos como levaduras y especies de *Bacillus*. Las mejoras en la higiene y en el control de la producción han reducido de manera notable la incidencia de la hinchazón precoz, aunque los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* pueden encontrarse en número suficiente como para impartir un olor fecal aunque no haya una formación de gas visible.

La hinchazón tardía se debe a la formación de gas por especies de *Clostridium* capaces de fermentar la lactosa con producción de ácidos acético y ácido butírico, hidrogeno y dióxido de carbono. La hinchazón tardía es un importante problema en quesos como Emmental, Gouda y Edam, aunque puede presentarse en otras variedades como el Cheddar. El microorganismo normalmente causante es *Clostridium butyricum*, pero pueden encontrarse también otras especies como *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. Sporogenes*. Especialmente en el queso de pH alto las esporas provienen de la leche original causando problemas aunque se encuentren en pequeña cantidad. La fuente de procedencia primaria de la contaminación con este microorganismo es la alimentación, especialmente el ensilado de baja calidad como la cebada, se ha observado que el problema es más grave durante los meses de invierno.

Además de las alteraciones más conocidas, hay muchos microorganismos que pueden producir aromas anormales en el queso. En algunos casos, los problemas han sido muy aislados, pero han tenido una gran difusión debido a su naturaleza inusual o por su importancia tecnológica. Por ejemplo, *Cándida* ha causado alteración en el queso Cheddar por la producción de elevados niveles de etanol, acetato de etilo y butirato de etilo, que imparten un aroma a “levaduras fermentadas”. La alteración aparece en los 6 primeros meses, cuando el queso tiene un alto contenido de humedad y un bajo contenido de sal.

Kluyveromyces marxianus también produce alteración “gaseosa” del queso parmesano.

Las bacterias lácticas que no forman parte del cultivo iniciador se han asociado con muchos aromas anormales, defectos en el aspecto y en la textura de la pasta debido a la precipitación de cristales de lactato cálcico; los microorganismos responsables de esta alteración son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, que son capaces de la racemización del ácido L- (+) láctico a ácido D- (-) láctico. Las células bacterias iniciadoras muertas pueden servir como núcleos para el crecimiento de los cristales que se producen rápidamente a temperaturas altas. La formación de cristales de lactato cálcico está particularmente asociada con la aplicación de altas temperaturas para acelerar la maduración del queso. La formación de cristales se reduce en el envasado al vacío.

El papel de los microorganismos iniciadores en la producción de péptidos amargos es muy conocido pero estos también pueden producir otros defectos durante la maduración del queso. Algunas cepas de *L. lactis spp.* son capaces de formar ésteres con aromas afrutados con el butirato de etilo y el hexanoato de etilo

que se originan en las reacciones entre el etanol y los ácidos butírico y hexanoico. *L. lactis spp.* posee también transaminasas y descarboxilasas que convierten aminoácidos como la leucina en 3-metilbutanol, dando lugar a la formación de aromas a “malta” (Varman, 1995)

Las razones por las cuales se requiere hacer un análisis microbiológico a un queso son:

a) Controlar flora microbiana útil que se desarrolla durante el periodo de maduración del queso y es la responsable de la textura, aroma y el sabor del mismo.

b) Detectar la presencia de bacterias patógenas o productoras de toxinas aportadas por la leche o que llegan al queso en el curso de su elaboración. Éstas generalmente se multiplican en el queso y pueden sobrevivir durante la maduración

c) Identificar los microorganismos responsables de defectos de fabricación (mohos, levaduras, etc.) o de descomposición. (Beerens y Luquet, 1990)

3.3.3.3 Proteólisis lipólisis y glucólisis.

Los procesos metabólicos básicos que se llevan a cabo durante la maduración son: glucólisis, lipólisis y proteólisis. La importancia de estos procesos varía de acuerdo al tipo de queso; por ejemplo, la proteólisis es importante para el desarrollo de sabor, aroma y textura del queso Cheddar y quesos similares, mientras que la lipólisis es importante en el queso tipo Italiano. El ácido láctico y el cloruro de sodio, presentes en el queso sin madurar, contribuyen al sabor del queso y sirven de base a distintos sabores y aromas originados por los productos de los procesos bioquímicos

que se producen en esta fase (glucólisis proteólisis y lipólisis) y las reacciones de interconversión que se producen entre ellos. (Diagrama 3) (Rodríguez 2007).

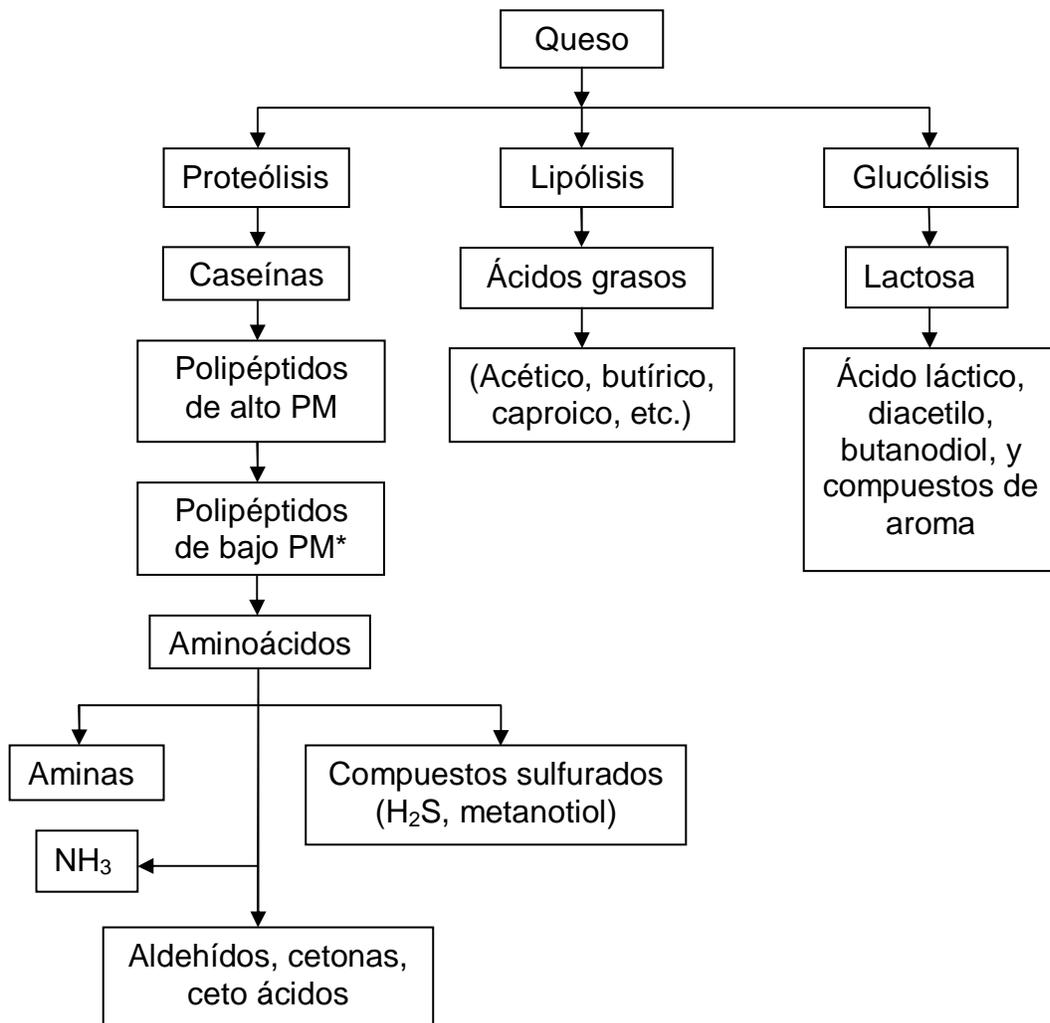


Diagrama 3. Representación esquemática de los procesos de tipo químico que tiene lugar durante la maduración del queso. *PM=peso molecular. Rodríguez 2007

3.3.3.3.1 Proteólisis

En la leche las principales proteínas son las caseínas, las cuales se dividen en las caseínas primarias con cuatro tipos de cadenas polipeptídicas, llamadas caseínas α_{s1} (40%), α_{s2} (11%), β (30%) y κ (11%); y las caseínas secundarias (γ, α_{s0} ,

α_{s3} , α_{s4} , α_{s5}), que son algunos componentes derivados, formados por proteólisis de las cadenas primarias (Scott, 2002; Rodríguez 2007).

Las caseínas α son el 50-55 % del total de las caseínas. Constan de dos componentes mayoritarios α_{s1} y α_{s2} .

La caseína α_{s1} tiene un peso molecular de 23 600 Da y consta de 199 residuos de aminoácidos, con ocho serinas fosforiladas, situada entre los residuos 43 y 79. Este mismo segmento contiene 12 residuos carboxilo. Los grupos fosfato fijan iones calcio y esta caseína tiende a precipitar en presencia de este catión divalente, debido a que se neutraliza la carga del fosfato. El resto de la cadena polipeptídica exhibe una fuerte asociación en la formación de micelas.

La caseína α_{s2} tiene un peso molecular de 25 000 Da, 207 aminoácidos, de 10 a 13 grupos fosfato y una estructura dipolar con las cargas negativas concentradas cerca del amino N-terminal y las positivas cerca del carboxilo C-terminal. Esta caseína a pH 7, 37°C y la adición de calcio ionizado (Ca^{2+}) se coagula. A pH neutro y en ausencia de Ca^{2+} se autoasocia.

La caseína β representa el 30-35% del total de las caseínas. No precipita bajo la acción del Ca^{2+} tan fácilmente como la caseína α_{s1} y α_{s2} es soluble a 4° C pero solamente el 0.2 % es soluble a 37° C; está constituida por una sola cadena polipeptídica de 209 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 24,000 Da.

Las caseínas κ suponen alrededor del 15% del total de las caseínas y es la única que contiene cisteínas. Sus monómeros tienen un peso molecular de 19,000 Da y forman, vía enlaces disulfuro, polímeros de peso molecular de 60,000 Da y 600,000 Da. Los monómeros κ -caseína tienen una sola serina fosfatada (en la posición 149) lo cual la hace estable al calcio y entre 0-5 cadenas de carbohidratos

(trisacáridos). El monómero contiene 169 residuos de aminoácidos, con un segmento N- terminal hidrófobo y un segmento C-terminal hidrófilo, conocidos como para- κ -caseína y macropéptido, respectivamente. Esta distribución asimétrica y su alto contenido en ácido aspártico y glutámico dan como resultado un segmento C-terminal, del monómero de κ -caseína, ácido y muy soluble. La κ -caseína es por consiguiente muy estable a la precipitación por Ca^{2+} . Sin embargo, es de máxima importancia en la leche de quesería, debido a la capacidad estabilizadora de las otras caseínas frente a la coagulación. (Dominic y Wong, 1995 Cheftel, 1992; Luquet, 1991).

La proteólisis es el fenómeno más importante de la maduración, consiste en la degradación parcial de las proteínas en productos más simples y más solubles. Es un fenómeno muy complicado debido a la naturaleza de las proteínas de la leche, la variedad de la flora y el gran número de enzimas proteolíticas que en él participan. Los quesos madurados contienen, entre otros, un gran número de compuestos nitrogenados y sus derivados, este proceso contribuye a modificar el sabor del queso, pero su efecto más importante es en el aspecto y la textura del mismo.

La hidrólisis de la caseína por acción de diferentes enzimas proteolíticas presentes en el queso origina la pérdida de tenacidad y elasticidad haciéndola más blanda y participa activamente en el desarrollo del sabor de los quesos, puesto que los aminoácidos son precursores de algunos aromas (Diagrama 4).

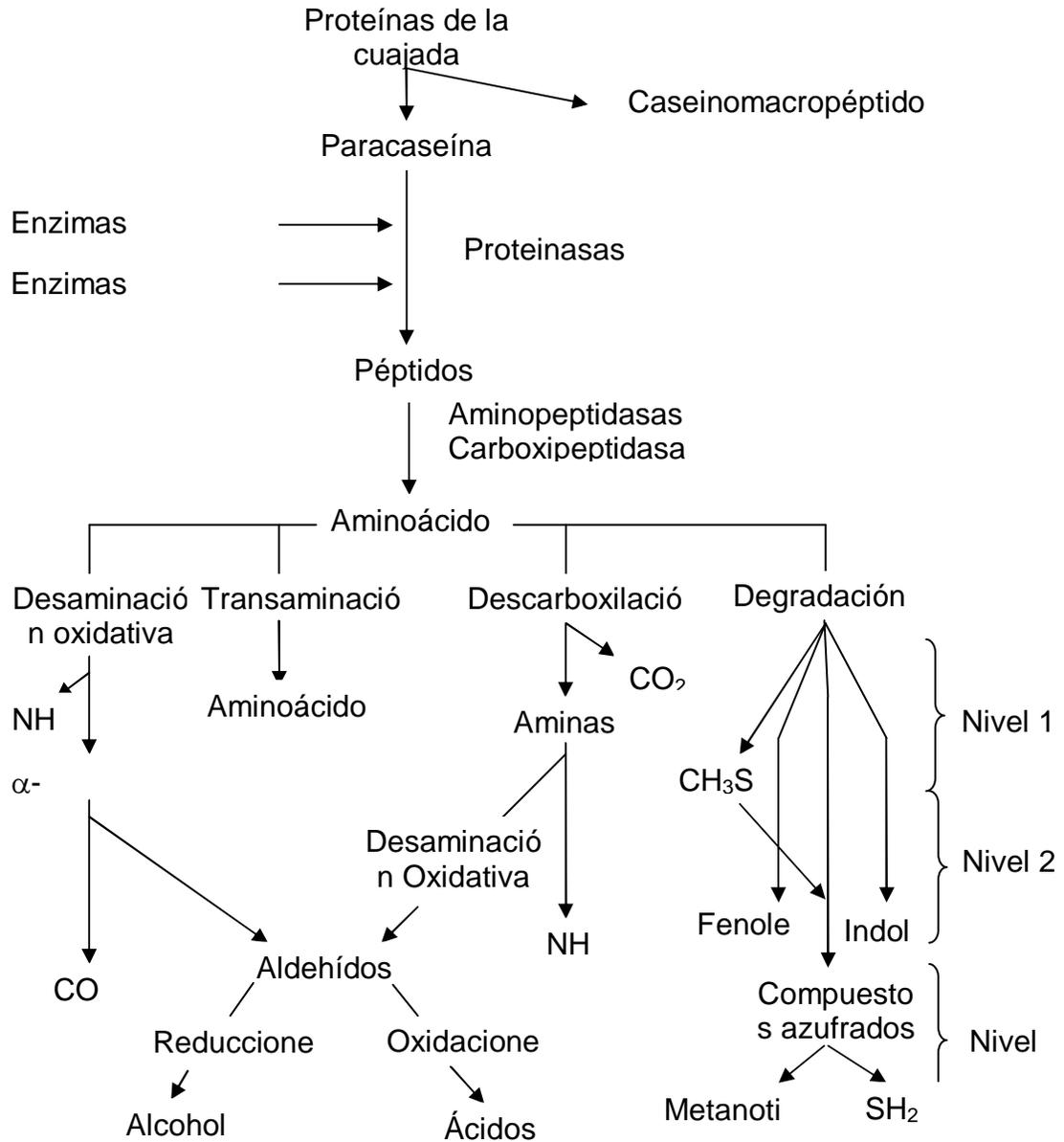


Diagrama 4. Degradación de las proteínas y catabolismo de los aminoácidos.
Fuente: Chamorro y Losada; 2002

La mayor parte de las proteínas del suero se pierden durante la fabricación del queso, las proteínas mayoritarias y predominantes en el queso son las α_{s1} , α_{s2} y β -caseínas; éstas son degradadas por las enzimas presentes en el cuajo residual, las proteasas naturales de la leche y polipeptidasas de las bacterias de cultivo de

arranque, tienen una actividad que es esencial para la producción de sabor y aroma del queso madurado.

Algunos ejemplos de los grupos más importantes de las enzimas encontradas en la cuajada son:

- Proteasas, que actúan sobre proteínas para producir péptidos.
- Peptidasas, que actúan sobre los péptidos liberando aminoácidos.
- Aminasas, que actúan sobre las proteínas produciendo aminoácidos.
- Descarboxilasas, que actúan sobre los aminoácidos produciendo aminas, presentes en los micrococos y las corinebacterias.
- Transaminasas, que actúan sobre aminoácidos produciendo cetoácidos. Estas enzimas son abundantes en *Micrococcaceae* y *B. linens*.
- Desaminasas, que liberan amoniaco debido la formación de ácidos orgánicos y aldehído. Están presentes en los micrococos, las corinebacterias y ciertas bacterias lácticas.
- Descarboxilasas, que actúan sobre los cetoácidos produciendo aldehídos.
- Liasas, que degradan las cadenas laterales responsables de la formación de fenol, indol y compuestos azufrados volátiles; se encuentran presentes en las corinebacterias, *Pseudomonas* y *P. camemberti*.

Frecuentemente los productos finales de las reacciones son aminoácidos y muchos de éstos contribuyen al sabor del queso, aunque algunos aminoácidos con sabores amargos pueden tener más impactos que otros (Alais, 1991; Scott, 2002; Mahaut y col., 2003).

La actividad proteolítica aumenta a medida que avanza la maduración; sin embargo, la proteólisis no sólo genera aminoácidos sino también proteosa-peptonas, ácidos, peptonas, aminas y amoníaco entre otros, que poseen aroma y sabor.

La solubilización de la caseína consiste en una digestión progresiva, comparable a la que se produce en el tubo digestivo de los animales, pero mas limitada; tiene dos consecuencias, la masa del queso se vuelva mas blanda y untuosa, la segunda entre los productos de degradación de la caseína se encuentran sustancias que poseen aroma y sabor, especialmente los aminoácidos y sus productos de descomposición: ácidos, aminas, amoníaco. De hecho la degradación no progresa de manera regular, desde la proteína de peso molecular elevado hasta las sustancias de molécula pequeña. Se puede distinguir a grandes rasgos las siguientes tres etapas en el proceso de proteólisis:

1. Degradación de cadenas peptídicas largas por las endopeptidasas (proteinasas)
2. Separación de los aminoácidos terminales por las carboxipeptidasas y las aminopeptidasas; la molécula es seccionada progresivamente y se producen aminoácidos libres. La proteólisis de las caseínas se produce de igual manera en todos los quesos.

Como regla general puede decirse que en todos los quesos, la caseína κ desaparece desde el principio de la fabricación.

- En los quesos madurados con mohos, la caseína β es la primera en degradarse.

- En los quesos de pasta dura y semidura, la caseína que más rápidamente se degrada es la α_{s1} .
3. Transformación de los aminoácidos por toda una serie de enzimas que intervienen en su catabolismo, según la microflora y las condiciones fisicoquímicas, sobre todo el pH. Las principales vías de reacción son:
- Descarboxilación: Con liberación de CO_2 y la producción de una amina. Esta actividad se manifiesta sobre los aminoácidos portadores de un tercer grupo polar formándose una amina. Algunas de estas aminas son sustancias tóxicas, causantes de accidentes graves tras el consumo de alimentos muy fermentados como quesos muy avanzados, los patés, los hidrolizados de pescado, etc. Tales son la cadaverina (procedente de la lisina), la agmatina (procedente de la arginina), la histamina (procedente de la histidina) y la tiramina (procedente de la tirosina). Esta última se ha encontrado en la dosis de 85 mg/kg en un Gouda tóxico.
 - Desaminación oxidativa, con producción de amoníaco y de un ácido cetónico.
 - Desaminación reductora, tras la formación de un ácido alifático, comparable a los que se liberan en la lipólisis; su origen se encuentra en la acción de las bacterias anaerobias.
 - Degradación de aminoácidos sulfurados (Cis, Met), con producción de sulfuros. (Alais, 1991).

La velocidad de la proteólisis depende de los siguientes factores:

- a) La temperatura tiene, evidentemente, una gran influencia. La solubilización de la caseína es lenta hacia 0°C . Para un queso de pasta prensada, conservado

durante 6 meses a diferentes temperaturas, se encuentran las siguientes proporciones de maduración: 23% a 0°C; 36% a 16°C y 46% a 21°C. Por lo tanto, la proteólisis es dos veces mas intensa a 21°C que a 0°C.

- b) La velocidad de solubilización de la caseína es más rápida al principio de la maduración que al final.
- c) Cuanto mayor es la humedad del queso fresco, más rápida es la proteólisis, a una temperatura determinada. Los quesos muy desuerados tiene una maduración lenta. El revestimiento del queso es una capa impermeable que favorece su maduración por las enzimas que se encuentran en la masa.
- d) La proteólisis se retrasa en medio muy ácido, por debajo de un pH 5.5. Los quesos de larga conservación tienen, en general, un pH que no sube por encima de 5.6, por lo que el papel del pH es muy importante. Numerosas enzimas microbianas: endopeptidasas, peptidasas y descarboxilasas, son muy activas hacia pH 5-6; por el contrario, las desaminasas tienen un pH óptimo más elevado (pH 7).
- e) La caseína se digiere más rápidamente en los quesos descremados que en los quesos grasos. Se sabe que los ácidos grasos insaturados tienen un efecto inhibitor sobre las bacterias proteolíticas (Alais, 1991).

3.3.3.3.2 Lipólisis

La materia grasa de la leche está formada principalmente por triglicéridos (95% a 96%), diglicéridos (1.2% a 1.6%) y fosfolípidos (0.8% a 1%).

La lipólisis es la hidrólisis del éster entre los ácidos grasos y el glicerol por las lipasas. Ésta se desarrolla generalmente en el orden triglicéridos>diglicéridos>monoglicéridos. Los principales ácidos volátiles liberados en los quesos son: ácido butírico, caprónico, caprílico y cáprico; en los quesos duros estos ácidos son los responsables de gran parte del sabor y del olor característico, pero en los quesos blandos, especialmente en los madurados por hongos que se desarrollan en la masa del queso, el sabor queda más fuerte y picante por la degradación de los ácidos grasos volátiles y liberación de metil cetona, especialmente a partir del ácido caprílico (Diagrama 5).

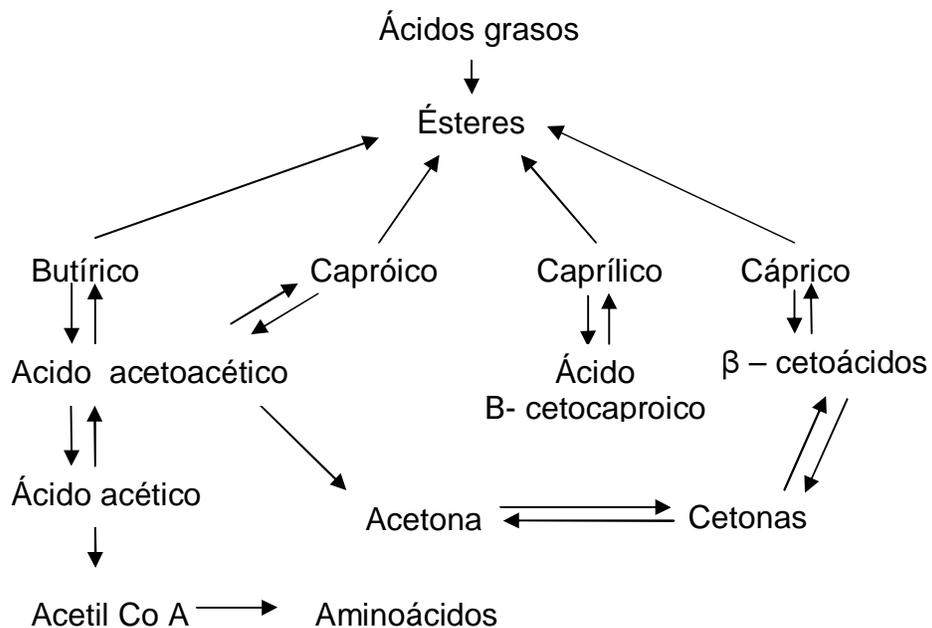


Diagrama 5: Senda conducentes al desarrollo del sabor y aroma del queso maduro
Fuente: Scott, 2002

Las enzimas responsables de la lipólisis de la grasa pueden ser originarias de la leche, de los microorganismos y, en algunas clases, de las preparaciones especiales agregadas a la grasa o adicionadas con el cuajo. Las lipasas según su

origen, pueden tener actividades preferenciales para hidrolizar ciertos ácidos grasos. Así, la lipasa de *P. roqueforti* libera más rápidamente ácidos grasos de cadena corta, mientras que la lipasa de *Geotrichum candidum* lo hace con el ácido oleico y otros insaturados de cadena larga. Por acción de las enzimas la grasa es hidrolizada en el queso con la consecuente liberación de varios ácidos grasos volátiles.

La pasteurización destruye la lipasa de la leche, pero, aunque se utilice leche cruda, la lipasa no parece tener gran influencia en la degradación de la grasa de los quesos con poca maduración en que el pH promedia entre 5.0 y 5.5, y su actividad máxima es a pH 8.5, cabe señalar que es inhibida a pH 6.5 o inferior; sin embargo, posiblemente la lipasa puede actuar en aquellos quesos añejos, cuando su pH sube lo suficiente por efecto del proceso de las otras fases de maduración.

De la flora normal de los quesos duros, parece que los lactobacilos posiblemente otras especies como los *Micrococcus*, serían los más importantes productores de lipasa después de su autólisis.

En algunos quesos blandos la fuente de lipasa proviene de los hongos que en ellos se desarrollan (Keating, 1999; García y col.2004).

3.3.3.3 Glucólisis

La transformación lactosa en ácido láctico la lleva a cabo bacterias ácido lácticas por un proceso homofermentativo, obteniéndose de un 85-95% de ácido láctico y, por un proceso heterofermentativo, en el que se obtiene un 50% de ácido

láctico, además de ácido acético, succínico, fórmico, alcohol etílico acetona diacetilo y otros productos volátiles (Diagrama 6).

1.- Vía hexosa difosfato

Glucólisis → Hexosas → Ácido pirúvico

- En aerobiosis (respiración). Ciclo de Krebs

Micrococos		→	CO ₂ + H ₂ O
Bacterias corineformes			
Mohos			

- En anaerobiosis (fermentación): Vía homofermentati

Streptococos lácticos		→	Ácido láctico
Mayoría de lactobacilk			

2.- Vía pentosa fosfato: Vía heteroláctica

Leuconostoc		→	←	Ácido láctico
Lactoheterofermentativas				CO ₂
				Etanol
				Ácido acético

Levaduras (en anaerobiosis) → Etanol + CO₂

Bacterias coliformes		←	Ac. láctico, Ac. acético
			Ac. Fórmico, Ac. Succínico
			Etanol, metil CO ₂
			2.3 Butanodiol
			Acetil metil carbidiol

Diagrama 6: Diferentes vías de degradación de la lactosa. **Fuente:** Chamorro y Losada; 2002

En los quesos de pasta prensada, de coagulación mixta predominantemente enzimática o de coagulación puramente enzimática (de leche cruda), el ácido está en forma de lactatos. La acidez que presentan estos quesos en los primeros días de maduración (1.7- 2.2% de ácido láctico) se reduce en los siguientes días (0.5-1.2 % de ácido láctico al final de la maduración). Este descenso se debe a que, durante la maduración, el ácido láctico es metabolizado por determinados microorganismos, generando sustancias que contribuirán a formar su conjunto alfato-gustativo, como *Streptococcus lactis* y *Leuconostoc cremoris* en el queso Gouda, *S. Lactis* y/o *S. cremoris* en el queso Cheddar, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en el queso Romano.

3.3.4 Enzimas

Los microorganismos elaboran enzimas que actúan sobre el sustrato. Algunas de estas enzimas son liberadas durante su crecimiento; otras aparecen después de su muerte y autólisis.

Las enzimas responsables de la maduración tienen diversos orígenes: la leche, agentes coagulantes y los microorganismos que se multiplican en las pastas.

Entre las enzimas responsables de la maduración podemos mencionar las siguientes:

- **Enzimas de la leche:** Tienen un papel limitado, sin embargo, para ciertos tipos de queso no son despreciables.
- **Plasmina:** Proteasa que hidroliza parcialmente la caseína β en caseínas γ_1 , γ_2 y γ_3 .

- **Fosfatasa alcalina:** Tiene la capacidad de hidrolizar el fosfato orgánico en alcohol o fenol (si se trata de un fenilfosfato) y ácido fosfórico. Es termolábil, se destruye con la pasteurización y tendría un papel despreciable en quesos elaborados con leche pasteurizada. Su pH óptimo es de 9.6 (de ahí su nombre de alcalina).
- **Fosfatasa ácida:** Podría intervenir en la desfosforilación de las caseínas y de los fosfopéptidos localizados en el lactosuero. Es termoestable, muestra una gran actividad sobre la caseína, a la que desfosforila, haciéndola más reactiva y oxidable.
- **Lipasa:** Enzima termolábil; interviene eventualmente en los quesos de leche cruda, hidroliza principalmente los ácidos grasos de cadena corta.
- **Proteasa alcalina:** Desnaturaliza a las caseínas α_{s1} , α_{s2} , y β -caseínas.
- **Proteasas ácidas:** Termorresistentes. Hidroliza a la caseína α_{s1} , pudiendo incluso producir aminoácidos libres.

La actividad proteolítica natural de la leche tiene consecuencias prácticas sobre la calidad de los productos lácteos.

En las etapas de maduración del queso, las proteasas intervienen en los procesos bioquímicos que tienen lugar, pudiendo incluso producir aminoácidos libres.

Respecto a las cualidades organolépticas, las proteasas endógenas de la leche, así como las proteasas de los microorganismos psicótrofos, provocan la aparición de péptidos que dan un sabor amargo a la leche, cremas y quesos.

- **Cuajo:** El cuajo natural llamado renina, es una enzima proteolítica secretada por la mucosa gástrica del cuarto estómago (cuajar) de los terneros antes del destete. Esta secreción se produce en forma de un precursor inactivo, la pro-

renina, que en medio neutro no tiene actividad enzimática pero que en el medio ácido se transforma rápidamente en renina activa. El cuajo contiene dos enzimas: la quimosina que es el componente principal, y la pepsina; después del destete, disminuye la producción de quimosina y la pepsina es el componente mayoritario. La actividad proteolítica del cuajo se ejerce principalmente sobre la caseína y en menor grado sobre otras proteínas y por lo tanto, realiza dos acciones fundamentales: por un lado, el cuajo provoca la desestabilización de las micelas de caseínas rompiendo la caseína K en el enlace peptídico fenilalanina-metionina (Phe-Met).

Generalmente, la fuerza de un cuajo se mide por su eficacia al romper este enlace peptídico (Phe-Met), acción que produce la coagulación de la leche. En la caseína K hay 164 diferentes enlaces peptídicos que pueden ser atacados, además de los que hay en las otras fracciones de la micela; por otro lado, el cuajo hidroliza estos enlaces peptídicos siguiendo un orden específico que es característico de la enzima utilizada. Esta segunda acción sobre las proteínas de la leche comienza lentamente después de la coagulación y continúa durante la maduración del queso.

La acción conjunta de las proteasas nativas de la leche, las proteasas de la flora original y las del cultivo, contribuye al desarrollo de algunas de las características de textura y sabor del queso.

Además de las enzimas coagulantes antes mencionadas, se han utilizado enzimas coagulantes extraídas de diversos vegetales como piñas, higos, alcachofas, algunos melones, etc; aunque los resultados obtenidos no han sido

satisfactorios porque la acción proteolítica de estas enzimas es demasiado intensa.

Los cuajos de origen microbiano se utilizan cada vez con más frecuencia como sustitutos del cuajo animal. Se preparan extrayendo las enzimas coagulantes producidas por algunos microorganismos. Los mejores resultados se han obtenido con mohos del género *Mucor*, concretamente *M. miehei*. Algunas de estas enzimas son más estables frente al calor que los coagulantes de origen animal

Los distintos tipos de cuajo tienen propiedades diferentes, por lo tanto no se comportan igual, sobre todo en lo que se refiere a las condiciones de temperatura y pH del medio.

- **Enzimas de origen microbiano:** Producen enzimas proteolíticas y lipolíticas. (Amiot, 1991; García y col., 2004, Mahaut y col., 2003, Luquet, 1991)

3.3.5 Formación de ojos:

La formación de “ojos”, está íntimamente ligada a la naturaleza de la pasta (consistencia). La formación de los “ojos” o de las hendiduras se debe por una parte, a la técnica de elaboración y por otra a una serie de fenómenos de tipo microbiológico.

La actividad metabólica de los microorganismos, en especial las reacciones proteolíticas y glucolíticas, implican una fermentación, con la cual hay formación de productos gaseosos, fundamentalmente hidrógeno (H₂) y bióxido de carbono (CO₂).

Estos gases se difunden por toda la pasta del queso y se acumulan en aquellos sitios donde ya existen pequeños huecos, formando los típicos “ojos” de cada variedad de queso.

En los quesos de pasta dura y de pasta firme, cuando ésta es elástica, de consistencia homogénea y cuando los microorganismos se hallan repartidos de igual forma, se crean los “ojos”, por todo el interior del queso. Sin embargo, si la pasta es quebradiza y dura, los gases no pueden difundirse lenta y homogéneamente por toda la pasta, debido a esto puede suceder que en algunas zonas de la pasta se produzca una gran acumulación de gases, originándose grandes “ojos” o incluso grietas.

Los diferentes gases provocan “ojos” de distintos tipos. El CO₂ debido a su buena solubilidad en el agua, produce “ojos” homogéneos; se produce de forma gradual y se va liberando de una forma uniforme. El H₂, por el contrario, es producido casi siempre por microorganismos no deseados (bacterias coliformes y bacterias butíricas) de forma “explosiva”. Debido a esto y a su mala solubilidad en agua provoca la formación de una multitud de pequeños agujeros en el lugar donde se encuentran presentes estos microorganismos o causa la rotura de la pasta (hinchamiento tardío del queso).

Mientras haya lactosa, los microorganismos dominantes son bacterias lácticas (*Lc. lactis spp lactis*, *L dextranicum*, *Lc. lactis spp cremoris*). Estas bacterias suelen producir CO₂ favoreciendo por lo tanto, la formación de “ojos”, pero también producen otras sustancias como ácido acético, alcohol y diacetilo.

Los típicos “ojos” de algunos quesos de pasta dura (Emmental, por ejemplo) se deben a la actividad de las bacterias propiónicas (por ejemplo, *Propionibacterium*

shermanii). Estas bacterias fermentan el ácido láctico produciendo ácido propiónico, acetato y CO₂.

Los procesos microbiológicos que culminan en el fenómeno de formación de “ojos”, así como las transformaciones de tipo químico que experimenta el queso durante la maduración dependen fundamentalmente de la actividad del agua. En los quesos al cuajo, para que la maduración se desarrolle de la forma adecuada, la actividad de agua debe ser, aproximadamente, $a_w = 0.9-0.96$.

La pasta puede presentar “ojos”, de diferentes tamaños y formas, su origen puede ser mecánico (fallo en la soldadura de la partícula de la cuajada o granos, al no fundirse bien en la fase de prensado) o biológicos (producidos por microorganismos del queso). La producción excesiva o no característica de gases es indeseable en todos los quesos. Si no hay “ojos” o cavidades se dice que la pasta es cerrada si estas son muy numerosas la pasta es abierta. (Spreer, 1991).

3.4 Identificación molecular

En la actualidad hay una gran variedad de métodos para distinguir entre microorganismos de una misma familia, entre estos métodos se encuentran los basados en biología molecular. De estos, los más utilizados se basan en la variación genómica debida a la evolución, y normalmente se enfocan al estudio de genes que sirven como “cronómetros evolutivos”.

3.4.1 Fundamentos de la amplificación de rARN's en hongos.

Los ribosomas son estructuras celulares compuestas de ARN (rARN) y proteínas ribosómicas, conocidas como ribonucleoproteínas. En los ribosomas ocurre la traducción de los ARN mensajeros (mARN) a una cadena polipeptídica (una proteína) que es el producto final de la expresión de un gen estructural. Su estructura, tanto en organismos procariontes como eucariontes, es similar y su tamaño se mide por unidades S (Svedberg), que corresponde a medidas de sedimentación de las partículas en una centrifuga. Los procariontes tienen ribosomas denominados 70S, constituidos de una subunidad pequeña de 30S y otra de 50S (Figura 3).

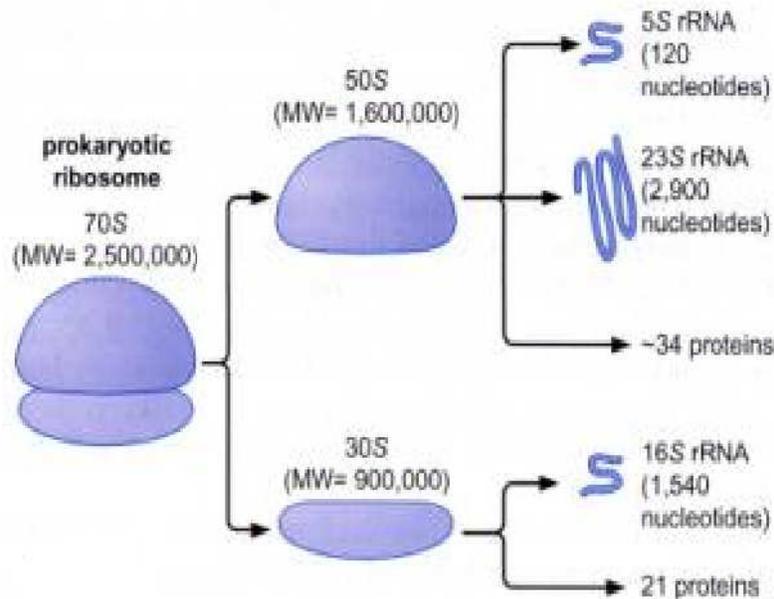


Fig. 3 Representación de la composición de un cromosoma de Procariontes

Los eucariontes tienen ribosomas de 80S con una subunidad de 40S y otra de 60S. La subunidad de 40S está formada por 33 proteínas y un ARN ribosómico de 18S

(18S rARN). La subunidad de 60S consiste de 49 proteínas y 3 tipos de moléculas de rARN: 5S, 5.8S y 28S (5S rARN, 5.8S rARN y 28S rARN) (Figura 4).

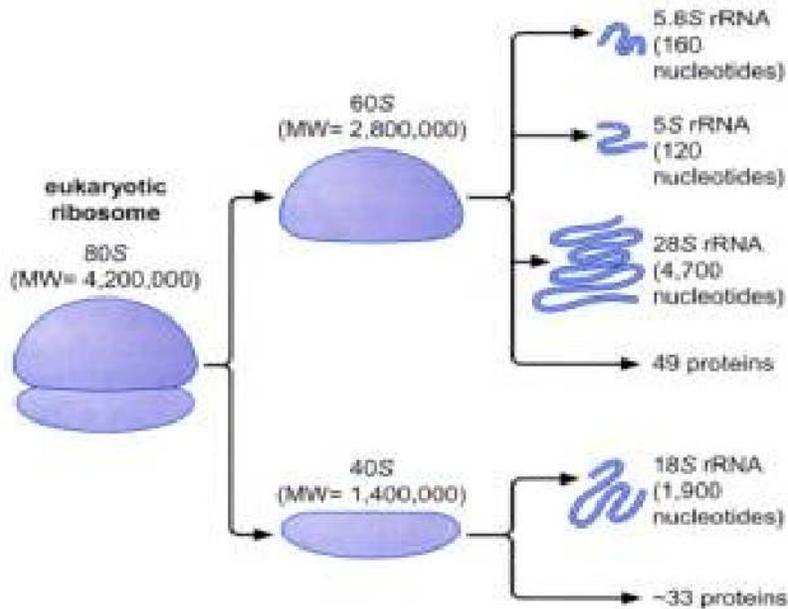


Fig. 4 Representación de la composición de un cromosoma de Eucariontes

En la mayoría de los organismos eucariontes la secuencia de ADN donde se ubican los genes que codifican por los rARN's, los cuales se encuentran agrupados y en un número de copias variable, es conocida como rADN. En hongos (filamentosos y levaduras), el rADN (ADN que codifica al rARN) está organizado como una unidad que se repite una detrás de la otra (en tándem). Cada unidad incluye tres genes de rARN: el gen que codifica para el 18S rARN, el gen para 5.8S rARN y el gen para 28S rARN. Además, en cada unidad, los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas que se transcriben junto a los genes de rARN, denominadas **ITS1 e ITS2** (Figura 5). Estas secuencias son conocidas como ITS, debido a la sigla en inglés que significa **I**nternal **T**ranscribed **S**pacer, y aunque son transcritas, no son codificantes. Además, cada unidad de rDNA se encuentra separada por un

espaciador intergénico, IGS (Inter **G**enic **S**pacier). El gen más pequeño, 5S rARN puede o no estar incluido en la unidad de rDNA dependiendo del grupo taxonómico que se esté analizando. Cuando se transcribe el rADN que codifica por los genes para cada uno de los rARN's que forman los ribosomas eucariontes, las regiones espaciadoras, no codificantes, quedan representadas en este transcrito primario, por lo que estas secuencias son removidas por un mecanismo específico de procesamiento del ARN ribosómico y sólo después de estas modificaciones pasan a formar parte del ribosoma.

Debido a que el cambio en las secuencias de los genes de rARN es muy lento, la comparación de éstas puede ser utilizada para estudiar la evolución entre organismos distantemente relacionados, mientras que las regiones no codificantes, ITS e IGS, cambian rápidamente y son útiles para la comparación de especies de hongos dentro de un género o cepas dentro de una especie. Por este motivo, las regiones espaciadoras internas de transcripción de los RNA ribosómicos, ITS, surgen como un concepto de la Biología Molecular para la tipificación genética de microorganismos.

3.4.1.1 Organización estructural de los genes de rADN.

Como se indicara anteriormente, las secuencias que constituyen los espaciadores ITS están codificadas por los ADN's ribosómicos (rADN). Todos los organismos eucariontes tienen dos ITS:

ITS1: ubicado entre el gen que codifica por el rARN de 18S y el gen que codifica al rARN de 5.8S.

ITS2: que se ubica entre los genes de los rARN ribosómicos de 5.8S y 28S (ver Figura 5).

Haciendo uso de dos cebadores o “primers” específicos (que son oligonucleótidos que inician la síntesis de ADN *in vitro*), llamados ITS5 e ITS4 (Figura 5) se puede amplificar la región comprendida entre ITS1, 5.8S rADN e ITS2, la cual varía en longitud, dependiendo de la especie. (Garbel y col., 1988).

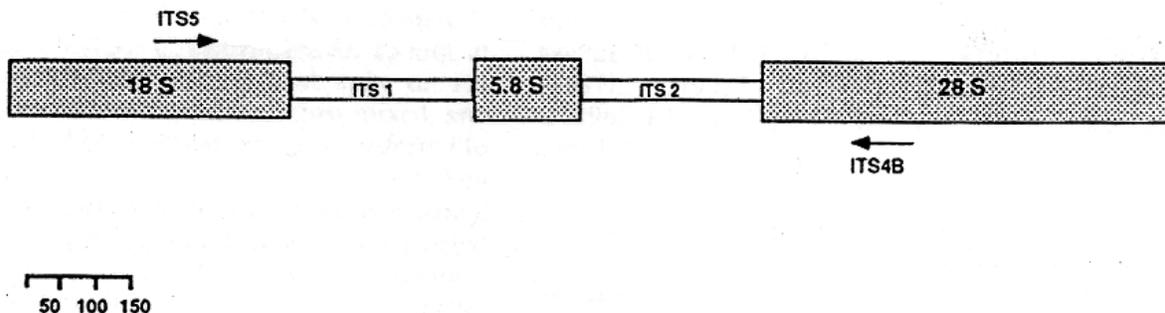


Figura 5. Representación esquemática de la región de ADN para los ARN ribosomales. Las cajas oscuras muestran el ADN de los genes codificantes y las cajas blancas las regiones ITS (Internal Transcriber Spacers) ,(Fernández, 1997).

3.4.2 Extracción y purificación del ADN

Los pasos principales a realizar consisten en la homogenización de la muestra, la ruptura de la pared celular para liberar el DNA y la eliminación de los componentes que no sean ácidos nucleídos (proteína polisacáridos, etc.) Alternativamente a la preparación de los reactivos a partir de sus componentes se pueden recurrir a Kits de extracción y purificación de ADN preparados comercialmente.

3.4.3 Amplificación de ADN (Polimerase Chain Reaction (PCR))

Si bien las técnicas de clonación molecular son indispensables en la investigación bioquímica moderna, la PCR (Figura 6) permite sintetizar millones de copias de una secuencia de nucleótidos específica en unas cuantas horas. Puede amplificar la secuencia, incluso cuando la secuencia marcada represente menos de una parte por millón de la muestra inicial total. El método puede utilizarse para amplificar secuencias de ADN de cualquier fuente: virus, bacterias, hongos, plantas, o animales. (Mathews y col., 2002)

Los pasos de la PCR son los siguientes:

1.- Desnaturalización

Las dos cadenas de ADN utilizado como molde en la técnica son separadas mediante la incubación a una temperatura elevada (92-96°C).

2.- Hibridación de los cebadores

Las hebras disociadas permanecen en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la hibridación de los cebadores estos son oligonucleótidos sintéticos capaces de unirse a secuencias de ADN que con la región que se pretende amplificar. La temperatura utilizada por la hibridación dependerá de la secuencia de los cebadores, aunque se puede encontrar entre 55-60° C. La distancia entre ellos en el conjunto de ADN cebadores que determina la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

3.- Elongación a partir de los cebadores

El tercer paso en el procedimiento consiste en la elongación de la cadena complementaria a partir de los cebadores, por acción de una ADN polimerasa. Las

condiciones bajo las cuales se desarrolla este paso depende directamente del tipo de ADN polimerasa utilizada y el resultado del proceso es la formación de una copia de la cadena de ADN molde. (Mathews y col., 2002; Fernández, 1997).

En la técnica de PCR, cada conjunto de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación y elongación) constituye un ciclo. A partir del tercer ciclo se empieza a acumular el producto de interés, delimitado por los cebadores. A medida que aumenta el número de ciclos, el producto funciona como cadena molde a la que se unirán los cebadores presentes en la mezcla, conduciendo a una acumulación teóricamente exponencial del producto. En la mezcla se obtienen también otros productos distintos al de interés (los llamados productos largos), una de cuyas cadenas deriva de las cadenas originales de ADN. Sin embargo, estos productos en la mezcla queda diluida en cada paso respecto a la molécula de interés siendo prácticamente despreciable cuando se sobrepasa los 20 ciclos de la técnica (Mathews y col., 2002; Fernández, 1997).

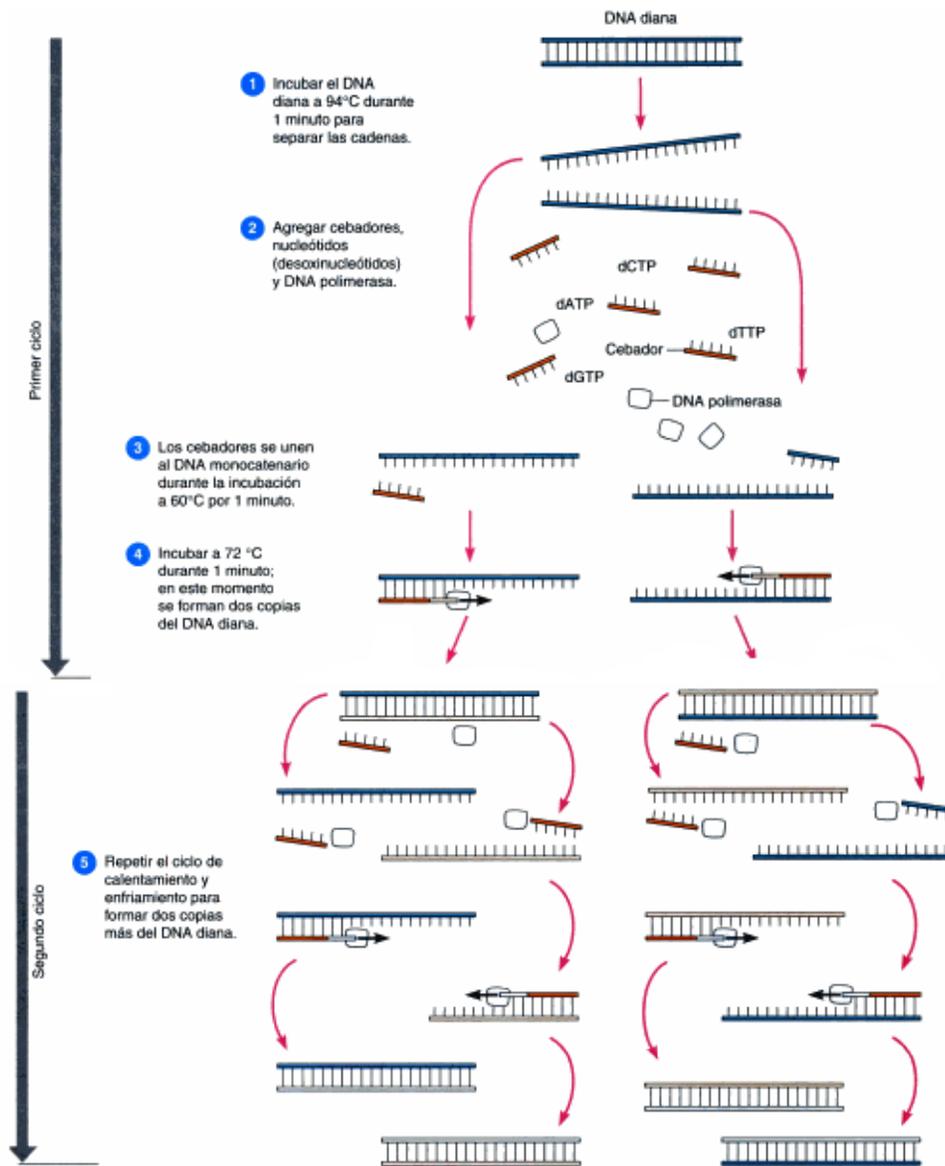


Figura 6. Pasos del proceso de la PCR (Tortorta G. 2007)

3.4.4 Detección de ADN

La detección del producto de la PCR puede lograrse de varias maneras, entre ellas mediante electroforesis en geles de agarosa.

Después de la PCR, la muestra se coloca en un gel de agarosa, los diferentes tamaños de ADN se separan por medio de una electroforesis.

La electroforesis es la migración de iones en un campo eléctrico, y se utiliza para la separación analítica de moléculas biológicas, como ADN o ARN.

La electroforesis en gel, que se halla entre los métodos más utilizados. Los geles más usados son de poliacrilamida y agarosa que forman una malla a través de la cual pasan los fragmentos de ADN. Los geles utilizados retardan las moléculas grandes en comparación con las de menor tamaño. Los geles con bajo contenido de agarosa permiten la separación de fragmentos de ADN relativamente grandes en distintos rangos de tamaño. El ADN presente en los geles se hace visible en forma mediante la adición de agentes que se intercalan al ADN de doble cadena y al irradiarlos con UV producen fluorescencia (Figura 7)

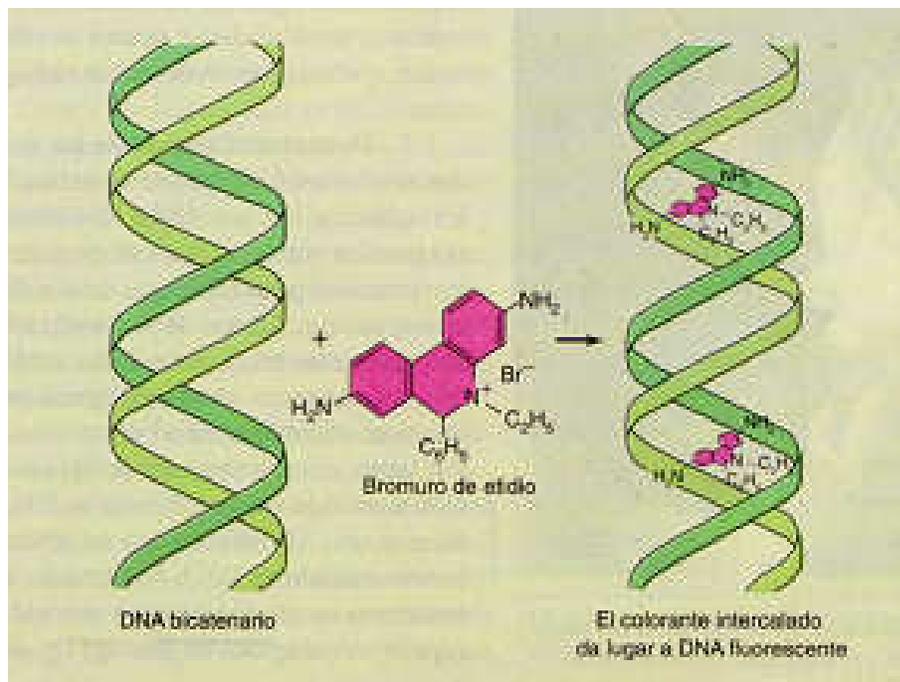


Figura 7. Unión de colorante al ADN de doble cadena.(MADIGAN y col. 2001).

En un gel teñido con Bromuro de etidio pueden detectarse cantidades de ADN tan pequeñas como 50ng. El resultados de la electroforesis se registra fotográficamente con una cámara digital o con filtros y lentes para capturar imágenes expuestas la luz UV (figura 8) (VOET, 2006; MAURER,2006).

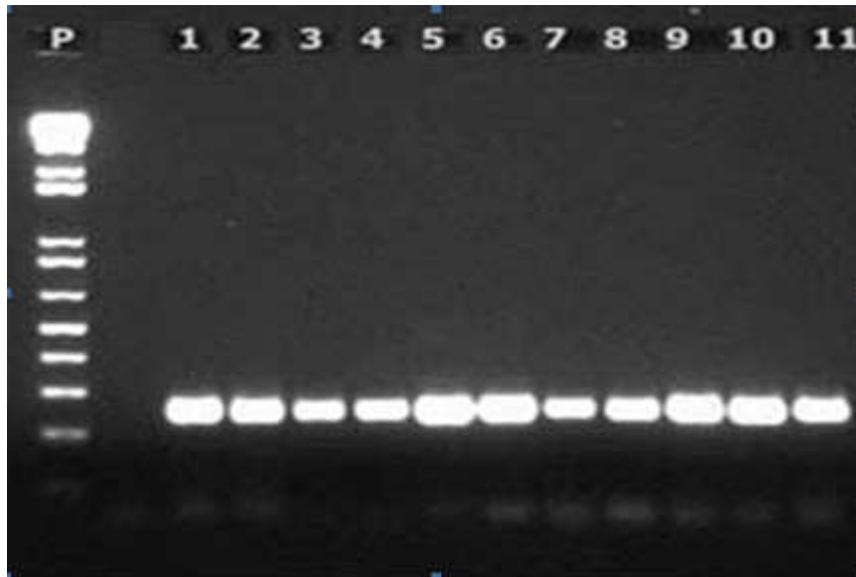


Figura 8. Electroforesis expuesta a luz UV. En donde P es el marcador de pares de bases para compararlo con las muestras colocadas en los carriles del 1 al 11. Las bandas que se muestran del carril 1 al 11 muestran la presencia de fragmentos de ADN amplificados por la técnica de PCR.

3.4.5 Determinación de la secuencia del ADN.

Aunque se puede determinar la secuencia de bases tanto del ADN como del ARN, es más fácil hacerlo en el primero. Actualmente existen máquinas automáticas para hacerlo. Para generar distintos fragmentos de ADN que terminen en cada una de las cuatro bases que están marcadas radiactivamente. Los fragmentos se separan por electroforesis de modo que las moléculas con diferencia de un nucleótido sean separables en el gel. Esta electroforesis requiere por tanto cuatro

carriles, uno por cada fragmento que termina en cada una de las bases que conforman al ADN, (adenina, guanina, citosina y timina). La posición de los fragmentos se localiza por autorradiografía y sabiendo que base representa cada carril es fácil leer la secuencia de nucleótidos en un fragmento de ADN.

Método de Sanger. En este método la secuencia se determina haciendo una copia de ADN monocatenario con la enzima ADN polimerasa. Esta enzima utiliza los desoxirribonucleósidos trifosfato como sustrato y los va añadiendo a un iniciador. En las mezclas de incubación (cuatro tubos) se añaden pequeñas cantidades de los cuatro análogos dideoxirribonucleosidos trifosfatos. Como los análogos carecen del oxidrilo 3', la cadena no puede crecer cada vez que la polimerasa los incorpora, por lo que actúa como auténticos finalizadores específicos de la cadena. Se obtienen fragmentos de diferente longitud dependiendo de las condiciones de incubación, que serán radiactivos bien por utilización de un iniciador radiactivo, bien por serlo los análogos dideoxi. La posición de las bandas se detecta por autorradiografía. Alineando las cuatro carreras y anotando la posición vertical de cada fragmento relativo a su vecino, es fácil ir leyendo la secuencia directamente en el filme de autorradiografía. (Madigan y col. 2001).

Para determinar una secuencia, como es el caso de un gen completo, es necesario proceder secuencialmente. Primero el ADN se rompe en fragmentos que se traslapan. Utilizando las secuencias que se traslapan como guía, se recompone la secuencia total. Se han desarrollado sistemas de secuenciación automatizada de ADN, que se basa en el método de Sanger, se utilizan colorantes fluorescentes para marcar los indicadores o las bases. Los productos se separan por electroforesis

automatizada y las bandas se detectan por espectroscopia fluorescente. En un procedimiento cada una de las cuatro reacciones utiliza un colorante diferente, de modo que las cuatro reacciones pueden desarrollarse en un único carril. Los resultados se analizan por medio de un computador con un código de colores para cada base (figura 9) (Madigan y col 2001).

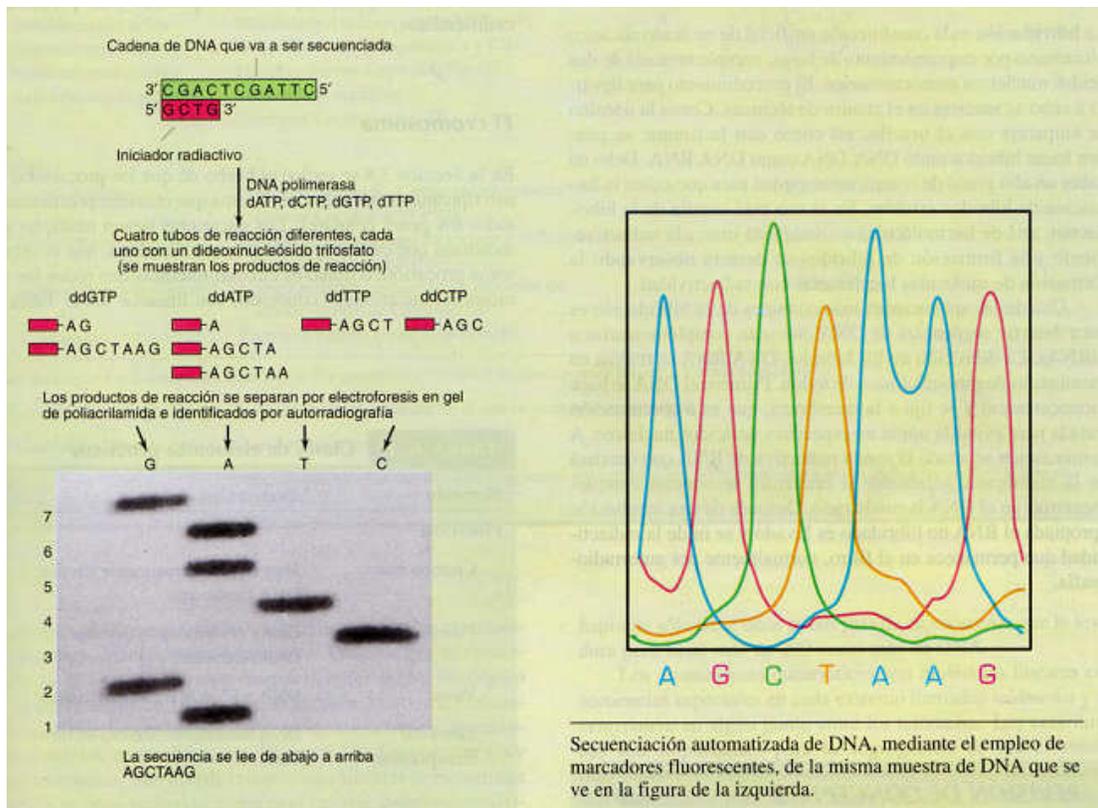


Figura 9. Secuenciación de DNA (Madigan y col. 2001).

3.4.6 Identificación de Microorganismos, mediante comparación de secuencias genéticas.

Las levaduras se pueden identificar mediante técnicas bioquímicas, genéticas y moleculares. Una vez conocida la secuencia de ADN de un microorganismo, esto

se puede comparar con secuencias que se encuentran en una base de datos, Gen Bank en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) localizado en E.U.A. o en los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) localizados en E.U.A. ([Bethesda](#), [Maryland](#)), a esta base de datos se puede acceder vía internet en la siguiente pagina www.ncbi.nlm.nih.gov. en donde se encuentran registradas secuencias de un gran número de microorganismos, en ésta se compara nuestra secuencia con la base arrojando un resultado, que muestra las similitudes de nuestra secuencia con otra secuencia ya identificada de la base de datos, y así sabemos de que microorganismo se trata.

4 -OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

- Determinar las características fisicoquímicas y microbiológicas de 3 muestras de “Queso de Poro” de Tabasco; e identificar las levaduras presentes en las mismas.

4.2 Objetivos Particulares:

- Determinar las características fisicoquímicas de las muestras de queso: acidez, Aw, humedad, grasa, proteína total y proteína soluble.
- Determinar las características microbiológicas de las muestras de queso: mesófilos aerobios, mesófilos anaerobios, coliformes totales, bacterias lácticas, hongos y levaduras.
- Aislar e identificar las levaduras presentes en las muestras de queso.
- Determinar las propiedades lipolíticas y proteolíticas de las levaduras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de queso que se utilizaron para el estudio fueron las siguientes tres marcas, El Tigre, Queso Usumancita y Quesería Teresita, las cuales se muestran en la figura 10.



Figura. 10 Muestras del “Queso de Poro” utilizadas en el estudio.

5.1.- Caracterización Físicoquímica

5.1.1 Determinación de Acidez

- a) Se pesaron 10 g de queso rallado.
- b) Se agregaron 105 mL. de agua a una temperatura de 40°C.
- c) Se agitó vigorosamente. (hasta deshacer muestra o para homogenizar)
- d) Se filtró.
- e) Se tituló en fracciones de 30 mL. de muestra con 0.1 N de NaOH (J. T Baker, Suecia) utilizando fenolftaleína (J. T Baker, Suecia) como indicador.

5.1.2 Determinación de la Actividad acuosa (Aw)

Preparación de la muestra:

Antes del análisis se tomaron muestras representativas de los quesos, a los cuales se les eliminó la corteza, se molieron y mezclaron hasta obtener una muestra homogénea, evitando la pérdida de humedad.

- a) Se calibró el instrumento (Aqua LAB-CX-2)
- b) Se colocó la muestra en la charola del instrumento de medición de Aw*
- c) La charola se introdujo en el instrumento y se tomó la lectura correspondiente.

* [Water activity](#) (actividad acuosa)

5.1.3 Determinación de proteína

5.1.3.1 Determinación de Proteínas Totales (Extracción con UREA)

Extracción de proteínas totales.

- a) Se disolvieron 1.2 g de queso en 50 mL de urea (J. T Baker E.U) 8M¹ (pH = 8).
- b) Se incubó el extracto en baño de agua a 37°C durante 2 h.
- c) Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min, a 4°C.
- d) Se filtró.
- e) Se realizó una diálisis de las muestras a 5°C durante 24 h en una membrana de celulosa (Millipore) para retener proteínas de 12 000 Da o mayores.

¹ Apéndice 1

5.1.3.2 Determinación de Proteínas Solubles (método de extracción de proteína con citratos).

- a) Se pesaron 5 g de queso.
- b) Se extrajeron con 20 mL de solución de citrato de sodio 0.5 M² + 40 mL de agua.
- c) Lo anterior se mezcló y se transfirió a un matraz volumétrico de 200 mL, se aforó con agua destilada.
- d) De la solución anterior queso-citrato se tomaron 50 mL y se agregaron 5 mL de HCl 1.41 M; se ajustó el pH a 4.4 ± 0.05 .
- e) Finalmente se filtró.

Al filtrado anterior le fue determinado el contenido de proteína mediante el método de Lowry.

5.1.3.2.1 Determinación de proteína por método de Lowry.

- I. Se mezclaron 50 volúmenes del reactivo A³, un volumen del reactivo B⁴ y un volumen del reactivo C⁵.
- II. A 1 mL de la muestra se agregaron 5 mL de la mezcla anterior, se incubó durante 10 minutos en oscuridad.
- III. Se agregaron 0.5 mL del reactivo D⁶ y se incubó durante 30 minutos en oscuridad.
- IV. Se determinó el contenido de proteína en un espectrofotómetro a 590 nm.
- V. La cantidad de proteína se obtuvo mediante una curva patrón de caseína (0-500 µg/mL).

² Apéndice 2, ³ Apéndice 3, ⁴ Apéndice 4, ⁵ Apéndice 5, ⁶ Apéndice 6.

5.1.4 Determinación de Humedad (Método gravimétrico)

La determinación de humedad se realizó midiendo la diferencia de peso, mediante la evaporación de agua en una estufa de desecación (Sybron, Type 19200) a 100° C.

Preparación de la muestra: antes del análisis se tomaron muestras de los quesos (3 g.) a las cuales se les eliminó la corteza. Posteriormente se molió para obtener una masa homogénea, y evitar así la pérdida de humedad.

Procedimiento:

- a) Se colocaron en la estufa de desecación charolas de aluminio las cuales se llevaron a peso constante por 24 h a 100°C.
- b) Se pusieron en las charolas 3 g de la muestra preparada y posteriormente se colocaron en la estufa durante 2 h a 100° C.

Una vez transcurrido el tiempo se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador con silica-gel (Brand, Alemania), durante 45 min.

- c) Se registro el pesó en una balanza analítica (Ohaus).
- d) A continuación se colocó nuevamente en la estufa por 1h, se enfrió en el desecador y se pesó.
- e) Se repitió el paso anterior hasta que la diferencia de dos pesadas sucesivas no fuera mayor a 0.5 emg.
- f) Se registró el peso final más bajo.

g) Se calculó el porcentaje de sólidos totales (ST), humedad (H) y el porcentaje de sólidos no grasos empleando la cantidad de grasa obtenida*.

*La grasa se obtuvo de acuerdo al procedimiento 5.1.5

5.1.5 Determinación de Grasa

El porcentaje de grasa fue determinado utilizando el método de Gerber

Preparación de la muestra:

Se tomó una muestra representativa de cada uno de los quesos (3 g.) las cuales se molieron, con el fin de obtener una masa homogénea.

Procedimiento:

- a) En un butirómetro para quesos (Geber, E.U.) se agregaron 10mL de ácido sulfúrico 80% (J. T Baker, México).
- b) Se agregó 1 ml de alcohol isoamílico (J. T Baker, México).
- c) Se agregaron 6 mL de agua (30-40°C) y 3 g. de muestra.
- d) Se tapó y colocó en baño maría a 65°C, agitándolo vigorosamente hasta disolver completamente
- e) Después de disolver las proteínas se dejó reposar en baño María a 65°C por 10 min.
- f) Se centrifugó por 5 min. en una centrifuga Gerber (K. Schneider & Co ag Hs 44. A Zurich Suiza) 1200 rpm, 55-60°C.
- g) Se tomó la lectura del porcentaje de grasa en la escala del butirómetro.

5.2 Caracterización Microbiológica

5.2.1 Preparación de la muestra para su análisis:

En la bolsa del stomacher (Daigger, E.U) se colocaron 10 g de queso.

- a) Se agregaron 90 mL de agua peptonada⁷ y se cerró perfectamente.
- b) Se introdujo al stomacher y se encendió a una velocidad de 200 rpm durante 1 min.
- c) La muestra con el agua peptonada procesada por el stomacher se tomó como la dilución 1/10.
- d) Con una pipeta estéril, se tomó 1 mL de la dilución 1/10 y se transfirió a un tubo que contenía 9 mL de agua peptonada y se agitó; esta fue la dilución 1/100
- e) Se tomó 1 mL de la dilución 1/100 y se transfirió a un tubo que contenía 9 mL de agua peptonada.
- f) El procedimiento anterior se repitió hasta llegar a la dilución 10^{-7} .

El procedimiento anterior fue aplicado a cada una de las diferentes muestras de queso.

5.2.2 Cuenta de Microorganismos (bacterias lácticas, coliformes totales, mesófilos aerobios, anaerobios, hongos y levaduras)

- I. Se sembraron por el método de Miles y Misra las muestras y sus diluciones.
 - a) Se prepararon cajas petri con diferentes agares dependiendo del microorganismo que se determinó. (Bacterias Lácticas-MRS (Difco, USA), Mesófilos aerobios-Agar Nutritivo (Bidico, México), Coliformes Totales–Eosina Azul de Metileno

⁷, Apéndice 7

- a) “EMB” (BD Bioxon, México), Hongos y Levaduras–Agar Papa Dextrosa- PDA (BD Bioxon, México).
- b) Para cada caso se dividieron las cajas con agar en 4 cuadrantes.
- c) Se identificó cada cuadrante de la placa con la dilución correspondiente.
- d) En cada cuadrante se sembraron 5 μ L de la muestra con las diluciones correspondientes, por duplicado.
- e) Se dejó reposar sobre una superficie plana aproximadamente 1 hora para que se absorbieran los 5 μ L de muestra por el agar.
- f) Pasado el tiempo se invirtieron las cajas y se incubaron a la temperatura correspondiente para cada microorganismo (Tabla 3).
- g) Después de la incubación se seleccionaron las placas que tenían colonias aisladas en el área donde se colocó la gota, se dio preferencia a aquellas que contenían menos de 40 colonias por gota (el ideal de 10 a 20).
- h) Se realizaron los cálculos correspondientes.

Tabla. 3 Características de incubación de microorganismos.

Microorganismo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Medio de Cultivo
Mesófilos Aerobios	37°C	24h	Agar Nutritivo
Coliformes Totales	37°C	24h	EMB
Bacterias Lácticas	37°C	24h	MRS
Hongos y Levaduras	25°C	5 días	PDA

II Para mesófilos anaerobios se realizó el siguiente procedimiento:

- a) El medio de cultivo (Agar Nutritivo) se esterilizó y mantuvo en un baño maría a 45 °C durante su uso.

- b) Se agitó el contenido de la dilución 1/1000 y se tomó 1 mL de la muestra y se colocó en el centro de la caja marcada con la dilución correspondiente.
- c) Se inocularon las cajas petri correspondientes con las diluciones restantes.
En condiciones de esterilidad, se añadió a cada una de las cajas inoculadas de 15 a 20 mL de agar nutritivo, el cual se mantuvo a 45°C. con el fin de evitar la solidificación del mismo y para no provocar la muerte de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura durante la homogenización de la muestra.
- d) Se colocaron las cajas en la superficie de la mesa y suavemente se realizaron los siguientes movimientos: 6 veces en el sentido de las manecillas del reloj, describiendo círculos de aproximadamente 15 cm de diámetro; 6 veces en sentido contrario; 6 veces de adelante hacia atrás, con un recorrido de alrededor de 15 cm y 6 veces en sentido lateral
- e) En una jarra de anaerobiosis, se dejó solidificar el medio, se invirtieron las cajas y se incubó a 37 °C por 24 h.
- f) Después de la incubación, se seleccionaron las placas que mostraron entre 30 a 300 colonias.
- g) Se calculó la cantidad de microorganismos por gramo de la muestra:

5.2.3 Purificación:

- a) De las cajas petri donde se realizó la cuenta de las levaduras, se seleccionaron las colonias aisladas.

b) Por estría cuadrante radial se transfirió cada una de éstas a una caja petri con medio PDA.

c) Se invirtieron las cajas y se incubaron a 25°C durante 5 días.

Se repitió el procedimiento anterior hasta que el crecimiento de las levaduras en la placa fue homogéneo y no se observó algún tipo de contaminación con colonias de diferente morfología. Se verificó la pureza de las colonias aisladas realizándoles una tinción de Gram.

5.2.4 Actividad Proteolítica y Lipolítica

5.2.4.1 Actividad proteolítica*

- a) Se preparó el agar leche⁸
- b) El medio se vació en las cajas petri y se dejó solidificar.
- c) Se tomó una muestra de la colonia purificada y se sembró en la caja petri por picadura.
- d) Se incubó a 25°C durante 5 días
- e) Se revisaron las placas (positivas: si forman un halo alrededor de la colonia).
- f) Se reportó la actividad proteolítica positiva o negativa.

5.2.4.2 Actividad lipolítica

- a) Se preparó el medio de agar tributirina.⁹
- b) El medio se vació en las cajas petri y se dejó solidificar.

⁸ Apéndice 8, * Como las levaduras crecen lentamente se sembró por triplicado para obtener mayor cantidad de células. ⁹ Apéndice 9,

- c) Se tomó una muestra de la colonia purificada y se sembró en la caja petri por picadura.
- d) Se incubó a 25°C durante 5 días.
- e) Se revisaron las placas (positivas: si forman un halo alrededor de la colonia).
- f) Se reportó la actividad lipolítica positiva o negativa.

5.3 Identificación de las levaduras

5.3.1 Preparación de la muestra para identificación

- a) Se preparó caldo YM¹⁰ en tubos de ensayo con rosca. Se inoculó cada tubo con una colonia de las levaduras purificadas.
- b) Se incubó a 25° C por 48 h.
- c) Se transfirió el contenido de los tubos a un tubo para centrifuga de 15 mL, en caso necesario se utilizaron dos tubos.
- d) Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos.
- e) Se decantó el medio de cultivo.
- f) Se resuspendió el botón celular en agua estéril se juntó el contenido de los dos tubos, en los casos necesarios.
- g) Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min.
- h) Se eliminó el agua, y se almacenó el botón celular a 4°C, hasta realizarse la extracción del ADN, para su posterior uso o procesamiento.

¹⁰ Apéndice 10, * Como las levaduras crecen lentamente se sembró por triplicado para obtener mayor cantidad de células.

5.3.2 Extracción de ADN

Se utilizó un Kit para la extracción de ADN (WIZARD Genomic DNA Purification Kit), siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- a) Se disgregó del botón celular de la muestra ya aislada.
- b) Se resuspendió el botón celular en 293 μ L de EDTA (J. T Baker E.U) 50 mM (pH 8).
- c) Se adicionaron 7.5 μ L de una solución de 20 mg/ml de liticasa y se resuspendió por pipeteó para mezclar perfectamente.
- d) Se incubó la muestra a 37° C por 30 min. (para digerir la pared celular).
- e) Se enfrió a temperatura ambiente.
- f) Se centrifugó la muestra a 14000 rpm por 2 min. y se removió el sobrenadante.
- g) Se adicionaron 300 μ L de solución de lisis del núcleo y se mezcló por pipeteo suavemente hasta que se resuspendió totalmente.
- h) Se adicionaron 100 μ L de solución precipitadora de proteínas y se agitó vigorosamente en vortex a velocidad máxima por 20 segundos.
- i) Se colocó la muestra en hielo durante 5 min.
- j) Se centrifugó la muestra a 14000 rpm por 3 minutos.
- k) Se transfirió el sobrenadante, que contenía el ADN, a un tubo limpio de 1.5 mL el cual contenía 300 μ L de isopropanol a temperatura ambiente.
- l) Cuidadosamente se invirtió el tubo hasta que se formó un hilo visible (una masa blanca), de ADN.
- m) Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min.

- n) Cuidadosamente se decantó el sobrenadante y se escurrió el exceso.
- o) Se adicionaron 300 μL de etanol (70%) y se lavo el botón de ADN por inversión suave.
- p) Se centrifugó a 13000-16000 rpm por 2 min.
- q) El etanol fue removido con una micropipeta.
- r) Se inclinó el tubo sobre un papel absorbente y se dejó secar de 10 a 15 min. (se consideró seco cuando todo el pellet adquirió una coloración blanca).
- s) Se adicionaron 30 μL de solución rehidratadora de ADN
- t) Posteriormente se le realizó una electroforesis en gel de agarosa a cada una de las muestras, esto para verificar la presencia de ADN.
- u) Se almacenó el ADN de 2 a 8 $^{\circ}\text{C}$.

5.3.3 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

- a) Se preparó un tubo de 200 μL con la siguiente reacción (Tabla 4) en un baño de hielo.

Tabla. 4 Componentes de la reacción

	Concentración	Volumen
DNA molde (1:100)	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1 μL
Primer ITS 5 ¹¹	1 μM	2.5 μL
Primer ITS4B ¹¹	1 μM	2.5 μL
Buffer	1x	10 μL
H ₂ O	---	31.5 μL
Mg ²⁺ (Promega)	2.5 μM	1 μL
Taq. Polimersa (Promega)	2.5u/ μL	0.5 μL
dNTPmix*(Promega)	200 μM	1 μL
VOL. TOTAL		50 μL

*Mezcla de nucleótidos: dATP, dCTP, dGTP, y dTTP.

¹¹ Apéndice 11

- b) Se aplicaron 30 ciclos de la reacción (Tabla 5) empleando un termociclador (Mastercycler-gradient Ependorf - España).

Tabla 5. Características de los ciclos

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	45 seg
Hibridación	60°C	45 seg.
Elongación	72°C	1min

- c) Al terminar el proceso se verifico el estado de la muestra mediante una electroforesis en gel de agarosa 0.7% para verificar el buen estado de las muestras.

5.3.4 Purificación de ADN

Para purificar el ADN se utilizó un Kit (QIAGEN) mediante el siguiente procedimiento (QIAquick PCR Purificación Kit Protocol)

- a) Se transfirió la muestra de los tubos de PCR a unos tubos de 1.5mL.
- b) Se adicionaron 3 volúmenes de Buffer QX1 para 1 volumen de muestra y se mezcló por inversión. Suave.
- c) Se verificó que la muestra adquiriera un color amarillo, en caso de que de que adquiría un color naranja o morado se adicionaron 10 µL de acetato de sodio
- d) (3M) a pH 5 y se mezcló perfectamente.
- e) Se resuspendió agregando QIAEX II.
- f) Se incubó a temperatura ambiente por 10 min.
- g) Se mezcló cada 2 minutos para mantener el QIAEX II en suspensión

- h) Se centrifugó la muestra a 13000 rpm por 30 segundos y posteriormente se removi6 el sobrenadante.
- i) Se lav6 el bot6n celular pellet 2 veces con 500 µL de buffer PE.
- j) Se dej6 secar el bot6n celular durante 10-15 min. hasta que todo el pellet adquiri6 un color blanco uniforme.
- k) El bot6n celular que se obtuvo de ADN fue resuspendido en agua.

5.3.5 Electroforesis

- a) Se prepar6 un gel de agarosa (Invitrogen) al 0.7% disuelta por calentamiento en microondas en tamp6n TAE¹² 1x.
- b) Se prepar6 la muestra con los componentes mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6 .Componentes para preparar la muestra

	Volumen
Muestra	3 µL
Bromuro de Etidio ¹³	2 µL
Agua	15 µL
Volumen Total	20 µL

Se prepar6 el marcador con los siguientes componentes: (Tabla 7)

Tabla 7. Componentes para preparar el marcador

	Volumen
Marcador 1kb ^{*,14} (Promega)	5 µL
Bromuro de Etidio ¹³	2 µL
Agua	13 µL
Volumen Total	20 µL

¹² Ap6ndice 12, ¹³ Ap6ndice 13, ¹⁴ Ap6ndice 14

- c) El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal y se le agregó buffer TAE 1x.
- d) Se cargó el ADN en el gel cuidadosamente.
- e) Le fue aplicada una diferencia de potencial de 90 voltios para la migración del DNA durante 1 hora.
- f) Se reveló con luz ultravioleta.

5.3.6 Secuenciación

Las muestras de ADN purificado que estaban puras fueron enviadas a secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

6. Resultados y Discusión

El “queso de Poro” es uno de los productos característicos de la región de Balancan, en el estado de Tabasco, por esta razón los productores quieren ampliar su mercado exportándolo a otros estados de la República Mexicana, por lo que deben de cumplir con los estándares de calidad que marcan las Normas. Por lo anterior en el presente trabajo se determinan sus características fisicoquímicas y microbiológicas, para que mediante los resultados y normalización del proceso este queso pueda ser exportado.

6.1 Caracterización Fisicoquímica

La maduración y el sabor del queso son dos factores que se ven afectados directamente por el crecimiento de la microbiológica que se desarrolla en ellos, ésta depende de diversos factores, entre los que destacan: actividad de agua (A_w), pH y temperatura de maduración (Fox y col. 2000).

Debido a ésto se desarrolló el presente trabajo, en el cual se determinó la actividad de agua, humedad, grasa, acidez y cantidad de proteína presente en el “Queso de Poro”, dicho estudio se realizó en tres productos de marcas comerciales: Queso Teresita[®], Queso Tigre[®] y Queso Usumacinta[®].

6.1.1 Determinación de acidez

El pH es un factor muy importante que regula el crecimiento microbiano y por ende se relaciona íntimamente con la descomposición y el riesgo de transmisión de enfermedades a través de los alimentos, particularmente del queso, estas dos propiedades también determinan el tipo de flora que puede desarrollarse durante su elaboración y maduración, contribuyendo así con su sabor (Centeno y García; 1994).

Con los valores de acidez obtenidos podemos sugerir que parte de la flora existente en este tipo de queso fueron las levaduras, ya que éstas metabolizan el ácido láctico.

Cuando parte de la lactosa ha sido convertida en ácido láctico, los contenidos de ácido láctico en quesos oscilan entre 0.2 % (Camembert) y 1.3 % (Cheddar) (Scott, 2002).

Comparando lo anterior con los valores obtenidos en la determinación de acidez podemos decir que el “Queso de Poro” tiene una acidez baja (0.32-0.58).

La tabla 8 muestra los valores obtenidos por duplicado de la determinación de acidez en el “Queso de Poro”, mostrando los pesos y los mililitros gastados de NaOH para la titulación de cada una de las muestras.

Tabla 8. Acidez en el “Queso de Poro”

QUESO	Peso	% Acidez	% Acidez	Prom. % Acidez
		Muestra 1	Muestra 2	
USUMACINTA [®] 1	10.24	0.44	0.31	0.32
USUMACINTA [®] 2	10.08	0.29	0.25	
TERESITA [®] 1	10.09	0.44	0.48	0.47
TERESITA [®] 2	10.04	0.51	0.45	
TIGRE [®] 1	10.01	0.67	0.64	0.58
TIGRE [®] 2	10.01	0.48	0.51	

6.1.2 Determinación de la Actividad acuosa (Aw)

En cuanto a las levaduras crecen a una Aw menor en comparación con las bacterias, la mayoría de las bacterias requieren un mínimo de Aw de 0.92 para su crecimiento, mientras que las levaduras requieren un mínimo de 0.83 (Fox y col. 2000).

Como se puede observar, los resultados que obtuvimos de Aw oscilaron entre 0.94 y 0.96 (Tabla 9); apoyándonos en la figura 9 podemos decir que en este intervalo las levaduras y los hongos tienen una mayor velocidad de desarrollo que las bacterias, ya que éstas están cerca del límite de crecimiento.

Tabla 9. Aw en muestras analizadas

Muestra	Temperatura (°C)	Aw	Promedio Aw
Usumacinta® 1	26.5	0.96	0.96
Usumacinta® 2	26.5	0.96	
Teresita® 1	25.8	0.95	0.95
Teresita® 2	26.1	0.95	
Tigre® 1	26.2	0.94	0.94
Tigre® 2	26.1	0.94	

En la figura 11 se representa la velocidad a la que crecen los microorganismos a diferente valor de Aw, la línea roja señala el valor de Aw encontrado en las muestras de “Queso de Poro”.

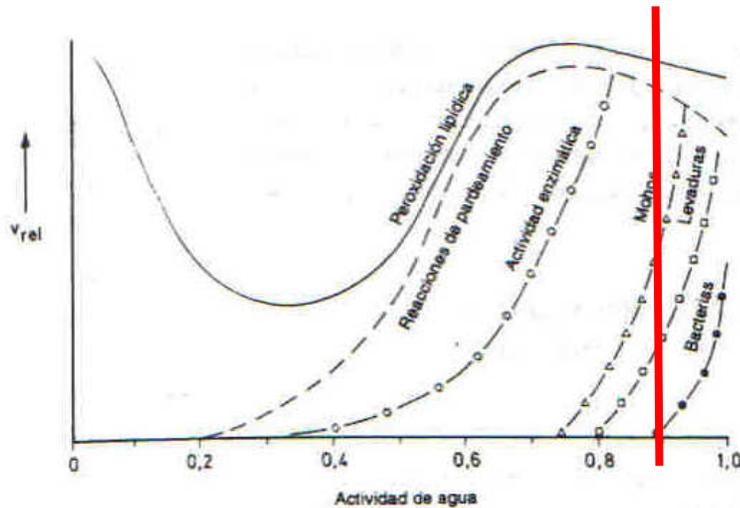


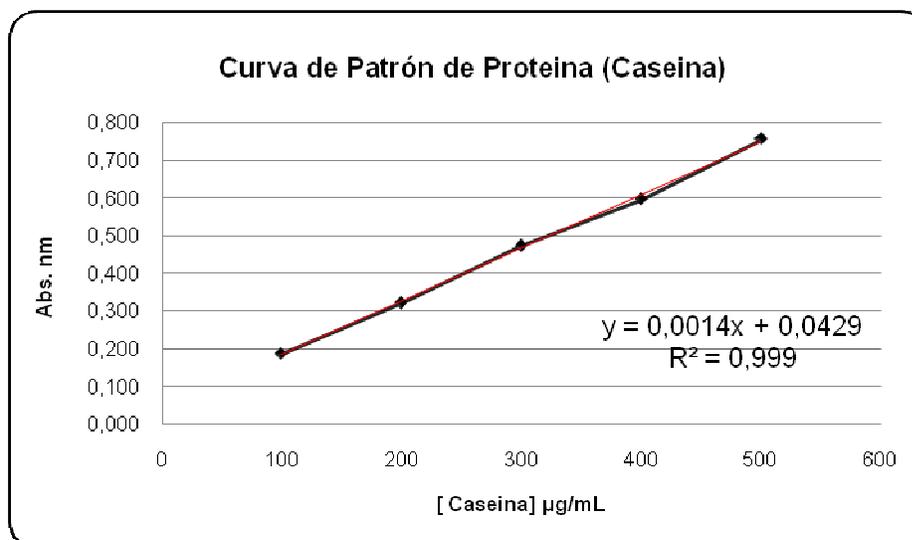
Figura 11. Velocidad a la que crecen los microorganismos en los alimentos en función de la actividad del agua a 20°C. Tomado de: Belitz (1997).

Respecto a las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, éstas representan el mayor problema de brotes infecciosos asociados a quesos en México; así mismo, la intoxicación microbiana con *Staphylococcus aureus* es otro grave problema a nivel nacional, este microorganismo es la bacteria toxipatogénica más resistente a bajo A_w , reportándose su crecimiento a un valor de 0.86; sin embargo no es capaz de producir su toxina a valores de A_w menores a 0.93 (Centeno y García, 1994).

Con esta información podemos decir que los valores de A_w que obtuvimos no son lo suficientemente bajos para inhibir el desarrollo de bacterias patógenas; cabe señalar que además las muestras analizadas presentan un medio adecuado para el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y su toxina, la cual puede afectar al consumidor.

6.1.3 Determinación de proteína

Para obtener los resultados de las determinaciones de proteínas por la técnica de extracción con urea se obtuvo una curva patrón de caseína, la cual se muestra a continuación:



Gráfica 1. Curva Patrón de Proteína

6.1.3.1 Determinación de proteínas total (Extracción con urea)

Los resultados obtenidos en la determinación de proteína por medio del método de extracción se muestran en la tabla 10, dicho método se realizó a pH 8, ya que a este valor se logra cuantificar adecuadamente la proteína total presente en el queso.

Tabla 10. Contenido de proteína total (Urea)

QUESO	Peso muestra (g)	Abs	% Humedad	% Proteína	% de Proteína en extracto seco	% Prom.
USUMACINTA 1	1.27	0.14	36.92	26.48	41.97	42.31
USUMACINTA 2	1.27	0.14	37.26	26.76	42.65	
TERESITA 1	1.24	0.13	40.39	25.33	42.49	50.07
TERESITA 2	1.24	0.16	40.61	34.24	57.65	
TIGRE 1	1.25	0.15	29.11	31.17	43.96	44.15
TIGRE 2	1.25	0.16	26.49	32.60	44.34	

La proporción de proteína en los quesos generalmente es muy variable, depende de la tecnología empleada y el tipo de queso; por ejemplo, un queso fresco contiene 8.2% de proteína, el queso Brie y el queso Cheddar contienen 25.5%,

mientras que el queso Parmesano contiene alrededor de 38.6 %. Se puede decir que el contenido de proteína oscila entre 8 % en quesos frescos y alrededor de 40 % en quesos de pasta prensada cocida. (Rodríguez 2007).

De los resultados obtenidos se observa que las muestras contienen entre 42.31% y 50.07% de proteína en base seca, esto es de gran importancia debido a que la maduración es un proceso que involucra la proteólisis, y las proteínas son sustrato para esta reacción mediante la cual se generan compuestos participes del sabor y olor del queso tales como: aminoácidos, aminos, amoniaco, ácidos volátiles (acético, propiónico, isobutírico, etc.), alcoholes, compuestos azufrados compuestos aromáticos (fenol e indol) y pirazinas (Rodríguez 2007). El contenido de proteína concuerda con el de quesos madurados tales como Cheddar, Suizo y Gruyere lo que implica que el queso de poro tiene un valor alto de proteínas.

6.1.3.2 Determinación de proteína soluble (método de extracción con citratos).

Para la determinación de las proteínas solubles se empleó la extracción con citrato; ya que la proteína se extrae a un pH de 4.5, esta técnica permite solubilizar proteínas de suero y péptidos.

La determinación de la proteína de suero resulta importante debido a que ésta es una proteína higroscópica y puede influir en la humedad del queso y favorecer así el crecimiento de la flora bacteriana.

Los resultados que se obtuvieron mediante este método se muestran en la Tabla 11 del mismo modo se muestran los pesos y la absorbancia de cada una de las muestras.

Tabla 11. Contenido de Proteína Soluble

QUESO	Peso de la muestra (g)	Abs.	% Proteína	Prom. % Proteína
USUMACINTA[®] 1	5.16	0.40	1.00	1.03
USUMACINTA[®] 2	5.16	0.43	1.06	
USUMACINTA[®] 3	5.16	0.41	1.02	
TERESITA[®] 1	5.03	0.74	1.98	2.06
TERESITA[®] 2	5.03	0.78	2.09	
TERESITA[®] 3	5.03	0.74	2.13	
TIGRE[®] 1	5.09	0.68	1.77	1.78
TIGRE[®] 2	5.09	0.68	1.79	
TIGRE[®] 3	5.09	0.68	1.78	

Esta determinación es de suma importancia ya que las muestras analizadas presentan un proceso de maduración, el cual involucra la proteólisis, y como se dijo anteriormente las proteínas son sustrato para esta reacción, además que participan en la generación de compuestos que influyen en el sabor y olor del queso como: aminoácidos, aminas, amoniac, ácidos volátiles, alcoholes, compuestos azufrados compuestos aromáticos y pirazinas.

6.1.4 Determinación de Humedad y Grasa

Los resultados obtenidos de las determinaciones de grasa y humedad se muestran a continuación (Tabla 12).

Tabla 12.Contenido de humedad y grasa en las muestras de quesos de poro.

Muestra de Queso	Peso de la muestra (g)	% Grasa	% Humedad	% GES*	% Hs/MG**	PROM. % GES*	PROM. % Hs/MG*
USUMACINTA [®] 1	2.95	36.00	36.92	57.07	57.69	57.23	57.95
USUMACINTA [®] 2	2.98	36.00	37.26	57.38	58.22		
TERESITA [®] 1	2.94	31.00	40.39	52.00	58.54	52.52	58.91
TERESITA [®] 2	2.96	31.50	40.61	53.04	59.28		
TIGRE [®] 1	2.94	41.50	29.11	58.54	49.76	59.88	48.96
TIGRE [®] 2	3.00	45.00	2 6.49	61.22	48.16		

* %GES: Porcentaje de grasa en extracto seco.

** %Hs/MG: Humedad de extracto magro.

La gran variedad de quesos que existe en el mundo dificulta la clasificación de éstos, ya que a pesar de que tienen propiedades semejantes muchas de ellas no son comunes a todos los quesos. De acuerdo a la humedad en materia magra del queso la clasificación es la siguiente: Quesos muy duros tienen una humedad de <51%, quesos duros de 49-56% de humedad, quesos semiduros 54-63 % de humedad, quesos semiblandos de 61-69% de humedad, quesos blandos de 67-76% de humedad y los quesos frescos de 73-83% de humedad. En base a la cantidad de grasa que contienen los quesos en materia seca, estos se clasifican en: Quesos extra graso del 60-85% de grasa, queso súper graso del 50-60% de grasa, queso graso 45-50% de grasa, quesos semigraso 25-45% de grasa, semimagro 10-25% de grasa y queso magro <10% de grasa.

Con base a los resultados obtenidos, podemos sugerir que el “Queso de Poro” se clasifica con respecto al contenido de grasa como un queso súper graso (57.23-59.88 %). El contenido de humedad de las muestras de queso Usumacinta y Teresita (57.95-58.91% respectivamente) corresponde al reportado para los quesos semiduros; con un porcentaje de humedad 54-63 % en cambio la muestra Tigre

(48.96%) podría clasificarse como un queso duro, cuyo porcentaje de humedad oscila entre 49–56 %.(Ref. Belitz, 1997)

La causa de que este tipo de queso tenga un contenido de humedad diferente puede deberse al proceso con el cual se produce, ya que éste no se encuentra estandarizado, y dependiendo del productor, varía el tiempo en que se corta la cuajada, dando lugar a la variación de la cantidad de suero que se retiene en el queso.

El alto contenido de grasa, es importante, ya que la grasa es el sustrato de la reacción de lipólisis, la cual se lleva a cabo en el queso por diferentes microorganismos y prácticamente esta reacción produce su olor y sabor característico.

Así mismo, la mayor parte de las levaduras encontradas presentaron actividad lipolítica, estas levaduras son capaces de actuar sobre la grasa, lo cual da lugar a un sabor y olor peculiar en el “Queso de Poro”, producto de la liberación de compuestos como ácidos grasos libres, metilcetonas, alcoholes secundarios, derivados del ácido oleico, ésteres y productos de sistemas enzimáticos (Varnam y Sutherland, 1995).

6.2 Caracterización microbiológica

Los quesos desde el punto de vista microbiológico, deben considerarse como medios de cultivo sólidos en los que se multiplican microorganismos como: bacterias lácticas, micrococos, levaduras y mohos. Aunque muchos son microorganismos deseables en el queso, algunos forman parte de una flora asociada no deseable y se encuentran en éste por la leche o por contaminaciones en el transcurso de su

elaboración, son las llamadas bacterias contaminantes, entre las cuales pueden encontrarse organismos patógenos. (Rodríguez 2007).

Desde luego para obtener la denominación de origen e incluso para promover decididamente la comercialización de estos quesos, deben cumplirse las especificaciones de la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS; para verificarla deben usarse los métodos oficiales de análisis, señalados también en la misma (Rodríguez 2007).

6.2.1 Cuenta de Microorganismos (Unidad Formadora de Colonias UFC)

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico se muestran (tabla 13), los cuales revelaron que en general las cuentas de microorganismos de las muestras de queso que se analizaron fueron muy altas en coliformes totales, mesófilos aerobios, mesófilos anaerobios, hongos y levaduras. Los resultados fueron comparados con los límites establecidos por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

Tabla 13. Comparación de la cuenta microbiológica de las muestras con la NOM.

Microorganismo	NOM-121-SSA1-1994 Lim. Max. UFC/g	Muestra		
		Tigre UFC/g	Usumacinta UFC/g	Teresita UFC/g
Mesófilos Aerobios	No aplica	1.4×10^8	7.8×10^7	4.0×10^7
Mesófilos Anaerobios	No aplica	2.0×10^{11}	5.0×10^{12}	1.0×10^7
Bac. Lácticas	No aplica	1.1×10^{10}	5.7×10^8	1.6×10^9
Coliformes Totales	No aplica	9.4×10^7	4.2×10^7	1.3×10^7
Psicrotrófos	No aplica	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
Hongos	No aplica	2.0×10^6	Sin desarrollo	2.0×10^6
Levaduras	No aplica	4.8×10^7	1.3×10^8	1.3×10^8
Hongos y levaduras	500	5.0×10^7	1.3×10^8	1.3×10^8

El presente trabajo es la primera caracterización de este tipo de queso, para ello se utilizó la técnica de Miles y Misra; no obstante, al no ser el método oficial no se pudo concluir sobre el cumplimiento de la NOM correspondiente, sin embargo, si se logró tener una idea clara de los microorganismos presentes en el queso.

En cuestión de los mesófilos aerobios y mesófilos anaerobios, el objetivo de la cuantificación fue la caracterización de la flora presente en las muestras de queso.

En el caso de las bacterias lácticas, se observó que la NOM no reporta límites para estos microorganismos, sin embargo, los resultados que obtuvimos muestran una población importante de ellos (Tigre 1.1×10^{10} UFC, Usumacinta 5.7×10^8 UFC, Teresita 1.6×10^9 UFC), esto puede explicarse debido a la inoculación y maduración a las que se sometió cada muestra.

En el tema de los coliformes totales, las cuentas fueron muy elevadas (Tigre 9.4×10^7 UFC/g, Usumacinta 4.2×10^7 UFC/g, Teresita 1.3×10^7 UFC/g); esto ya se esperaba, debido a que el queso se elabora con leche bronca, además que en su proceso de elaboración no se contó con ninguna condición de refrigeración, el proceso de maduración se realizó a temperatura ambiente (Temperatura promedio del estado de Tabasco $31 \pm 1^\circ\text{C}$); tales condiciones son consideradas adecuadas para el desarrollo de estos microorganismos.

Con respecto En el caso de los psicrófilos, no se observó crecimiento, esto se debió a que el proceso no contó con ningún tipo de refrigeración y en el estado de Tabasco las condiciones de temperatura no son las adecuadas para favorecer desarrollo de estos microorganismos.

Con relación al contenido de hongos y levaduras (Tigre 5.0×10^7 UFC/g, Usumacinta 1.3×10^8 UFC/g, Teresita 1.3×10^8 UFC/g), éstos rebasaron los límites

permitidos por la NOM (500UFC/g); esto se atribuyó a que este queso se elabora con leche bronca y la NOM contempla los quesos que son elaborados con leche pasteurizada, por lo que se recomienda pasteurizar la leche para la elaboración de este tipo de queso para cumplir con los límites de la NOM.

6.2.2 Morfología de los microorganismos encontrados

Después de cuantificar los microorganismos presentes en el queso de poro, se aislaron las levaduras en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

La mayoría de las levaduras aisladas del “Queso de Poro” de Tabasco producen un olor característico que se intensifica conforme crecen en las cajas petri.

Las tablas 14, 15 y 16 muestran las características de cada una de las levaduras aisladas de las muestras de queso: color, elevación, borde, superficie, consistencia y forma. El olor que presentó cada una de las levaduras aisladas fue evaluado en cuanto a su intensidad (olor a queso).

Tabla 14. Caracterización de las levaduras aisladas del queso Usumacinta®

QUESO USUMACINTA®							
Col.	Color	Elevación	Borde	Forma	Superficie	Consistencia	Olor a queso***
1	Blanca	Plana	S/B*	Amiboide, centro elevado, alrededor translucido	Poco Brillosas	Suave y Espesa	+
2	Crema	Convexo	Entero	Circular, rugosa, centro grande liso	Brillosa	Suave	S/O**
3	Crema	Convexo	Entero	Circular	Brillosa	Suave y Espesa	+
4	Blanca	Planas	S/B*	Circular	Brillosa	Suave	+
5	Crema	Convexo	Entero	Circular y rugosa en el centro	Opaca	Dura y Espesa	++
6	Crema	Convexo	Entero	Circular	Opaca	Suave y Espesa	++

*S/B = Sin Borde, **S/O = Sin olor, ***+ representa bajo, ++ medio y +++ intenso

Tabla15. Caracterización de las levaduras aisladas del Queso Teresita®

QUESO TERESITA®							
Col.	Color	Elevación	Borde	Forma	Superficie	Consistencia	Olor a queso**
1	Crema	Convexo	Entero	Circular	Brillosa	Suave	+++
2	Crema	Plana	S/B*	Amiboide, centro mas grueso	Opaca	Suave	+
3	Crema	Convexo	Crenado	Circular	Opaca	Suave y Espesa	+
4	Crema	Convexo	Entero	Circular, centro grande	Opaca	Suave y Espesa	++
5	Blanca	Plana	S/B*	Amiboide, centro elevado, alrededor translucido	Opaca/ Brillosa	Suave y Espesa	+++
6	Crema	Rugosa al centro	Entero	Circular y Grande	Opaca	Dura y Espesa	+
7	Crema	Convexo	Entero	Circular rugosa en el centro	Opaca	Suave y Espesa	+
8	Blanca	Plana	S/B*	Circular	Brillosa	Suave	++

* S/B = Sin Borde.

** + bajo, ++ medio y +++ intenso.

Tabla 16. Caracterización de las levaduras aisladas del Queso Tigre®

QUESO TIGRE®							
Col.	Color	Elevación	Borde	Forma	Superficie	Consistencia	Olor a queso*
1	Blanca	Convexo	Entero	Redonda	Brillosa	Suave y Espesa	+
2	Crema	Convexo	Entero	Circular, rugosa con el centro grande liso	Brillosa	Suave y Espesa	+
3	Crema	Convexo	Entero	Circular, rugosa	Opaca	Suave y Espesa	+
4	Crema	Convexo	Entero	Circular, rugosa con el centro grande liso	Brillosa	Suave	++
5	Crema	Convexo	Entero	Circular, rugosa con el centro grande liso	Opaca y Brillosa	Suave y Espesa	+
6	Blanca	Convexo	Entero	Circular, rugosa, centro liso, con halo alrededor	Brillosa	Suave y Espesa	+

* + representa bajo, ++ medio y +++ intenso.

6.2.3 Actividad proteolítica y lipolítica

La tabla 17 muestra los resultados de la prueba de proteólisis y lipólisis de las levaduras aisladas de los tres quesos. Como se puede observar, en la muestra de queso Usumacinta todas las levaduras presentaron actividad lipolítica y ninguna presentó actividad proteolítica. Para la muestra de queso Teresita todas las levaduras aisladas presentaron actividad lipolítica y sólo una presentó actividad proteolítica esto es de gran importancia porque la proteólisis contribuye a modificar el sabor del queso, aunque sólo encontramos una levadura que tiene esta actividad, por lo que se sugiere seguirla estudiando para observar su efecto. Para la muestra de queso Tigre todas las levaduras que se lograron aislar mostraron actividad lipolítica y ninguna mostro actividad proteolítica. La actividad lipolítica libera principalmente ácidos volátiles en los quesos y estos son: ácido butírico, caprónico, caprílico y cáprico; en los quesos duros estos ácidos son los responsables de gran parte del sabor y olor característico, esto es de gran importancia en las características propias del queso de poro.

La producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas en quesos, pueden contribuir al desarrollo del olor y sabor característico durante el proceso de maduración. Sin embargo, la lipólisis, proteólisis y los componentes de la leche si no son controlados pueden tener un impacto significativo sobre su calidad, principalmente adquiriendo un sabor rancio y presentando además alteraciones en la textura del producto (Borelli, 2006).

Tabla 17 Actividad lipolítica y proteolítica de las levaduras encontradas en las tres muestras de “Queso de Poro”.

Queso Usumacinta			
Col.	Microorganismo	Lipólisis	Proteólisis
1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	-
2	Cepa no cultivada	+	-
3	<i>Kodamaea ohmeri</i> strain wwl-1	+	-
4	<i>Debaryomyces etchellsii</i>	+	-
5	<i>Kodamaea ohmeri</i> voucher MCCC2E00326	+	-
6	<i>Kodamaea ohmeri</i> voucher MCCC2E00326	+	-
Queso Teresita			
Col.	Microorganismo	Lipólisis	Proteólisis
1	<i>Kodamaea ohmeri</i> strain wwl-1	+	-
2	<i>Saccharomycete sp.</i>	+	+
3	<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	-
4	<i>Candida tropicalis</i> voucher MCCC2E00325	+	-
5	<i>Kluyveromyces lactis</i> internal	+	-
6	<i>Candida tropicalis</i> voucher 36-28B	+	-
7	<i>Kodamaea ohmeri</i> strain wwl-1	+	-
8	<i>Candida zeylanoides</i> TJY13a	+	-
Queso Tigre			
Col.	Microorganismo	Lipólisis	Proteólisis
1	<i>Pichia ohmeri</i> strain ST5-3	+	-
2	<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	-
3	Cepa no cultivada	+	-
4	Cepa no cultivada	+	-
5	<i>Saccharomycetales sp.</i>	+	-
6	<i>Kodamaea ohmeri</i> strain ATCC 46053	+	-

Nota: (+) indica una actividad positiva
(-) indican actividad nula.

6.4. Identificación de las levaduras

6.4.1 Extracción del ADN

La extracción se le realizó a cada una de las levaduras aisladas de las diferentes muestras de queso (Tabla 18).

Tabla 18. Número de colonias aisladas de cada muestra de queso

Queso	Colonias Aisladas
USUMACINTA	6
TERESITA	8
TIGRE	6

Una vez realizada la extracción de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % (Figura 12) para verificar la presencia de éste y asegurarse que no se había perdido durante el proceso de extracción.

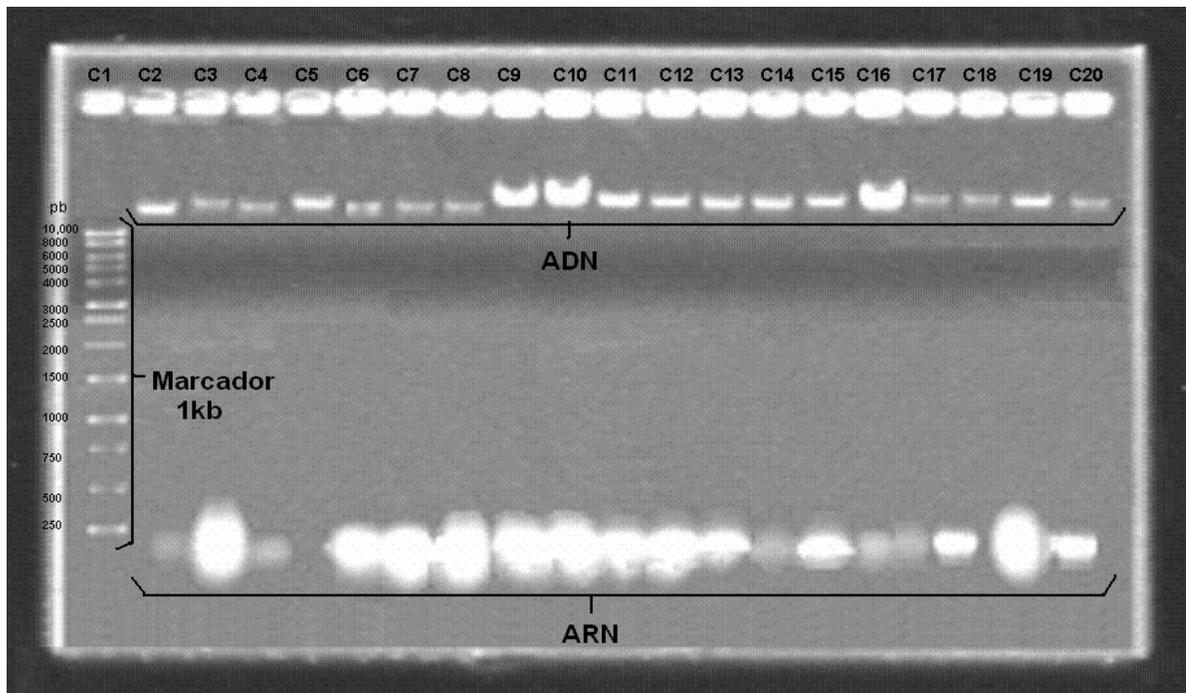


Fig. 12 ADN total en gel de agarosa al 0.7%. En cada carril se colocó el ADN (3 μ l) proveniente de cada una de las levaduras aisladas en cada muestra de queso.

En el primer carril (C-1) fue colocado el marcador de pesos moleculares 1kb DNA Ladder (Promega[®] EUA), a partir del segundo carril (C-2 a C-20) se observó la presencia de ADN de las levaduras, siendo en los carriles 9, 10 y 16 donde se detectó el mayor contenido de éste. Al confirmarse la presencia de ADN en todas las

muestras se realizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para la amplificación del gen ADNr 18S (parcial), ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial). Estas secuencias ITS permiten un mayor grado de discriminación, al presentar una mayor tasa de variabilidad por no ser regiones codificantes

6.4.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Una vez que se llevo a cabo la reacción de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % (Figura 13), para visualizar la presencia de ADN

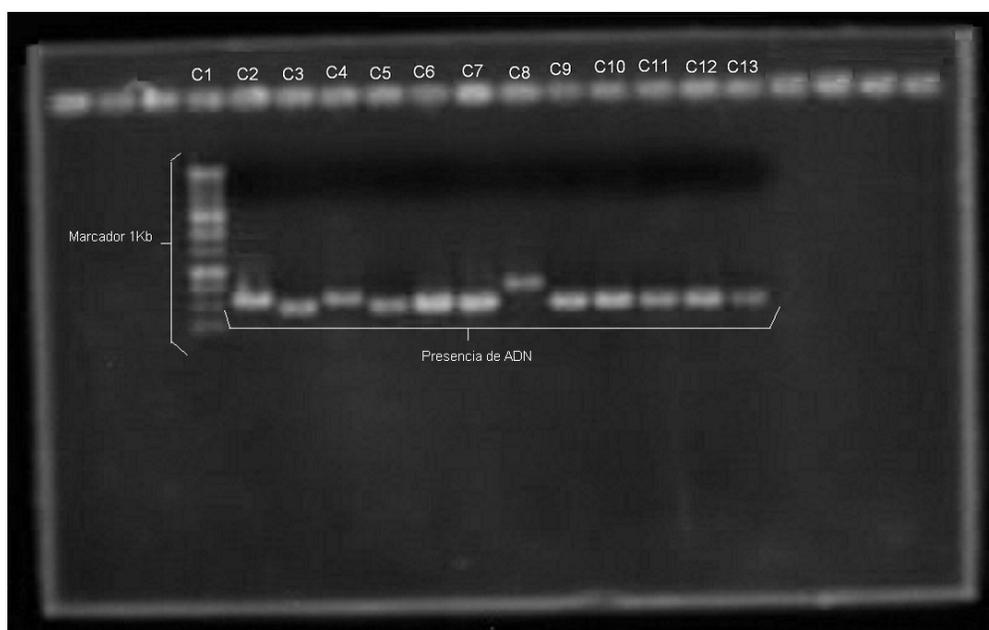


Fig. 13 Detección de ADN posterior a la PCR. En cada carril se colocó el ADN (3 μ l) amplificado proveniente de cada una de las levaduras aisladas, en las diferentes muestras de queso.

En la figura 11 se puede apreciar que en todos los carriles se logró la amplificación de la región característica de las levaduras, (gen ADNr 18S (parcial),

ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial)) de las muestras sometidas a la técnica PCR, por lo que la siguiente etapa fue la purificación del ADN.

6.4.3 Purificación del ADN

Después de la purificación (Kit QIAGEN) y para verificar el buen estado del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 7% (Figura 14).

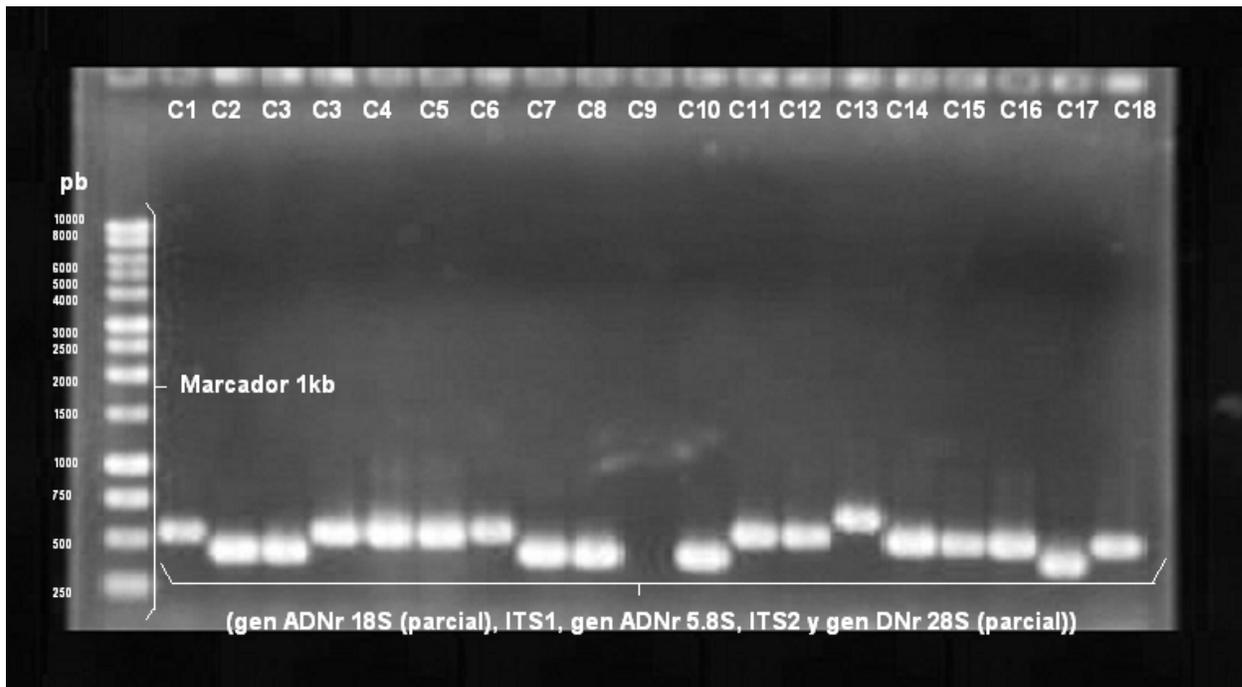


Fig. 14 Electroforesis en gel de agarosa posterior a la purificación de ADN* en la que se observa que las muestras son de diferente peso molecular, esto se debe a que son diferentes levaduras y la región que se amplificó varía en tamaño.

*En cada carril se colocó el ADN proveniente de cada una de las levaduras aisladas, de las diferentes muestras de queso.

Una vez purificadas las muestras se enviaron al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM- I).

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos “*Blast*” que se puede encontrar en la dirección electrónica: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

6.4.4 Cepas identificadas

Con base en los estudios anteriores se lograron identificar algunas levaduras aisladas en este trabajo, las cuales corresponden a levaduras como *Candida Krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces etchellsii* *Debaryomyces hasenii*, etc.

6.4.4.1 Queso Usumacinta

La tabla 19 muestra las series de secuencias para el gen ADNr 18S (parcial), ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial), para cada una de las levaduras aisladas en la muestra de queso Usumacinta; dichas secuencias se compararon con la base de datos Blast (Basic Local Alignment Search Tool) y fue útil para identificar 5 de las 6 cepas.

Tabla 19. Secuencias para el gen ADNr 18S (parcial), ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial) de la muestra de queso Usumacinta.

<p>USUMACINTA-Col.1</p> <p>CTTATCATTAGGTGGGCCTGCGGAGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAG CGGAACGAAAACAAAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATC TACGAAAAACAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGC GCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAA CGCACATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCTGTTCCATCT TGCGCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGCGACTGTAAAAGAGCGTCGGAGCT GCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTTCAGGGAC GCTTGCGGGCCGAGAGCGAGTGTGCGAGACAACAAAAGCTCGACCTCAATCAGGT AGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAAGCGGAGGCA</p>
<p>USUMACINTA-Col.2</p> <p>CTAATCATTAAAGTGGGCCTGACGGAAGGATCATTAAACATAATATTCTTACACACTGTTTTT TTACAACAAAAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATCTTAAAACTTTCAACA ACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGA ATCGCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCAATTGGGTATTCCCAA TGGTATGCTTGTGTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACG AAAATAATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCA AATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>USUMACINTA-Col.3</p> <p>TAATTTACTACACACTGTTTTTTTACAACAAAACAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAA GAAATTTCTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC GAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT TGCACCAATTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCAC GGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAATAATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCA GTACACTCATTTTTTTTCTCAAAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA</p>
<p>USUMACINTA-Col.4</p> <p>CCTAGTTCGCGTTTACTTCCACCTGATTTGAGGTCAAACCTTTGTTTTGTATGTTGTAGGG CCGAGCCAAAAATACCAGGAACTTACTACTAGACCATTCAACGAGTTGGATAAACCTAA TACATTGAAGAAGCCATAACAGTACTATCCAGTACTTCTCATGCCGATACATTTCAAGCA AACACTCAGTCTGACTAAGAGTATCACTCAATACCAAACCCGAAGGTTTGAGAGAGAAAT GACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATT CGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATTAATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCG ATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAGATTTTTTTGATATTTAAATCAA CAATTTGACATAATTATATTAAGTAAAAATTCATAAATATTGAAGTTTGTATTTAAAACC TCTGACCCAGACAATAAATTGTCCAGACCAAAGCAAGTTTCTTAGAACAGAAAAACATT GTGTGTAAAGTTTCTCGCCGCGCAATTAAGCGCTGGCGAAAAGAATACTGTAAAT</p>
<p>USUMACINTA-Col.5</p> <p>ACCTGCGGAAGGATCATTAAACATTAATTTACTACACACTGTTTTTTTACAACAAAACAAAT CTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATCTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGGAA TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCAATTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGA GCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAATAATGACGACAG TACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAAATCAAGTAGGACTAC CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>USUMACINTA-Col.6</p> <p>ACCTGCGGAAGGATCATTAAACATTAATTTACTACACACTGTTTTTTTACAACAAAACAAAT CTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATCTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC</p>

TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGGAA
 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGA
 GCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAATAATGACGACAG
 TACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAATCAAGTAGGACTAC
 CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Los resultados que se obtuvieron al comparar las secuencias con la base de datos son los siguientes: Las colonias 3, 5 y 6 corresponden a *Kodamaea ohmeri*. Las colonias 5 y 6 son las mismas, estas son diferentes a la colonia 3 de la muestra de queso Usumacinta, ya que tiene un número de acceso diferente a la base de datos, para comprobarlo se comparó la secuencia de estas colonias (Tabla 19).

Se puede observar que la colonia 2 es una cepa no cultivada y no se puede establecer de que microorganismo se trata, ya que al ser una muestra ambiental no se ha aislado la levadura (el microorganismo), sólo su ADN.

Tabla 19. Identificación de levaduras presentes en el queso Usumacinta

QUESO USUMACINTA			
Col.	Numero*	Nombre del microorganismo	Homología
1	AB365318.1	<i>Issatchenkia orientalis</i> o <i>Candida krusei</i>	100%
2	DQ300282.1	<i>Cepa no cultivada</i>	99%
3	EF190229.1	<i>Kodamaea ohmeri</i> wwl-1	100%
4	AJ586528.1	<i>Debaryomyces etchellsii</i>	99%
5	EF196811.1	<i>Kodamaea ohmeri</i> voucher MCCC2E00326	100%
6	EF196811.1	<i>Kodamaea ohmeri</i> voucher MCCC2E00326	100%

*Numero de acceso de cada cepa en la base de datos Blast.

La comparación de las secuencias de las colonias 5 y 6 (tabla 20) no permite encontrar diferencias entre las mismas colonias. Sin embargo, el hecho de que estas dos colonias muestren diferencias morfológicas en medio PDA sugiere que puede tratarse de dos cepas diferentes de la misma especie. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos entre ellas sólo podrían encontrarse si se analizaran regiones del genoma con mayor variabilidad. Comparando las secuencias de

nucleótidos de las levaduras 5 y 6 con la secuencia de nucleótidos de la colonia 3, se pueden apreciar pequeñas diferencias enmarcadas en color morado, a pesar de que no son tan notorias a simple vista se sugiere que éstas son importantes para que las levaduras tengan diferentes características como la producción de gas, olor y sabor, además que pueden contribuir a las diferentes propiedades del queso.

Tabla 20. Comparación de las secuencias de las colonias 3, 5 y 6 de la muestra de queso Usumacinta

USUM-Col. 5	ACCTGCGGAA	GGATCATTAAACATTAATTTACTACACACTGTTTTTTTACAACAAAACAAA
USUM-Col. 6	ACCTGCGGAA	GGATCATTAAACATTAATTTACTACACACTGTTTTTTTACAACAAAACAAA
USUM-Col. 3	GCCTGACGGG	GGATCATTAAACATTAATTTACTACACACTGTTTTTTTACAACAAAACAAA
	**** *	*****
USUM-Col. 5	TCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCCTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG	
USUM-Col. 6	TCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCCTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG	
USUM-Col. 3	TCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCCTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG	

USUM-Col. 5	TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGG	
USUM-Col. 6	TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGG	
USUM-Col. 3	TTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGG	

USUM-Col. 5	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTTT	
USUM-Col. 6	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTTT	
USUM-Col. 3	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTTT	

USUM-Col. 5	GAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAAAATATGACGAC	
USUM-Col. 6	GAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAAAATATGACGAC	
USUM-Col. 3	GAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAAAATATGACGAC	

USUM-Col. 5	AGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTTCCTCAAATCAAGTAGGAC	
USUM-Col. 6	AGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTTCCTCAAATCAAGTAGGAC	
USUM-Col. 3	AGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTTCCTCAAATCAAGTAGGAC	

USUM-Col. 5	TACCCGCTGAACTTAAGCATATCA-ATAAGCGGAGGAA	
USUM-Col. 6	TACCCGCTGAACTTAAGCATATCA-ATAAGCGGAGGAA	
USUM-Col. 3	TACCCGCTGAACTTAAGCATATCA-AAAAAGCGGAGGAA	
	***** *	

Nota: (*) Los tres microorganismos tienen la misma secuencia de nucleótidos.

- La colonia 5 y 6 tienen la misma secuencia de nucleótidos.
- La colonia 3 tiene diferente secuencia a las colonias 5 y 6.

Con lo anterior podemos decir que, en la muestra de queso Usumacinta se identificaron 5 de las levaduras que se aislaron (una cepa de *Issatchenkia orientalis*,

dos de *Kodamaea ohmeri* ww-1, una de *Kodamaea ohmeri* voucher ,una de *Debaryomyces etchellsii*), así mismo se observó una levadura que no se logró identificar, ya que en la base de datos no se conoce el microorganismo al que pertenece el ADN aislado.

6.4.2 Queso Teresita

En la tabla 21 se muestra secuencias para el gen ADNr 18S (parcial), ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial), para cada una de las levaduras encontradas en la muestra de queso Teresita, dichas secuencias se compararon con la base de datos para identificar 7 de las 8 cepas.

Tabla 21. Secuencias para el gen ADNr 18S (parcial), ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial) en queso Teresita

<p>TERESITA-Col.1</p> <p>T TTCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAACTTAATTTACTACACTGTTTTTTTACAA CAAAACAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCTTAAACTTTCAACAACGGAT CTCTTGTTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCA GCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATGGTAT GCTTGTGTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAATA ATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAATCAA GTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>TERESITA-Col.2</p> <p>CTTATCATTAGGGTGAGCCTGAGGGAGGATCATTACTGTGATTTACTACTACACTGCGTG AGCGGAACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAA TCTACGAAAAACAACAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTCGCATCGATGAAG AGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTT GAACGCACATTGCGCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTTCC ATCTTGCGCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAGAGCGTCCGG AGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTTCAGG GACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTGCGAGACAACAAGGCTCGACCTCAAATCA GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAAGCGGAGGAAGATTGCCTTGGGAC CGCCTAGAGAACACCA</p>
<p>TERESITA-Col.3</p> <p>CTTACCATAGGTGAGCCTGAAGGAGGATCATTACTGTGATTTACTACTACACTGCGTGAG CGGAACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATC TACGAAAAACAACAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTCGCATCGATGAAGAG</p>

CGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGA
ACGCACATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCAT
CTTGCGCGTGCGCAGAGTTGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAAGAGCGTCGGAG
CTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTTCAGGG
ACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTTCGAGACAACAAAAAGCTCGACCTCAAATCAG
GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAAGGCGGAGGAA

TERESITA-Col.4

CCTTACTCAATTAAAGGTGGGCCTGAGGAAGGATCATTACTGATTTGCTTAATTGCACCCAC
ATGTGTTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCAATCCTACCGCCAGAGGTTA
TAACTAAACCAAACCTTTTTATTTACAGTCAAACCTTGATTTATTATTACAATAGTCAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA
ATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCAATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGT
GAGCAATACGCTAGGTTTGGTAAAGAAATTTACGTGAAACTTATTTTAAAGCGACTTAG
GTTTATCCAAAACGCTTATTTTGTAGTGGCCACCACAATTTATTTATAACTTTGACCTC
AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAAGGCGGAGGAA

TERESITA-Col.5

CTAATCATTAAGTCGGCCTGACGGAGGATCATTAAACGATTATGAATGAGTAGATGTACTG
GGGGAATCGCTGAATATGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCTAATTCTTGATTTTCTGCTAT
CAGTTTTCTTTCTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGG
AGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAACATTTTGCATTATGAAAACTATTT
ATCAAGAAATTAATATTCAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGGATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTGGTTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGGATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTCTGTTTGAGCGTCAATTTCTC
TCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAAGTACTCGGTTTTCGGGTTAACTTGAAAGTGG
CTAGCCGTTGCCTTCTGCGTGAAGTGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGAAGTCACTCTTGC
ACATCTACGTCTTATGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTGGGGTCAATGAGTTTATAGGT
GTTATCGAGACTCGCTGGTGTGTCTCCTTAGTCCCGGGCTTAACTCAAACCTCTCTA
AGCTTGACCGCACTTCCGCAGGAATACCTGCTGAACTTTTGTTCGAATTATACGTACAAA

TERESITA-Col.6

CTTCTGAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACTGATTTGCTTAATTGCACCCACATGTGTTT
TTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCAATCCTACCGCCAGAGGTTATAACTAAA
CCAAACTTTTTATTTACAGTCAAACCTTGATTTATTATTACAATAGTCAAACCTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATT
GCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAG
GGCATGCCTGTTTGAGCGTCAATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTGAGCAATA
CGCTAGGTTTGTGAAAGAAATTTACGTGAAACTTATTTTAAAGCGACTTAGGTTTATCCA
AAACGCTTATTTTGTAGTGGCCACCACAATTTATTTATAACTTTGACCTCAAATCAGGT
AGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAAGGCGGAGGA

TERESITA-Col.7

TTTTGAGGTGACCTGCGGAAGGATCATTAACTTAATTTACTACACACTGTTTTTTTACAA
CAAAACAATCTATCTAAAAACAATTTCTTTACAAGAAATTTCTTAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCA
GCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCAATGGTAT
GCTTGTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTGCACGAAAATA
ATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTCTCAAATCAA
GTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGAGGAA

TERESITA-Col.8

CTATCGATTAAAGGTCAAGAGGACGGAAAGGATCATTACAGTATTCTTTTGCCAGCGCTTAA
TTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACTATGTTTTTTTGAATTTGAACTTTTGTGTTGGTCTG

ACTTAGAAATGAGTTGGGCCAAAGGTTTTATACTAAAACCTCAATTTTATTATTGAATTGTT
AATTAATTATATTGTCAATTTGTTGATTAATTCAAAAATCTTCAAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCA
GATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTATGGTATTCCATAGGGC
ATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAATCTTCGGATTTGGTTTTGAGTGATACTCTT
AGTCAGACTAAGCGTTTGCTTGAATGTATTGGCATGAGTGGTACTAGATAGTGCTGAAC
TGTTTCAATGTATTAGTTTTATCCAACCTCGTTGACCAGTATAGTATTTGTTTTATTACACAG
GCTCGGCCTTACAACAACAAACAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA
ACTTAAGCATATCATTAAAGCGGAGGA

Los resultados de la comparación de las secuencias, con la base de datos se muestran en la tabla 22; donde se puede observar que las colonias 3, 4, 6 y 8 son del género *Candida*, sin embargo las cuatro levaduras son de cepas diferentes. Una de ellas corresponde a la especie *C. zeylanoides*, otra a la *C. krusei* y dos de ellas a la especie *C. tropicalis*. Para observar la diferencia entre las dos levaduras de *C. tropicalis* se compararon sus secuencias (Tabla 23).

Tabla 22. Identificación de Colonias del Queso Teresita

QUESO TERESITA			
Col.	Numero*	Nombre del microorganismo	Homología
1	EF190229.1	<i>Kodamaea ohmeri</i> wwl-1	100%
2	AY796199.1	<i>Saccharomycete</i> sp.	100%
3	AY939796.1	<i>Issatchenkia orientalis</i> o <i>Candida krusei</i>	99%
4	EF196807.1	<i>Candida tropicalis</i> voucher MCCC2E00325	99%
5	DQ646686.1	<i>Kluyveromyces lactis</i> internal	100%
6	DQ680841.1	<i>Candida tropicalis</i> voucher 36-28B	100%
7	EF190229.1	<i>Kodamaea ohmeri</i> wwl-1	100%
8	EF687774.1	<i>Candida zeylanoides</i> TJY13a	100%

*Numero de acceso de cada cepa en la base de datos Blast.

Las colonias 1 y 7 tienen el mismo número de acceso a la base de datos lo cual nos indica que son la misma cepa (*Kodamaea ohmeri* wwl-1). El resultado se verifico comparando sus respectivas secuencias (Tabla 23).

En lo referente a la colonia 2 sólo se pudo identificar que es de la familia *Saccharomycetaceae*, probablemente se trata de una cepa nueva por lo que no se tiene información en la base de datos.

En la tabla 23 podemos observar en color morado las diferencias entre las secuencias de las colonias 4 y 6, a pesar que las diferencias son pequeñas al principio de la secuencia, se sugiere que éstas son importantes para que las levaduras tengan diferentes características como la producción de gas, olor, sabor y que puedan contribuir a las diferentes propiedades del queso.

Tabla 23. Comparación de secuencia de las colonias 4 y 6 del Queso Teresita

TE-Col. 4	CCTTACTCAATTAAAGGTGGCCCTGAGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCAC
TE-Col. 6	-----CTTCTGTAGGTGACCTGCGGA-GGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCAC
	* * * * * *
TE-Col. 4	ATGTGTTTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCAATCCTACCGCCAGAGGTTA
TE-Col. 6	ATGTGTTTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCAATCCTACCGCCAGAGGTTA

TE-Col. 4	TAACTAAACCAAACCTTTTTATTTACAGTCAAACCTGATTTATTTATTACAATAGTCAAAC
TE-Col. 6	TAACTAAACCAAACCTTTTTATTTACAGTCAAACCTGATTTATTTATTACAATAGTCAAAC

TE-Col. 4	TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
TE-Col. 6	TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT

TE-Col. 4	AATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
TE-Col. 6	AATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG

TE-Col. 4	TATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAAACCCCGGGTTTGGTGT
TE-Col. 6	TATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAAACCCCGGGTTTGGTGT

TE-Col. 4	TGAGCAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTACGTGGAAACTTATTTTAAAGCGACTTA
TE-Col. 6	TGAGCAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTACGTGGAAACTTATTTTAAAGCGACTTA

TE-Col. 4	GGTTTATCCAAAACGCTTATTTTGGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTCATAACTTTGACC
TE-Col. 6	GGTTTATCCAAAACGCTTATTTTGGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTCATAACTTTGACC

TE-Col. 4	TCAAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAAAGCGGAGGAA
TE-Col. 6	TCAAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAAAGCGGAGGA-

Nota: (*) Los 2 microorganismos tienen la misma secuencia de nucleótidos.

■ Diferencias entre las dos secuencias.

La comparación de las secuencias de las colonias 1 y 7 (tabla 24) no permite encontrar diferencias entre las mismas. Sin embargo, el hecho de que estas dos colonias muestren diferencias morfológicas en medio PDA sugiere que puede

tratarse de dos cepas diferentes de la misma especie. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos entre ellas sólo podrían encontrarse si se analizaran regiones del genoma con mayor variabilidad

Tabla 24. Comparación de las secuencias de las colonias 1 y 7 del Queso Teresita

TE-Col.1	TTTCGTAGGTGACCTGCGGAAGGATCATTAACATTAATTTACTACACACTGTTTTTTTAC
TE-Col.7	TTTCGTAGGTGACCTGCGGAAGGATCATTAACATTAATTTACTACACACTGTTTTTTTAC *****
TE-Col.1	AACAAAACAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTTCTTAAAACTTTCAACAAC
TE-Col.7	AACAAAACAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTTCTTAAAACTTTCAACAAC *****
TE-Col.1	GGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATC
TE-Col.7	GGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATC *****
TE-Col.1	GCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATGG
TE-Col.7	GCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATGG *****
TE-Col.1	TATGCTTGTGTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAA
TE-Col.7	TATGCTTGTGTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAA *****
TE-Col.1	ATAATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTTCCTCAAA
TE-Col.7	ATAATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTTCCTCAAA *****

Nota:(*)Los 2 microorganismos tienen la misma secuencia de nucleótidos.

Con lo anterior podemos decir que en la muestra de queso Teresita se identificaron 7 tipos de levaduras. Dos cepas de *Kodamaea ohmeri* ww-1, las cuales se sugiere estudiar más a fondo para saber si tiene diferencia en otra parte de su secuencia de ADN y esto contribuya con alguna característica del queso, dos cepas diferentes de *Candida tropicalis* vouche, una de *Candida zeylanoides*, una de *Candida krusei*, una de *Kluyveromyces lactis* (internal) y una más que no se logró identificar con más detalle, ya que puede ser una cepa nueva de la cual no se tiene información en la base de datos; a esta también se sugiere estudiarla más para saber su importancia en el queso.

6.4.4.3 Queso Tigre

En la Tabla 25 se muestran las secuencias que codifican para el gen ADNr 18S (parcial), ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial) para cada una de las cepas encontradas en la muestra de queso Tigre; estas secuencias se compararon con la base de datos y fueron útiles para identificar 3 de las 6 cepas encontradas.

Tabla 25. Secuencias para el gen ADNr 18S (parcial), ITS1, gen ADNr 5.8S, ITS2 y gen ADNr 28S (parcial) en queso Tigre.

<p>TIGRE-Col.1</p> <p>TTATGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAAACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTTACAACAAAA AAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCAGCATTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGAGCGAATA CTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAAAATGACGACAGTACTCTACAAAA CGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA TATCAATAAGCGGAGGA</p>
<p>TIGRE-Col.2</p> <p>CTATCATCAACTTAGTAGTGACCACAGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCG GAACGAAAAACAACACCTAAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAA AAACAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAAT GCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCC TCGGAATTCGCGGGGGCATGCCTGTTTGAAGCGCCCTTTCCATCTTGCATTTGCGTGGAGTTGT GGGAGATGAGAGAACAAGAACGACCGTTGTTGAAAGTTTTGTTTGTGTTTGAAGGAAATTCACGT TGCCACTATAAACTATATTCTATATCTTGGGTGTTTGTGGTCCGATACCGAGCGCCCCGAGAAA ACAAAAATCACGCCCTGGATTCTCCCGAGGTCCCCTACAAAACTTGTTACACATTTTTTCTC</p>
<p>TIGRE-Col.3</p> <p>TTTCTGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAAACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTTACAACAAA AAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGAGCGAATA CTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAAAATGACGACAGTACTCTACAAAA CGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA TATCATTAAAGCGGAGGAA</p>
<p>TIGRE-Col.4</p> <p>CTTACTGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAAACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTTACAACA AAAAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAATCGCAGCTCTCGGAA TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATGGTATGCTTGTGTTGAGCGAA TACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAAAATGACGACAGTACTCTACAA AACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAAGCGGAGGAA</p>
<p>TIGRE-Col.5</p> <p>CTTACAGATTGGGGGGGGCCTGACGGGAGGATCATTAACTAAATATTCTTACACACTGTTTTT TTACAACAAAAAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCTTAAAACTTTCAACAACGG ATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGATGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATGGTATGC</p>

TTGTTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAATAATGACGA
 CAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAAATCAAGTAGGACTACC
 CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

TIGRE-Col.6

CAATAATTCGACTGAGCCTGACCGCAGGATTTTAGCATAATATTCTTACTCCCTGCTTTTTTGCA
 ACAGAAAAATCTGTCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATCTTAAAACTTTGACAACGGATCTC
 TTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGGGATACGTGATACGAATCGCAGCTCTCG
 GAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCAATGGTATGCTTGTGTTGAGC
 GAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAAAATAATGACGACATTACTCTA
 CAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCTCAAAATCAAGTAGGACTACCCGTTGAACTA
 AAGATATCAACAAGCGGAGGAA

Los resultados de la comparación de las secuencias con la base de datos se muestra en la tabla 25; en la cual se puede observar que las colonias 3 y 4 tienen el mismo número de acceso a la base de datos pero, son cepas que no se han cultivado, es decir, no se ha aislado el microorganismo como tal, sólo su ADN, por lo que no se puede decir, de que microorganismo se trata, ni si se trata del mismos microorganismos; para ver la diferencia se compararon las secuencias de las dos colonias (Tabla 23).

La colonia 5 pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, aunque no se logró identificar la cepa; probablemente se trate de una cepa nueva de la cual no se tiene información en la base de datos.

En el caso de las colonias 1y 6 son del mismo género y especie ya que *Pichia ohmeri* es sinónimo de *Kodamaea ohmeri*, pero son de diferente subespecie; para comprobarlo se compararon las secuencias (Tabla 24).

Tabla 25. Identificación de Colonias Presentes en el Queso Tigre

QUESO TIGRE			
Col.	Numero*	Nombre del microorganismo	Parecido
1	AY168786.1	<i>Pichia ohmeri</i> ST5-3	100%
2	AB365318.1	<i>Issatchenkia orientalis</i> o <i>Candida krusei</i>	100%
3	DQ300282.1	<i>Cepa no cultivada</i>	99%
4	DQ300282.1	<i>Cepa no cultivada</i>	99%
5	EF060692.1	<i>Saccharomycetales sp.</i>	100%
6	AF335946.1	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053	100%

*Numero de acceso de cada cepa en la base de datos Blast.

La comparación de las secuencias de las colonias 3 y 4 (tabla 26) no permitió encontrar diferencias entre las mismas. Sin embargo, el hecho de que estas dos colonias muestren diferencias morfológicas en medio PDA sugiere que se puede tratar de dos cepas diferentes de la misma especie. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos entre ellas sólo podrían encontrarse si se analizaran regiones del genoma con mayor variabilidad.

Tabla 26 Comparación de las Secuencias de las colonias 4 y 3 del Queso Tigre

Ti-Col. 4	CTTTCTGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAAACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTTA
Ti-Col. 3	-TTTCTGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAAACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTTA *****
Ti-Col. 4	CAACAAAAAAAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCTTAAAACTTCAACAA
Ti-Col. 3	CAACAAAAAAAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCTTAAAACTTCAACAA *****
Ti-Col. 4	CGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATACGTAATACGAAT
Ti-Col. 3	CGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATACGTAATACGAAT *****
Ti-Col. 4	CGCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATG
Ti-Col. 3	CGCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAATG *****
Ti-Col. 4	GTATGCTTGTTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAA
Ti-Col. 3	GTATGCTTGTTTGAGCGAATACTTCCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGAA *****
Ti-Col. 4	AATAATGACGACGTAAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCCTCAA
Ti-Col. 3	AATAATGACGACGTAAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTCCTCAA *****
Ti-Col. 4	ATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAA
Ti-Col. 3	ATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAA *****

Nota:(*)Los 2 microorganismos tienen la misma secuencia de nucleótidos.

En la tabla 27 podemos observar (en color morado) las diferencias entre las secuencias de las colonias 1 y 6 de la muestra de Queso Tigre. A pesar de que son del mismo género y especie varían en el número de cepa, se sugiere que estas diferencias en la secuencia de nucleótidos son importantes para que estas levaduras proporcionen diversas características al “Queso de Poro” como la producción de gas, olor, sabor, etc.

Tabla 27 Comparación de las secuencias de las colonias 1 y 6 del Queso Tigre.

Ti-Col.1	---TTATGTAGGTGA-CCTG--CGGAGGATCA-TTAA-CATAATATTCTTACACA-CTGTTTT
Ti-Col.6	CAATAATTTCGACTGAGCCTGACCGGAGGATT-TTAGCATAATATTCTTACTCCCTGCTTT
	* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ti-Col.1	TTTACAACAAAAAAAAATCTATCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCCTTAAAACTTTCA
Ti-Col.6	TTTCAACAGAAAAAAAAATCTGTCTAAAAACAATTCTTTACAAGAAATTCCTTAAAACTTTCCG
	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ti-Col.1	ACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATAC
Ti-Col.6	ACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGGGATACGTAATAC
	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ti-Col.1	GAATCGCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACATTGGGTATTCCC
Ti-Col.6	GAATCGCAGCTCTCGGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCACATTGGGTATTCCC
	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ti-Col.1	AATGGTATGCTTGTTTGGAGCGAATACTTCCCTAACTCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCA
Ti-Col.6	AATGGTATGCTTGTTTGGAGCGAATACTTCCCTAACTCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCA
	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ti-Col.1	CGAAAAAATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTTCC
Ti-Col.6	CGAAAAAATGACGACATTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCATTTTTTTTTCC
	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Ti-Col.1	TCAAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
Ti-Col.6	TCAAATCAAGTAGGACTACCCGTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
	** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Nota: (*) Los 2 microorganismos tienen la misma secuencia de nucleótidos.

■ Diferencias entre las dos secuencias.

Con lo anterior podemos decir que en la muestra de queso Teresita se identificaron 3 tipos de levaduras (dos cepas de *Kodamaea khmer* y una de *Issatchenkia orientalis*), además de tres levaduras que no se pudieron identificar, de las cuales una puede ser una cepa nueva ya que no se tiene información en la base de datos que recurrimos, en el caso de las otras 2 cepas no se conoce el microorganismo del cual proviene la secuencia que se encontró.

6.4.4.4 Comparación de microorganismos presentes en las tres muestras de “Queso de Poro”.

La importancia de la presencia de levaduras en los productos lácteos, es que estas pueden contribuir positivamente al olor y sabor característico de éste durante la etapa de maduración o por el contrario, pueden dar lugar a productos de descomposición (Fadda, 2004).

La presencia de levaduras en quesos es causada principalmente por la contaminación de la leche cruda, el aire, la ropa, las manos, aparatos y equipos utilizados durante la producción y procesos de maduración.

En la gráfica 2 se muestran los microorganismos que se lograron identificar en cada una de las muestras de “Queso de Poro”.

Las levaduras han surgido como importantes organismos en el proceso de maduración de queso, aunque su papel no se ha comprendido totalmente, muchos estudios revelan la presencia de levaduras vinculados a procesos de maduración en diferentes quesos (M. Borelli, 2006).

levadura se encontró en las tres muestras de “Queso de Poro, por lo que se sugiere que es de gran importancia en el desarrollo del sabor, por ello se propone estudiar más a fondo esta levadura para saber que características le confiere al queso.

También se encontró *Candida tropicalis*, considerado como una levadura oportunista que es común en el medio ambiente. Sin embargo, no se encontró información de que ésta fuera importante para la rama de alimento, en este caso se sugiere realizar un estudio más afondo para saber si confiere algún compuesto que le dé alguna característica propia al queso, y en el caso de no hacerlo, eliminarla de la flora microbiana del mismo.

Otra especie fue *Candida zeylanoides* (encontrada en el queso Teresita), la cual tiene actividad lipolítica considerable. Esta ha sido aislada en leche y queso cottage. El decremento de los niveles de *C. zeylanoides* después de 30 días de maduración puede relacionarse con su capacidad fermentativa (Fadday col., 2004; Borelli y col., 2006). Se sugiere que esta levadura es de gran importancia para sabor y olor del queso.

La levadura de género *Kodamaea* fue encontrada en las tres muestras de queso.

La especie *Kodamaea ohmeri* o *Pichia ohmeri* se ha aislado de la salmuera de pepino y comúnmente es usado en la industria de alimentos para la fermentación en escabeches, es importante en el deterioro de frutas. Esta especie podría ser considerada como un patógeno oportunista, pero también se aisló en un queso brasileño “Canastra” de la región de Minas Gerais. Con lo anterior se sugiere estudiar mas a fondo esta levadura y saber si le confiere una característica importante al

queso para ver opciones que se tengan para sustituir esta levadura o eliminarla de la flora microbiana del queso.

La levadura del género *Kluyveromyces* sólo fue encontrada en la muestra de queso Teresita. La especie *Kluyveromyces lactis*, que es una levadura que tiene la capacidad de asimilar y fermentar la lactosa por lo que puede ser una de las principales levaduras que contribuyen a las características de quesos y productos lácteos, puede contribuir positivamente al desarrollo de sabor durante la fase de maduración del queso. Esta levadura también se logró aislar de un queso brasileño “Canastra” de la región de Minas Gerais (Borelli y col., 2006; Fadday col., 2004).

Otra levadura encontrada sólo en una muestra de queso (Usumacinta) fue *Debaryomyces etchellsii*, que se ha encontrado en una variedad de alimentos procesados, tales como los extractos de frutas y refrescos, vino, cerveza, azúcar, productos de panadería, productos lácteos, carne fresca y carnes procesadas. En el queso brasileño “Canastra” de la región de Minas Gerais se encontró la levadura *Debaryomyces hasenii* pertenece al mismo género. La presencia de la especie *Debaryomyces* en los alimentos por lo general no tiene efecto perjudicial y en algunos casos es beneficioso.

Algunas especies de *Debaryomyces* son importantes en la maduración de alimentos fermentados como el queso y los productos cárnicos. En los quesos metaboliza el ácido láctico, lo que modifica el pH y permite el crecimiento de bacterias proteolíticas y lipolítica que contribuyen al desarrollo de aromas en el queso (Martorell y col., 2005). Se sugiere que esta levadura es de gran importancia para el desarrollo de la flora bacteriana en el queso y aunque no se pudo encontrar en las otras muestras sería importante incluirla en el proceso de los mismos.

En el caso de las levaduras que no fueron identificadas sería interesante que se estudiaran más a fondo, para poder saber si son microorganismos importantes para las características propias del queso.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró determinar las características fisicoquímicas de tres muestras de “Queso de Poro”, como Aw (0.94 -0.96) importante para el desarrollo de microorganismos, proteína (42.31%-50.07%), grasa (52.52%- 59.88%) y humedad (48.96%- 58.91%).

- ✓ La cuenta de hongos y levaduras es elevada en comparación con lo descrito en NOM-121-SSA1-1994, las cuentas de los demás microorganismos son altas, pero no se encontró un comparativo ya que en la regulación Mexicana parten de leche pasteurizada y no reportan mesófilos aerobios, mesófilos anaerobios, bacterias psicrófilas, coliformes totales ni bacterias lácticas. La alta cuenta de microorganismos se atribuye a que el queso se elabora con leche bronca y no se mantiene refrigerado.

- ✓ De las 20 cepas aisladas de levaduras se lograron identificar 15, entre las cuales se encuentran *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces lactis* y *Debaryomyces etchellsii*.

- ✓ De las cepas aisladas, 20 tienen actividad lipolítica y solo *Saccharomycete sp.* tiene actividad proteolítica.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Se sugiere estudiar las cepas que no se lograron identificar ya que éstas pueden ser importantes, considerando que se puede tratar de nuevas especies, con lo que se lograra tener el estudio completo de las cepas presentes en el “Queso de Poro”.
- ✓ Se propone que se estudien cada una de las cepas identificadas con mas detalle y determinar qué función tienen en los quesos, para poder determinar su función en la producción de compuestos que aporten sabores y olores característicos del “Queso de Poro”.
- ✓ Elaborar el “Queso de Poro” con leche pasteurizada e inóculos bien identificados para estandarizar el proceso de elaboración, conservando las características propias del mismo, con esto que llegue a cumplir con las Normas Oficiales Mexicanas para poder comercializarlo sin riesgos y obtener la denominación de origen.
- ✓ Realizar pruebas sensoriales y microbiológicas a diferentes tiempos de maduración con el fin de determinar las variaciones que sufre el producto, empleando las cepas aisladas como inóculo y la leche pasteurizada.

9. APÉNDICE

¹ Urea 8M

Se prepararon 50mL de solución de Urea 8M.

- a) Se pesaron 24.04 g de Urea.
- b) Se transfirieron a un matraz aforado de 50mL.
- c) Se aforó con agua destilada.

² Citrato de sodio 0.5M

Se prepararon 100ml de solución de citrato de sodio 0.5 M.

- a) Se pesó 14.75g de citrato de sodio.
- b) Se transfirió a un matraz aforado de 100mL.
- c) Se aforó con agua destilada.

³ Reactivo A (Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N)

Se prepararon 100mL de una solución de NaOH 0.1 N.

- a) Se pesaron 0.4 g de NaOH.
- b) Se transfirieron a un matraz aforado de 100ml.
- c) Se aforó con agua destilada.

Se Prepararon 100ml del reactivo A.

- a) Se pesaron 2 g de Na_2CO_3 .
- b) Se agregaron 100 ml de la solución preparada de NaOH 0.1N.

4 Reactivo B CuSO₄ 0.1%

Se prepararon 10 ml de una solución 1% de CuSO₄.

a) Se pesaron 0.1g de CuSO₄.

b) Se agregaron 10 ml de agua destilada y se mezcló hasta que se disuelva el CuSO₄.

5 Reactivo C tartrato de sodio y potasio al 2%

a) Se prepararon 10 ml de una solución 2% de KNaC₄H₄O₆•4H₂O

b) Se pesaron 0.2g de CuSO₄

Se agregaron 10 ml de agua destilada y se mezcla hasta que se disuelva el KNaC₄H₄O₆*4H₂O.

6 Reactivo D Follin-Ciocalteau

Se miden 2 ml del reactivo de follin y se mezclan con 2 ml de agua destilada.

Este reactivo se debe de preparar en el momento que se va a ocupar.

7 Agua peptonada 1%

Composición para 100mL.

1g peptona.

0.5g cloruro de sodio.

0.15g KH₂PO₄.

0.9g Na₂PO₄ 12H₂O.

⁸ **Agar leche**

- a) Se pesaron 100g de medio de leche descremada (Difco, USA).
- b) Se agregó 1 litro de agua destilada.
- c) Ya preparada la leche descremada se toman 150 ml.
- d) Se pesan 15 g de agar-agar (BD Bioxon, México) y se le agregan a los 150mL de leche descremada.
- e) Se agrega 1 litro de agua y se agita hasta disolver perfectamente.
- f) Se esterilizó.

⁹ **Agar Tributirina**

Extracto de levadura (BD Bioxon, México)	10 (g/L).
Peptona (BD Bioxon, México)	20 (g/L).
Tributirina (Aldrich)	10 (ml/L).
Glucosa 20 % (J. T Baker, México)	25 (ml/L).
Agar (BD Bioxon, México),	20 (g/L).

Preparación:

- a) Se agregó el extracto de levadura, peptona, la tributirina y el agua destilada.
- b) Se emulsificó de dos a tres minutos.
- c) Se agregó el agar y se disolvió.
- d) Se esterilizó
- e) Se dejó enfriar y se agregó la glucosa al 10% previamente esterilizada

10 Caldo YM

0.1% de extracto de levadura (BD Bioxon, México)

0.5 % de peptona (BD Bioxon, México)

2% de glucosa

Preparación:

- a) Se pesaron los componentes
- b) Se les agregó agua destilada
- c) Se colocó 10 ml de medio en tubos con taparrosca
- d) Se esterilizó

11 Los primer utilizados presentan la siguiente secuencia

- ITS 5. 5´ -GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3´ (Acceso lab S.A. de C.V. México).
- ITS 4B. 5´- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3´ (Acceso lab S.A. de C.V. México).

12 TAE 50x

57.1ml de ácido acético glacial (J.T. Baker)

100ml de EDTA (J.T. Baker) 0.5M pH 8

0.242 g de tris base (Merck)

Agua destilada hasta completar un litro

Una solución 50X significa que esta 50 veces concentrada de manera que para preparar, por ejemplo 100ml de TAE 1X, se deberá diluir 2ml de TAE 50X en 98 ml de agua destilada. El ácido acético se debe manipular en campana de extracción.

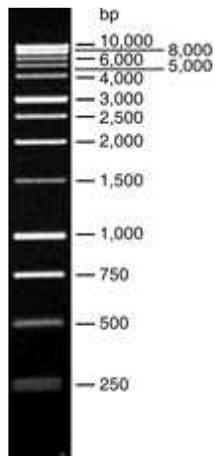
13 Colorante Bromuro de Etidio

Se preparó una solución de 10mg/ml en agua. Se conservó a 4°C.

Para un litro de agua destilada se requieren 50 µL de solución.

14 Marcador 1kb Ladder (Promega® EUA)

Con marcadores de 250- 10,000 pares de bases.



10. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ ALAIS C., 1991, **Ciencia de la leche: principios de tecnología lechera**. Ed. Continental. México pp. 5, 267, 719-720, 724-725, 731-732.
- ✓ AMIOT J., 1991, **Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones**, Ed. Acribia, Zaragoza España pp. 1, 5-6, 20, 24, 31-32, 251-253, 265-266.
- ✓ BADUI D. S., 2006, **Química de los alimentos**, Ed. Alhambra Mexicana, México, pp.604, 609, 617, 619.
- ✓ BELITZ D., GROSCH W., 1997, **Química de los alimentos** Segunda edición. Ed. Acribia. Zaragoza España. pp. 570-571,
- ✓ BEERENS H., LUQUET F., 1990, **Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**, Ed. Acribia. Zaragoza España. pp.99-100.
- ✓ BORELLI M. Beatriz, G. FERREIRA E., FRANCO R., ROSA C. A., 2006 , **Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil** World J Microbiol Biotechnol 22:1115–1119.
- ✓ BUCHHEIM W, SCHLIMME, ECKHARD., 2002, **La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas**. Ed. Acribia. Zaragoza España pp. 54-55, 59
- ✓ CENZANO I., 1992, **Los quesos**. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. pp. 11
- ✓ CENTENO Á. M., GARCÍA G. M., 1994, **Determinación de pH y Actividad de Agua en Quesos Mexicanos**. Revista de Tecnología de Alimentos (México). 29:36-38.

- ✓ CHAMORRO M^a C., LOSADA M. M.; 2002, **El Análisis Sensorial de los Quesos**. 1^a Edición Ed. Mundi-Prensa(España).pp130-150

- ✓ CHEFTEL J., 1992, **Introducción a la biotecnología y tecnología de los alimentos**. Vol. 1 Ed. Acribia. Zaragoza España. pp. 43-47

- ✓ DOMINIC W. S. y WONG Ph. D., 1995, **Química de los alimentos, mecanismo y teoría**, Ed. Acribia, Zaragoza España. pp. 96-101.

- ✓ DONG-HWAN K., YOUNG-AH H., HEUI-DONG P, 2008, **Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine**; Biotechnol Lett 30:1633–1638.

- ✓ ELLNER R., 2000. **Preguntas y respuestas sobre la microbiología de la leche y los productos lácteos**. Ed. Díaz de Santos, S. A. Madrid España pp.33-35

- ✓ FADDA M. E., MOSSA V., PISANO M.B., DEPLANO M., COSENTINO S., 2004, **Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese**, Int. J. Food Microbiol., 95:51– 59.

- ✓ FERNÁNDEZ P. J. F., 1997, **Caracterización de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (penDE) de la ruta de biosíntesis de la penicilina**. Tesis de doctorado, Universidad de León (Departamento de Ecología Genética y Microbiología), España.

- ✓ FOX F. P., GUINEE P. T., COGAN M. T., McSWEENEY P. L., 2000, **Fundamentals of Cheese Science**. Ed. Aspen Publication. United States of America. pp. 210; 536-540.

- ✓ GARBER R. C, TURGEON B. G., SELKER E.U., YODER O.C., 1988 **Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochilobolus heterotrophus***. Curr. Genet. 14(6):573-582

- ✓ GARCÍA G. M., QUINTERO R. R., LOPEZ-MUNGUÍA C. A., 2004, **Biotechnología Alimentaria**, Ed. Limusa, México D. F., pp. 179, 185-186.

- ✓ HANSJÖRG P., ORSOLYA M., FRIEDA E., KSENIJA L., 1999; **Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese, 75: 267–283.**

- ✓ ICMSF; 1998, **Microorganismos de los alimentos 6 Ecología microbiana de los productos alimentarios**. Editorial Acribia, Zaragoza (España). pp. 526-529.

- ✓ KEATING P. F., 1999, **Introducción a la lactología**. Segunda edición. Editorial Limusa, México. pp. 168, 177, 181-187, 196-197, 203-206,

- ✓ LUQUET M. F., 1991, **Leche y productos lácteos Vaca–Oveja–Cabra**. Editorial Acribia, Zaragoza (España). pp. 6-7,30, 49, 70-72

- ✓ MADIGAN M. T., MARTINKO J. M, PARKER J., 2001, **Brock Biología de los Microorganismos**, (México: Editorial Prentice Hall, pp.188-193.

- ✓ MAHAUT M., ROMAIN J., BRULÉ G., 2003, **Introducción a la tecnología quesera** Ed. Acribia, España, pp. 23, 27-30, 102-113, 119, 123-125, 132

- ✓ MATHEWS K. C., VAN H. K., AHERN G. K., 2002, **Bioquímica** Ed. Pearson, Madrid, España, pp. 1038

- ✓ MARTORELL P., FERNANDEZ E. M. T., QUEROL A.; 2005 **Sequence-based identification of species belonging to the genus Debaryomyces**, FEMS Yeast Research, 5:1157–1165.

- ✓ **NORMA GENERAL DEL CODEX PARA EL QUESO. CODEX STAN A-6-1978**, Rev. 1-1999, Enmendado en 2006.

- ✓ **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.**

- ✓ RODRIGUEZ A. P. 2007, **Caracterización e identificación de la flora bacteriana y determinación de las propiedades fisicoquímicas del “queso de Poro” de Tabasco**, Tesis, U.N.A.M. (Facultad de Química), México D.F.

- ✓ SANTOS M. A., 1991, **Leche y sus derivados**. Ed. Trillas, México D.F., pp. 33-37, 179-181, 185-187, 193-195, 200, 203.

- ✓ SCHMIDT K-F, 1995, **Elaboración artesanal de mantequilla, yogur y queso**. Ed. Acribia, Zaragoza España. pp. 4.

- ✓ SCOTT R., 2002, **Fabricación del queso**. Ed. Acribia. Zaragoza España pp. 42, 46, 49, 185-187.

- ✓ SPREER E., 1991, **Lactología industrial**. Segunda edición. Ed. Acribia. España pp. 333-334, 340, 344.

- ✓ TAJ-ALDEEN S. J., DOIPHODE S. H., HAN X. Y., 2006, ***Kodamaea (Pichia) ohmeri* fungaemia in a premature neonate** Journal of Medical Microbiology 55: 237–239.

- ✓ TORTORA G., FUNKE B., CASE C., 2007. **Introducción a la microbiología** Ed. Panamericana S. A., Buenos Aires, Argentina pp. 259

- ✓ VARNAM A. H., SUTHERLAND J. P., 1995, **Leche y productos lácteos Tecnología química y microbiología**, Ed. Acribia, Zaragoza España pp. 8-11, 291, 355-359.

- ✓ WALSTRA P., 2001. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. España: Acribia, pp 14.