



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE
QUESOS BOLA DE OCOSINGO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Alberto Camacho Mata

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: María Elena Cañizo Suárez

VOCAL: Profesora: Maricarmen Quirasco Baruch

SECRETARIO: Profesora: Aleida Mina Cetina

1er. SUPLENTE: Profesora: Adriana Vega Pérez

2° SUPLENTE: Profesor: Genaro Jiménez Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. EDIFICIO E,
LABORATORIO 312. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL PROYECTO DGAPA PAPIIT
IN229319: “ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DEL QUESO BOLA
DE OCOSINGO: DESCRIPCIÓN POLIFÁSICA Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO”
Y POR EL PAIP FQ CON LA CLAVE 5000-9102.**

ASESOR DEL TEMA: _____

DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

M. en C. CINDY ADRIANA ESTRADA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE: _____

ALBERTO CAMACHO MATA

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Planteamiento del problema.....	2
2.2 Justificación.....	2
3. Hipótesis del trabajo.....	3
4. Objetivos.....	3
4.1 Objetivo general.....	3
4.2 Objetivos específicos.....	3
5. Marco teórico.....	4
5.1 Queso.....	4
5.2 Queso bola de Ocosingo	6
5.3 Proceso de elaboración del queso bola de Ocosingo.....	8
5.4 Sistema de producción lechera de doble propósito.....	12
5.5 Comercialización del queso bola de Ocosingo.....	15
5.6 Microbiología de la leche cruda.....	16
5.7 Bacterias ácido lácticas.....	17
5.8 Bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.....	20
5.9 Potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas.....	21
6. Metodología.....	24
6.1 Diagrama general.....	23
6.2 Cuenta de mesófilos aerobios.....	25
6.3 Cuenta de mohos y levaduras.....	25
6.4 Cuantificación de <i>E. coli</i> y coliformes totales.....	25
6.5 Cuantificación de <i>S. aureus</i>	25
6.6 Determinación de proteína.....	26
6.7 Contenido de grasa.....	27
6.8 Humedad.....	27
6.9 Cenizas.....	27
6.10 Carbohidratos.....	28

6.11	pH.....	28
6.12	Acidez del queso.....	28
6.13	aw.....	28
6.14	Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	28
6.15	Confirmación de la pureza de las cepas.....	28
6.16	Conservación de las cepas.....	29
6.17	Extracción de ADN.....	29
6.18	Amplificación del gen ADNr 16S.....	29
6.19	Purificación de los productos de PCR.....	30
6.20	Secuenciación.....	31
6.21	Alineamiento de las secuencias y comparación con base de datos.....	31
6.22	Cinéticas de crecimiento.....	31
6.23	Análisis de efecto antagónico contra bacterias patógenas (liofilización).....	31
6.24	Análisis de efecto antagónico contra bacterias patógenas ((NH ₃)SO ₄ 60%).....	32
6.25	Análisis de efecto antagónico contra bacterias patógenas ((NH ₃)SO ₄ 80%).....	32
6.26	Monitoreo del pH de la fermentación de las cepas.....	33
6.27	Acidez titulable de las BAL.....	33
6.28	Actividad enzimática esterolítica.....	34
6.29	Actividad enzimática lipolítica.....	34
6.30	Actividad enzimática proteolítica.....	34
6.31	Evaluación de la resistencia de las BAL al paso gastrointestinal.....	34
7.	Resultados y discusión.....	37
7.1	Análisis microbiológico.....	37
7.2	Análisis químico proximal.....	40
7.3	Caracterización fisicoquímica.....	43
7.4	Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	44
7.5	Extracción, secuenciación e identificación de cepas.....	45
7.6	Cinéticas de crecimiento.....	46
7.7	Acidez titulable de las cepas aisladas.....	50
7.8	Pruebas de inhibición vs bacterias patógenas.....	53
7.9	Evaluación de la actividad enzimática.....	60

7.10 Evaluación de la resistencia al paso gastrointestinal.....	67
8. Conclusiones.....	70
9. Perspectivas.....	71
10. Bibliografía.....	72
10.1 Referencias web.....	80
11. Anexo.....	81

1. Resumen

Durante el 2018 en México la elaboración de derivados y fermentos lácteos como quesos, crema y yogurt, alcanzó un volumen de un millón 150 mil toneladas, con un valor de 52 mil 104 millones de pesos (SAGARPA, 2018). La industria quesera mexicana en el 2018 produjo 418 mil 650 toneladas con un valor en el mercado de 21 mil 293 millones de pesos. Las principales variedades de quesos elaborados en México son el queso fresco con el 18.9 % de la producción total, el queso doble crema con 16.1 % y el queso panela con 11.7 % (SAGARPA, 2018).

El queso bola de Ocosingo es un queso muy popular y apreciado en Ocosingo, el resto de los municipios de Chiapas y algunos estados del Sureste de México. Sin embargo, este queso es prácticamente desconocido en el resto del país. Las principales problemáticas que tienen los productores de la región, es la falta de apoyos económicos que permitan financiar una producción a mayor escala, además de que el estado de Chiapas se encuentra en una de las zonas más vulnerables y de menos desarrollo de México.

Este trabajo aporta mayor información sobre el queso mediante su análisis de composición proximal, fisicoquímica y microbiológica. Se aislaron bacterias ácido lácticas y se buscaron sus potenciales aplicaciones en la industria de alimentos, como actividades enzimáticas, características probióticas y capacidad inhibitoria de bacterias de interés en la inocuidad de alimentos.

Mediante el análisis proximal de los quesos se destaca que el núcleo posee un sabor y textura característicos debido a su alto contenido de grasa y acidez producida por las bacterias ácido lácticas. Si bien el contenido de humedad, actividad acuosa y acidez inhibirían el crecimiento de bacterias patógenas y de descomposición, algunas podrían sobrevivir, como el caso de *S. aureus*. Se observó que la doble corteza del queso, en efecto, cumple la función de empaque, debido a su alto contenido de proteína y baja humedad.

El análisis microbiológico del centro del queso reveló altas cuentas de mesófilos aerobios y levaduras, lo que era de esperarse debido a que este queso se elabora con leche no

pasteurizada. Hubo ausencia de *E. coli*; sin embargo, también se encontró una cuenta alta de coliformes totales y *S. aureus* lo que indica que las condiciones sanitarias bajo las cuales fueron manipuladas las materias primas y el producto terminado no fueron adecuadas. Se sugieren una serie de recomendaciones, que de ser implementadas, ayudarán a mejorar la calidad del producto.

Adicionalmente, se aislaron cepas de *L. plantarum* y *L. paracasei* que pueden tener un papel relevante en la inocuidad del queso debido a su producción de ácido láctico, por lo que tienen un potencial como bioconservadores, así mismo, cuentan con un potencial probiótico.

2. Introducción

2.1 Planteamiento del problema

El queso bola de Ocosingo es un queso doble crema, cubierto por un doble forro también de queso, al punto de quesillo. Su elaboración es completamente empírica. Un distintivo de estos quesos es la utilización de leche cruda en su proceso de elaboración sin que posteriormente su consumo represente un riesgo a la salud. Se busca identificar qué microorganismos están a cargo de la inhibición de bacterias patógenas, conocer su proceso de elaboración y las características de su composición que le permiten tener propiedades únicas dentro de los quesos mexicanos.

2.2 Justificación

A pesar de la historia y tradición que posee este queso en Chiapas, y de contar ya con una Marca Colectiva, no hay reportes suficientes y precisos sobre su comportamiento fisicoquímico y microbiológico. Determinar y publicar sus propiedades contribuirá a la difusión de este producto artesanal mexicano en nuestro país e incluso a su reconocimiento en territorio internacional. Sobre todo, si se demuestra que, a pesar de ser un queso elaborado con leche no pasteurizada, su consumo no ha representado un riesgo para la salud, por el contrario, es un producto con grandes bondades nutricionales y gustativas.

3. Hipótesis del trabajo

La presencia de bacterias ácido lácticas en el queso bola de Ocosingo afecta positivamente en su calidad microbiológica inhibiendo bacterias patógenas. De igual forma, algunas BAL pueden presentar características probióticas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar dos quesos bola de Ocosingo artesanal de distinto lote, mediante su análisis proximal, fisicoquímico y microbiológico. Evaluar el potencial biotecnológico de bacterias aisladas del queso como productoras de agentes antibacterianos y como probióticos.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar la caracterización de composición proximal y fisicoquímica de los quesos.
- Determinar la calidad sanitaria de los quesos mediante el análisis de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras, *E. coli* y *S. aureus*.
- Seleccionar e identificar algunas bacterias ácido lácticas aisladas del queso.
- Evaluar si presentan algún efecto antagónico contra bacterias patógenas como *S. aureus* y *L. monocytogenes*.
- Evaluar algunas actividades de enzimas de interés (proteolíticas, lipolíticas y esterolíticas) y su potencial como bacterias probióticas.

5. Marco teórico

5.1 Queso

Queso es el nombre genérico utilizado para un grupo de alimentos elaborados a base de leche, producidos alrededor del mundo en una gran diversidad de sabores, texturas y formas (Fox et al., 2017). Sandine y Elliker (1970) sugieren que existen más de 1000 variedades de queso.

Se cree que el queso aparece por primera vez en la "Media Luna Fértil" entre el río Tigris y Éufrates, en Irak, hace unos 8000 años durante la "Revolución Agrícola", cuando ciertas plantas y animales fueron domesticados. Los primeros animales domesticados fueron cabras y ovejas; ya que son pequeños, gregarios y de fácil manejo. Estos fueron utilizados para suministrar carne, leche, pieles y lana. El valor nutritivo de la leche producida por los animales domesticados fue rápidamente reconocido y la leche y sus productos derivados se convirtieron en componentes importantes de la dieta humana (Fox et al., 2017).

En México, el queso se ha elaborado desde tiempos de la Colonia, cuando los conquistadores españoles trajeron a la Nueva España los primeros hatos de ganado. Pronto se desarrollaron zonas de fuerte actividad ganadera, tal como la de Los Altos de Jalisco que desde antaño ha estado vinculada a la actividad productora de queso (Villegas, 2003).

Ramírez y Vélez (2012) definen al queso, desde un punto de vista fisicoquímico, como un sistema tridimensional tipo gel, formado por la caseína integrada en un complejo caseinato fosfocálcico, el cual por coagulación atrapa a los glóbulos de grasa, agua, lactosa, albúminas, globulinas, minerales, vitaminas y otras sustancias, las cuales permanecen adsorbidas en el sistema o se mantienen en la fase acuosa retenida.

El CODEX en su norma CODEX STAN 283-1978 define al queso como un producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto. Obtenido mediante coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantquilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que

se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso.

El CODEX menciona que se entiende por queso sometido a maduración al queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, el queso se define como aquellos productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácteos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

La misma norma define a los quesos madurados como aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso, se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

Desde el punto de vista lactológico, el queso es el nombre genérico para el alimento resultante de la coagulación de la leche de varios mamíferos (por ejemplo, vaca, cabra y oveja), y la subsiguiente deshidratación del gel por medio de varias operaciones (cortado, agitación del suero/ cuajada, etcétera) y “formateado” por moldeado y prensado (Villegas et al., 2013).

Los quesos son el grupo más diverso de todos los productos derivados de la leche y son, posiblemente, los más interesantes y desafiantes científicamente hablando. Mientras que la mayoría de los productos lácteos, sí son elaborados y almacenados de la forma apropiada, son biológica, bioquímica y químicamente muy estables, los quesos son, en contraste, biológica y bioquímicamente activos y, en consecuencia, sufren cambios en el sabor, textura y de funcionalidad. A lo largo de la fabricación y la maduración, la producción de queso representa una serie bien organizada de eventos bioquímicos consecutivos y concomitantes que, si están sincronizados y equilibrados, conducen a productos con aromas y sabores altamente deseables (Fox et al., 2017).

5.2 Queso bola de Ocosingo

El queso bola de Ocosingo es un queso conocido en Chiapas pero no en el resto del país y del mundo. Es un producto artesanal y representa una parte de la gran diversidad cultural que existe en México. La elaboración de este queso es una actividad importante para pequeños y medianos productores de leche en Ocosingo, Chiapas. Su elaboración tiene un gran valor económico para la región por su capacidad de generar y mantener empleos.

La historia de su origen y elaboración todavía no está bien documentada; existen algunos indicios basados en la tradición oral que la refieren al propio municipio de origen y que se remonta a hace unos 80 años.

El queso bola de Ocosingo es un queso muy original y único dentro de los quesos mexicanos debido a su proceso de elaboración y su forma de presentación. Es una bola dura, de diámetro entre 8 y 12 cm, y con un peso entre 500 y 1000 g (Cervantes et al., 2013).



Figura 1. Queso bola de Ocosingo (Villegas et al., 2013).

Consiste en una corteza de caseína muy consistente que encierra la pasta del queso doble crema. La que se caracteriza por ser relativamente blanca, o amarillo marfil, blanda, ácida y aromática, de grandes atributos sensoriales. El queso bola se elabora en Ocosingo, el municipio más grande del estado de Chiapas. Lo fabrican unos cuantos queseros artesanales, cuyo conocimiento técnico ha pasado por tradición oral y práctica de generación en generación (Cervantes et al., 2013).

El municipio de Ocosingo, Chiapas se localiza al extremo del estado (Figura 2). Limita al norte con el municipio de Palenque, al este y al sur con la República de Guatemala, y al oeste con los municipios de Chilón, Tenejapa, Oxchuc y Altamirano. Su extensión territorial es de 10,691 km², que representa 14.36 % de la superficie estatal; cuenta con una población total de 200,000 habitantes aproximadamente (Villegas et al., 2013). La vegetación es muy abundante, propia de la de la selva subtropical, con una rica biodiversidad. Sin embargo, en los últimos años la tala irracional y el asentamiento de grupos humanos han propiciado que grandes extensiones se encuentren ya sin vegetación. Precisamente, una parte del área municipal está ocupada por la ganadería extensiva productora de leche y carne, por medio de la ganadería de doble propósito. El territorio de Ocosingo presenta los siguientes climas: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (62.10 %); cálido subhúmedo con lluvias en verano (12.38 %); semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano (12.27 %), cálido

húmedo con lluvias todo el año (11.17 %). La precipitación se ubica entre 1,500 mm y 3,400 mm por año. Mientras que la temperatura media anual se sitúa entre 18 y 28 °C. (Villegas et al., 2013)



Figura 2. Municipio de Ocosingo en Chiapas, México (Villegas et al., 2013).

5.3 Proceso de elaboración del queso bola

La elaboración se puede dividir en dos etapas: la hechura de la pasta, por cuajado mixto (cuajo y acidez natural), y la confección del forro, a partir de leche descremada. Del queso bola de Ocosingo se puede consumir tanto el núcleo (untado, tajado o desmenuzado) como la corteza, tras calentarla, asarla o freírla (Cervantes et al., 2013).

1. Elaboración del centro doble crema.

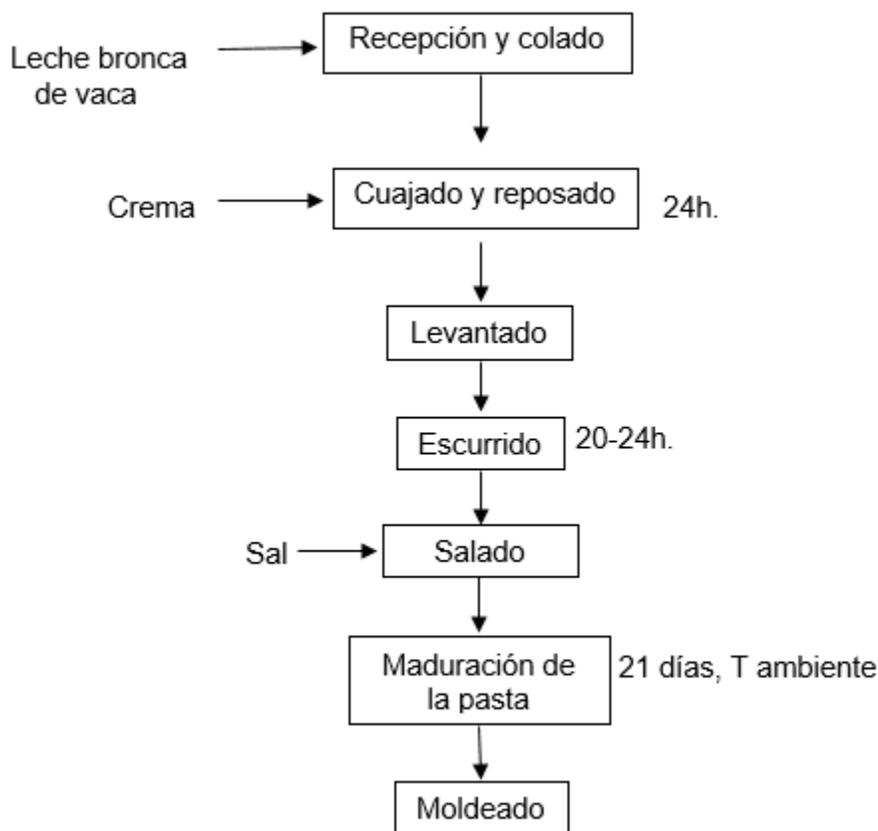


Figura 3. Proceso de elaboración del centro doble crema del queso bola de Ocosingo.

- Recepción y colado: La leche cruda es recibida y se cuela en lienzos de algodón de trama fina.
- Cuajado y reposado: Antes de la adición del cuajo, se adiciona 4 kg de crema/ 100 L de leche, con la finalidad de obtener el centro doble crema. Se agrega una dosis de 2.5-5 mL de cuajo líquido puro de ternera 1:10,000 por cada 100 L de leche y se deja reposar la leche durante 24 h, aproximadamente.
- Cortado: Se hace un corte en la cuajada para la expulsión del lactosuero. El tamaño del corte dependerá de las características finales deseadas del queso.
- Levantado o bolseado: Se coloca la cuajada en una bolsa o manta de algodón.
- Escurreido: Se deja escurrir el suero durante 20-24 h.
- Salado: Después del escurreido, se incorpora sal en proporción de 3-4 % (m/m) y se cambia la manta.

- Madurado de la pasta: La masa se deja reposar para que madure en un lapso de varios días, cambiando la manta cada tercer día. Durante cada cambio de manta, se vuelve a amasar la pasta. La maduración debe durar al menos 21 días al ambiente.
- Moldeado a mano: Se forman porciones de 400 g o 1000 g. Se compactan y se les da forma casi esférica. Las piezas se forran con dos sucesivas capas de cuajada hilada y caliente, elaborada con la leche completamente descremada. Este material, rico en caseína, al enfriarse y orearse se endurece y funciona como un empaque protector.



Figura 4. Corte de la cuajada (Universidad Autónoma de Chapingo, 2014).



Figura 5. Ecurrado de la cuajada (Universidad Autónoma de Chapingo, 2014).

2. Elaboración de la corteza de caseína.

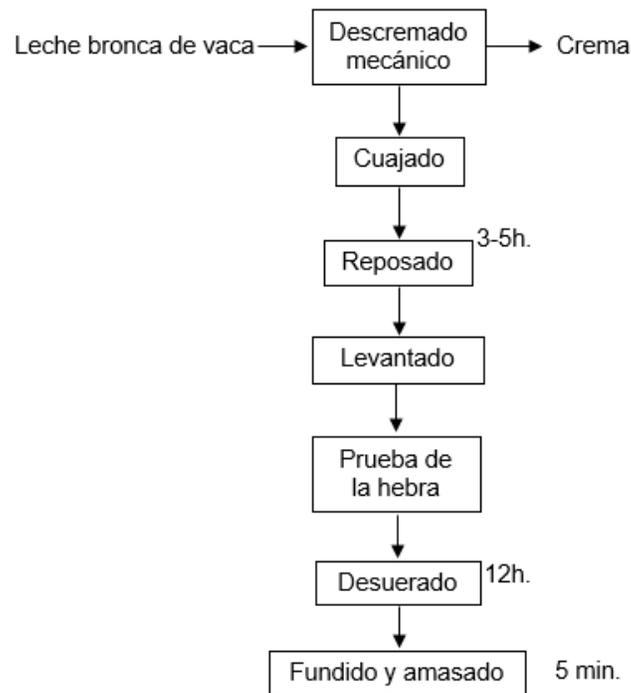


Figura 6. Proceso de elaboración de la corteza del queso bola de Ocosingo.

- Descremado mecánico: Se realiza un descremado de la leche con la finalidad de obtener la crema necesaria para utilizarla en el aumento del % de grasa del centro del queso.
- Cuajado: Se agregan 10 mL de cuajo/ 100 L de leche. Se agrega la leche y se agita para incorporarla totalmente.
- Reposado: La leche se tapa y se deja reposando de 3-5 h.
- Levantado: Se coloca la cuajada en una bolsa o manta de algodón para eliminar el lactosuero necesario.
- Prueba de la hebra: Se toma una porción de la pasta formada hasta este punto del proceso. Esta pasta es estirada con las manos y se observa el punto de estirado, con la finalidad de saber si se ha desarrollado la suficiente acidez. Una prueba positiva se observa al estirar la pasta sin que se fragmente fácilmente.
- Desuerado: La pasta se coloca en prensas donde se ejerce una presión suficiente para desuerarla.

- Fundido y amasado: La cuajada se corta en porciones de 10 cm si la prueba de la hebra fue positiva. Se agrega a agua hirviendo, se mantiene en esas condiciones 5 min y se amasa hasta que quede con una apariencia de masa elástica, lisa y brillante. Con esa masa se elaboran las dos capas que cubren al núcleo.



Figura 7. Desuerado de la pasta con prensas (Universidad Autónoma de Chapingo, 2014).



Figura 8. Formación y amasado de la doble corteza del queso bola de Ocosingo (Universidad Autónoma de Chapingo, 2014).

5.4 Sistema de producción lechera de doble propósito

El queso bola es un queso elaborado con leche cruda de vaca de doble propósito (cruza de Cebú y Pardo Suizo). Los sistemas de doble propósito se ubican en las regiones tropicales y subtropicales de México; se utilizan razas Cebuínas y sus cruza con Suizo, Holstein y Simmental; está basado en explotaciones de ganado para producción de carne y leche. El

manejo de los animales se efectúa de forma extensiva, sustentando su alimentación en el pastoreo con un mínimo de suplementación alimenticia y, ocasionalmente, el empleo de subproductos agrícolas. Cuenta con instalaciones adaptadas, empleando para su construcción material de la región (Cervantes et al., 2013).



Figura 9. Vacas en libre pastoreo. Rancho Laltic, Ocosingo, Chiapas (Universidad Autónoma de Chapingo, 2014).



Figura 10. Vacas del sistema de doble propósito en el municipio de Ocosingo en Chiapas, México (Villegas et al., 2013).

El ordeño se realiza, por lo general, en forma manual; las prácticas de medicina productiva y reproductiva, el mejoramiento genético y el manejo de los recursos forrajeros tienen un gran margen para ser mejorados. Se caracteriza por el ordeño estacional del 10 % de los vientres recién paridos que muestran un mayor temperamento lechero. Este tipo de ganadería presenta una alta estacionalidad, observando grandes picos de producción en la época de lluvias (Peralta y Lastra, 1999)



Figura 11. Colecta de leche recién ordeñada en el rancho Laltic, Ocosingo, Chiapas. (Universidad Autónoma de Chapingo, 2014).



Figura 12. Recepción de leche en la quesería, Ocosingo, Chiapas. (Universidad Autónoma de Chapingo, 2014).

Las condiciones para la producción son de alta rusticidad, aunque paulatinamente se ha ido conformando el carácter comercial de la producción de leche. El 19 % de la producción de leche es captada por Nestlé en las zonas más alejadas y aisladas de los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz; 51 % de la producción se destina a la elaboración artesanal de quesos, y el 28 % se vende como leche bronca (Odermatt y Santiago, 1997).

En la época de lluvias, que es la de mayor producción, las compañías captadoras de leche encuentran un negocio atractivo, al disminuir el precio pagado al productor por los excedentes estacionales. En 1998, su aporte a la producción nacional fue de 1,622 millones de litros, lo que representó el 19.5 % del total nacional (Villegas et al., 2013).

Según García et al., (1998), la problemática de este sistema de producción se puede resumir en las siguientes características:

- a. Baja eficiencia en el aprovechamiento de los recursos.
- b. Poco uso de tecnología moderna.
- c. Estacionalidad en la producción.
- d. Poca infraestructura para desplazar la leche del centro de producción al mercado.
- e. Gran número de intermediarios en la comercialización.
- f. Universo de productores atomizado, heterogéneo, individualista y con poca capacidad empresarial.
- g. El productor tiene mayor preferencia por producir carne, ya que este producto tiene un precio relativo mayor.
- h. Los problemas con la tenencia de la tierra han sido un obstáculo para la inversión.

La única ventaja manifiesta que presenta es su bajo costo de producción, por la reducida utilización de alimento balanceado comercial (Cervantes et al., 2013).

5.5 Comercialización del queso bola de Ocosingo

El queso circula por canales de comercialización muy específicos, ya que se produce en pequeñas cantidades y depende de la estacionalidad, debido a la variación en la disponibilidad de leche a lo largo del año. Así, se vende por encargo o pedido de clientes del

propio estado, pero también de otras entidades federativas, enviándose por paquetería y reglas concertadas de compra en los que priva la confianza de proveedores y clientes. Los queseros cuentan también con sus propios puntos de venta dentro del municipio y, algunos, en ciudades importantes de Chiapas. Asimismo, los productores aprovechan la realización de ferias ganaderas, queseras y comerciales en distintos municipios de ciudades chiapanecas o fuera del estado, a lo largo del año (Villegas et al., 2013).

5.6 Microbiología de la leche cruda

La leche recién ordeñada proveniente de una vaca sana, tiene una carga microbiana que varía entre 300 y 1,500 UFC/mL, según Arrieta (2011), es después del ordeño cuando aumenta el recuento microbiano. A pesar de aumentar la presencia de los microorganismos, estos no se desarrollan en gran proporción durante las primeras horas que siguen al ordeño, ya que la leche fresca tiene un poder bacteriostático que inhibe el desarrollo en ese lapso, dependiendo, claro está, de la temperatura; así por ejemplo, una leche muy limpia (1,000 UFC/mL) a 20°C retarda el desarrollo bacteriano de 10 a 15 horas, pero con leches muy contaminadas en las mismas condiciones puede durar no más de 2 ó 3 horas (Arrieta, 2011).

De ahí la importancia de ciertos cuidados, desde el momento del ordeño, teniendo en cuenta que hay microorganismos que se desarrollan a bajas temperaturas (psicrófilos) preferentemente entre 2 y 15°C y los que crecen entre los 15 y 35°C (mesófilos). La calidad de leche cruda, conforma tres aspectos bien definidos: composición físicoquímica, cualidades microbiológicas y cualidades organolépticas. La leche es un alimento completo y también es un medio de cultivo para el crecimiento de una variedad de microorganismos, que pueden alterar su composición y características organolépticas (Shirai et al., 1996). Los microorganismos, especialmente las bacterias y los hongos, realizan distintas y complejas acciones bioquímicas en los que participan variados números de enzimas; es así que podemos hallar bacterias que degradan las proteínas (actividad proteolítica) y/o las grasas (actividad lipolítica) (Arrieta, 2011).

En la proteólisis, la acción de las enzimas proteolíticas y proteinasas provoca la llamada “coagulación dulce” de la leche, caracterizada especialmente por la formación de compuestos

como aminos y de desprendimientos gaseosos, dando a la leche un olor desagradable. En la sacarólisis, la lactosa se degrada en glucosa y galactosa, luego por fermentación se produce ácido láctico (Arrieta, 2011). En la lipólisis, distintas bacterias y hongos provocan la descomposición de la grasa degradándola en glicerina y ácidos grasos. De igual manera, otros tipos de bacterias pueden producir gases, como las coliformes y *Clostridium butyricum*, que es una bacteria anaeróbica cuyo efecto puede observarse en la maduración del queso, ocasionando hinchamiento. *Enterobacter aerogenes* provoca generación de compuestos gomosos. *Pseudomonas ichthyosmia* provoca un típico olor y sabor a pescado debido a la formación de trimetilamina que se genera por el ataque a la lecitina (Arrieta, 2011).

El origen de la contaminación externa puede deberse a diversos factores, el ordeño, el medio ambiente, limpieza del animal, limpieza y salud del personal que trabaja, limpieza de equipos y utensilios utilizados, calidad del agua, etc. El aire, por ejemplo, puede transportar bacterias provenientes del suelo con excrementos, que contaminan con *Escherichia coli* y *Salmonella*, restos de alimentos, pajas, etc. (Arrieta, 2011). Por otro lado, si el animal no está limpio, es común encontrar en él, diversas partículas contaminantes (Shirai et al., 1996). Si no se hace una limpieza profunda de utensilios que se usan en el proceso de ordeño, especialmente en ciertos ángulos y rugosidades en donde más fácilmente se desarrollan los microorganismos, se contamina fácilmente la leche fresca. Durante la producción primaria debe reducirse al mínimo la contaminación de la leche cruda. La carga microbiana de la leche debe ser tan baja como pueda lograrse, utilizando las buenas prácticas de producción de la leche. En el momento en que se presenta a los consumidores, la leche no debe contener ningún contaminante a niveles que ponga en peligro la salud pública.

5.7 Bacterias ácido lácticas

Debido a la naturaleza de la leche cruda, existe una gran variedad de microorganismos que tienen relevancia en la inocuidad y las características finales del queso. La leche es una fuente rica de nutrientes para las bacterias que forman parte de su microbiota natural y para bacterias contaminantes que crecen bien en condiciones ambientales. Algunas bacterias contaminantes utilizan el carbohidrato de la leche, lactosa, como fuente de energía, produciendo ácido láctico como subproducto; estas bacterias, ahora conocidas como bacterias del ácido láctico

(BAL), incluyen los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*. Las BAL se utilizan en la producción de una amplia gama de leche fermentada, carne y productos vegetales fermentados. En general se consideran beneficiosas para la salud humana y se han estudiado ampliamente. El crecimiento bacteriano y la producción de ácido suelen ocurrir en la leche durante el almacenamiento. Cuando se produce una suficiente cantidad de ácido en la leche, las proteínas de la leche, caseínas, coagulan a temperatura ambiente (21°C) en la región de sus puntos isoeléctricos (~pH 4.6) para formar un gel donde la grasa y las fases acuosas de la leche quedan atrapadas (Fox et al., 2017).

Las bacterias del ácido láctico, son organismos fermentadores que producen ácido láctico como producto final mayoritario de su metabolismo. Estos organismos se utilizan mucho en la producción y conservación de alimentos. Las bacterias del ácido láctico son bacilos o cocos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativos, que no esporulan, y muestran un metabolismo exclusivamente fermentador. Todas las bacterias del ácido láctico producen este compuesto como el principal o único producto de fermentación. Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación oxidativa y, por tanto, obtienen energía solo por fosforilación a nivel sustrato. Sin embargo, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno y pueden crecer en su presencia, por lo que se conocen como anaerobios tolerantes (Mandigan et al, 2015).

La mayoría de las bacterias ácido lácticas obtienen energía solamente del metabolismo de azúcares y, por consiguiente, su distribución está normalmente limitada a ambientes en los que hay azúcares presentes. Suelen tener limitadas capacidades biosintéticas y sus exigencias nutritivas son complejas, requiriendo aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Una diferencia importante para establecer subgrupos entre estas bacterias, reside en el tipo de productos formados en la fermentación de los azúcares.

Las dos vías principales de fermentación de azúcares utilizadas por las BAL son: una denominada homofermentativa, a través de la glicólisis (vía Embden–Meyerhof-Parnas) que produce un único producto de fermentación: el ácido láctico. La vía del 6-

fosfogluconato/fosfocetolasa (vía de las pentosas fosfato), además de la producción de ácido láctico, genera otros productos finales como etanol, acetato y CO₂ (Salminen et al., 2004).

Los lactobacilos son normalmente bacilos que crecen en cadenas; su morfología puede variar entre bacilos largos y delgados o cortos y curvados, y la mayoría son homofermentadores. Son comunes en los productos lácteos y algunas cepas se utilizan en la preparación de productos derivados de la leche fermentada. Por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* se utiliza en la producción de leche ácida; *Lactobacillus delbrueckii* en la producción de yogur; y otras especies se utilizan en la producción de coles ácidas, forraje ensilado y encurtidos (Mandigan et al, 2015).

Las BAL también se han utilizado en la elaboración de alimentos fermentados tales como productos vegetales (aceitunas), lácteos (quesos) y cárnicos (salamis y chorizos). Estos microorganismos generalmente son usados como microorganismos iniciadores. Los ácidos orgánicos producidos, con la consecuente disminución del pH, se consideran como el principal agente inhibidor del crecimiento de microorganismos contaminantes. Además, la autólisis de las BAL es de especial interés en cuanto a su uso como indicadores en fermentaciones lácteas. Es por ello que es un parámetro esencial para controlar y acelerar la maduración del queso. De hecho, los iniciadores de BAL producen enzimas (peptidasas, lipasas; etc), que juegan un papel clave en el desarrollo de sabor del queso durante el proceso de maduración (Lortal y Chapot-Chartier 2005).

Los lactobacilos son normalmente más resistentes a las condiciones ácidas que el resto de las BAL y pueden crecer bien a valores de pH tan bajos como 4. Por esto, pueden obtenerse en cultivos de enriquecimiento selectivos a partir de productos lácteos y de material vegetal fermentado con medios de cultivo ácidos que contengan carbohidratos. La resistencia de los lactobacilos al ácido les permite continuar creciendo durante las fermentaciones naturales, incluso cuando el pH ha bajado demasiado y no permite el crecimiento de otras bacterias del ácido láctico. Por consiguiente, suelen ser los responsables de las fases finales de la mayoría de las fermentaciones de este tipo. Casi nunca son patógenos (Mandigan et al, 2015).

En quesos artesanales se puede encontrar una importante presencia de bacterias ácido lácticas. Estas bacterias, además de producir ácido láctico, pueden sintetizar compuestos que presentan actividad antimicrobiana de naturaleza proteínica con potencial de bioconservación. El género *Lactobacillus* es conocido por la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, como bacteriocinas y/o la producción de peptidoglucano hidrolasas (PGHs) (Lortal y Chapot-Chartier 2005).

5.8 Bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.

Las bacteriocinas son péptidos de origen ribosomal que actúan principalmente formando poros en la membrana celular de las bacterias, causándoles la muerte. Las bacteriocinas son activas frente a diferentes patógenos y estables a rangos amplios de pH y temperaturas, características que hacen de las bacteriocinas compuestos con potencial aplicación para la industria alimentaria, pues su uso puede evitar la contaminación por patógenos (Heredia et al., 2017). La unión de bacteriocinas con bacterias diana se da entre la región N-terminal de la bacteriocina (región hidrofílica) con la superficie polar de la membrana celular. Una vez unida la bacteriocina a la bacteria, la región C-terminal (región hidrofóbica) penetra hacia el interior no polar de la membrana celular, lo que resulta en la formación de poros en la membrana y como consecuencia se produce un vaciamiento intracelular, generando la pérdida de iones Na^+ y K^+ , de energía en forma de ATP y en algunos casos, de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular (Bemena et al., 2014).

Las PGHs son compuestos de naturaleza proteínica que presentan actividad inhibitoria debido a que hidrolizan el peptidoglucano, principal componente de la pared celular de bacterias. Las PGHs están involucradas en un gran número de funciones que requieren la modificación de la red rígida del peptidoglucano durante el crecimiento y la división celular. Dentro de estas funciones se incluyen la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división y la autólisis (Olvera et al., 2015).

En la industria alimentaria ambos compuestos antimicrobianos son de suma importancia. Pueden actuar como conservadores naturales inhibiendo el crecimiento de algunos

microorganismos de descomposición y patógenos causantes de infecciones, intoxicaciones o toxiinfecciones (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*) (Reyes, 2015). Estos pueden producirse por bacterias directamente en los alimentos durante la fermentación, o pueden ser adicionadas en su forma purificada (Olvera et al., 2015). Las bacterias ácido lácticas son productoras de bacteriocinas y PGHs, razón por la cual son mayormente utilizadas en la elaboración y conservación de leches fermentadas, quesos madurados y algunos vinos (Reyes, 2015).

Algunos de los bioconservadores de este tipo más utilizados en la industria alimentaria son la lisostafina, lisozima y nisina. La lisostafina es una endopeptidasa que hidroliza los enlaces glicina-glicina específicos de la pared celular de *S. aureus*, tiene aplicaciones terapéuticas para tratar infecciones causadas por este microorganismo (Kumar, 2008). La lisozima de huevo de gallina, es utilizada para la conservación de quesos y vinos (Callewaert et al., 2011). La nisina es una bacteriocina que se ha utilizado como antimicrobiano en alimentos por más de 30 años, ya que se encuentra de manera natural en muchos productos lácteos (Delves-Broughton et al., 1996).

5.9 Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los microorganismos probióticos como aquellos cultivos puros o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que aplicados al hombre y los animales en cantidades adecuadas aportan efectos benéficos al huésped mejorando las propiedades de la microbiota nativa.

De acuerdo con Guevara (2011) los microorganismos probióticos son un grupo de microorganismos vivos que tienen un efecto benéfico en el tracto intestinal, manteniendo y fortaleciendo los mecanismos de defensa contra patógenos sin alterar las funciones fisiológicas y bioquímicas. Los principales géneros utilizados como probióticos en cultivos puros o mezclas son *Aspergillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides* y *Lactobacillus* (Sumano y Ocampo 2006).

Este tipo de microorganismos son una alternativa al uso de los antibióticos con el fin de equilibrar la microbiota intestinal (Oyetayo y Oyetayo 2005).

Debido a que las bacterias ácido lácticas prevalecen en los alimentos fermentados, poseen un bajo potencial patogénico y son parte de la microbiota normal de las mucosas, se les considera como microorganismos GRAS (General Regarded As Safe) (Obed y Liong 2011). Investigaciones que han sido realizadas a las BAL demuestran una serie de beneficios potenciales a la salud. Sin embargo, los efectos que se han descritos sólo pueden ser atribuidos a algunas cepas en específico, y no se pueden generalizar a todas las especies, ni a todo el grupo (Gaggía et al., 2010).

El grupo de bacterias pertenecientes a *Lactobacillus* ha sido asociado con varios efectos benéficos en la salud humana y animal (Iñiguez et al., 2007).

La evidencia clínica más fuerte a favor de las BAL está relacionada con su uso como probióticos para mejorar la función del intestino y estimular el estado inmunitario en los humanos y animales (Hempel et al., 2012).

En múltiples estudios, el consumo de kéfir y kefiran en modelos animales ha sido asociado con el aumento de microorganismos benéficos en el intestino, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras que también se ha observado un decremento en la cuenta de especies patógenas como *Clostridium perfringens* (Liu et al., 2006; Hamet et al., 2016). El consumo de kéfir también reduce la severidad de la infección por *Giardia intestinalis* en ratones C57BL/6, mediante el mecanismo de modulación del sistema inmune (Correa et al., 2013). Cepas específicas de *Lactobacillus* aisladas del kéfir, han mostrado tener la capacidad de adherirse a las células Caco-2 e inhibir la adherencia de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 (Santos et al., 2003; Hugo et al., 2008; Huang et al., 2013).

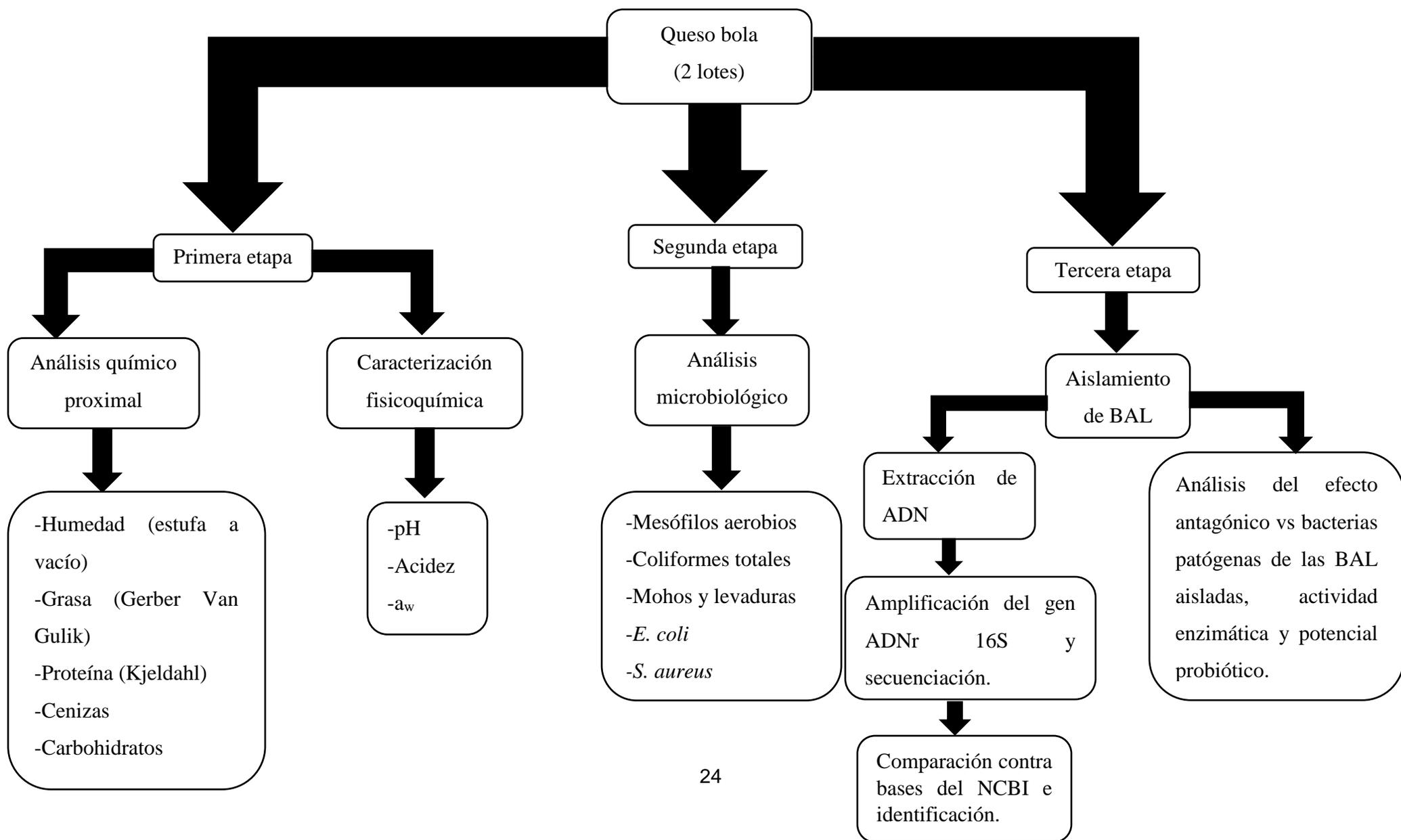
Otros estudios *in vitro* demuestran que los *Lactobacillus* aislados del kéfir tienen la habilidad de proteger las células Vero de la Shiga toxina tipo II producida por *Escherichia coli* O157:H7, lo que conduce a niveles más bajos de muerte celular (Kakisu et al., 2013). Se

observaron efectos similares en otro estudio en el que observaron que la leche fermentada kéfir inhibía la capacidad de uso de los factores extracelulares de *Bacillus cereus* para causar daño a las células Caco-2 (Kakisu et al., 2007).

Además de regular la composición microbiana, el kéfir puede modificar la actividad de la microbiota. Algunas cepas de *Bifidobacterium* han demostrado incrementar su crecimiento cuando se encuentran en el kéfir y también se han observado cambios en la expresión de genes (Serafini et al., 2014).

6. Metodología

6.1 Diagrama experimental



Se utilizaron dos quesos bola de distinto lote, de acuerdo a lo comunicado por el productor. En la primera etapa se analizó el centro y la corteza del queso, en la segunda y tercera etapa se analizó únicamente el centro debido a que es la parte más consumida y esta etapa abarca análisis microbiológico.

6.2 Mesófilos aerobios (Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994): Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 1 min/250 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-5} . De la dilución de 10^{-4} y 10^{-5} , se colocó 1 mL en cajas Petri, se adicionó agar cuenta estándar (Merck) y se incubó a 37 °C por 24-48 h.

6.3 Mohos y levaduras (Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994): Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 1 min/250 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-5} . De la dilución de 10^{-4} y 10^{-5} , se colocó 1 mL en cajas Petri, se adicionó agar papa dextrosa (Bioxon) acidificado con ácido tartárico 10 % (m/v) y se incubó a 28 °C por 3-5 días.

6.4 *Escherichia coli* y coliformes totales (Manual Petrifilm EC 3M): Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 1 min/250 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-5} . De la dilución de 10^{-2} , se colocó 1 mL en el centro de la película inferior y se bajó la película superior evitando la formación de burbujas. Se colocó el dispersor sobre el inóculo y se presionó suavemente para distribuirlo sobre toda el área circular. Se retiró el dispersor y se esperó 1 min hasta que solidificó el gel. Cada placa se incubó cara arriba a 37 °C/ 24 h para coliformes (colonias rojas) y 37 °C/ 48 h para *E. coli* (colonias azules).

6.5 *Staphylococcus aureus* (Manual Staph Express 3M): Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en una bolsa para stomacher. Se agregaron 90 mL de agua

peptonada estéril y se homogeneizó 1 min/250 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-5} . De la dilución de 10^{-2} , se colocó 1 mL en el centro de la película inferior y se bajó la película superior evitando la formación de burbujas. Se colocó el dispersor sobre el inóculo y se presionó suavemente para distribuirlo sobre toda el área circular. Se retiró el dispersor y se esperó 1 min hasta que solidificó el gel. Cada placa se incubó cara arriba a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 24 h. Contar colonias rojo-violeta como *S. aureus*.

6.6 Determinación de proteína (Kjedalh AOAC).

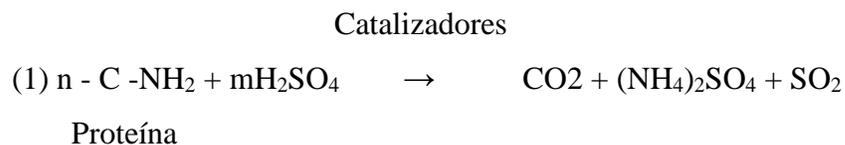
Se debe utilizar la muestra previamente desengrasada para facilitar la digestión. Se pesaron 0.2 g de queso en balanza analítica (Denver Instrument TP-214 24850587). En un tubo Kjeldalh junto con una pastilla digestora se agregaron 10 mL de H_2SO_4 concentrado y se sometió a digestión hasta obtener una coloración verde. El tubo se colocó en un destilador al que se le agregaron aproximadamente 50 mL de NaOH 40 % (m/v), se destiló y se recolectó en 50 mL ácido bórico 4 % (m/v) con 10 gotas de verde de bromocresol 0.1 % (m/v). El nitrógeno amoniacal se tituló con HCl 0.1 N. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \left(\frac{\text{ml de HCl gastados} \times \text{Normalidad HCl} \times 0.014 \text{ meq}}{\text{gramos de muestra}} \right) \times 100$$

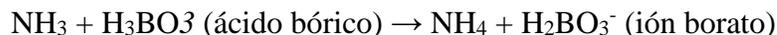
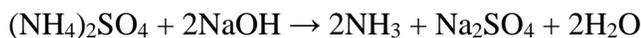
$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.38$$

En los productos lácteos, el contenido de proteína es de 6.38 veces el contenido de nitrógeno, es decir, las proteínas presentan alrededor del 16 % de nitrógeno.

Digestión:



Neutralización y destilación:



Titulación:



6.7 Contenido de grasa (NMX-F-710-COFOCALEC-2014): Se pesaron 3 g de queso en balanza analítica (Denver Instrument TP-214 24850587) sobre un butirómetro con 15 mL de H_2SO_4 62.63 % (m/m) (el método requiere H_2SO_4 concentrado de densidad 1.530 a 288 K (15°C), por lo que se tuvieron que realizar diluciones para ajustar la concentración) y se colocaron en un baño (Oaklon Stable Temp., 175001-00) a 65 °C/30 min. Se agregó 1 mL de alcohol isoamílico (grado analítico). Se agitó y adicionó H_2SO_4 hasta $\frac{3}{4}$ de la columna graduada. Se colocó en el baño por 5 min. Se mezcló y centrifugó (Garver, Manufacturing Co., Modelo 424G) a 2000 rpm/5 min. Se incubó 10 min y se observó la lectura.

6.8 Humedad (Procedimiento de Nielsen, 2003): Los pesafiltros utilizados se pusieron a peso constante en estufa (Riossa modelo: H-48) a 120 °C por 20 min. En cada pesafiltro se colocaron 3 g de queso pesados en balanza analítica (Denver Instrument TP-214 24850587). Las muestras fueron colocadas en estufa con vacío (Lab-Line Instruments, Inc. 29380) a 70 °C durante 8 h. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{\text{peso muestra humeda (g)} - \text{peso muestra seca (g)}}{\text{peso muestra humeda (g)}} \right) \times 100$$

6.9 Cenizas (NMX-F-701-COFOCALEC-2016): Se pusieron los crisoles a peso constante en estufa (Riossa modelo: H-48) a 120 °C por 20 min. Se pesaron 3 g de queso en balanza analítica (Denver Instrument TP-214 24850587) y se carbonizaron. Los crisoles se introdujeron en una mufla (Thermolyne type 1500 turnase modelo: F-D1525M) a 550 °C por 8 h. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\text{Cenizas (\%)} = \left(\frac{\text{peso cenizas (g)}}{\text{peso muestra (g)}} \right) \times 100$$

6.10 Carbohidratos: El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia, considerando los resultados obtenidos de humedad, cenizas, grasa y proteína.

6.11 pH (NOM-F-317-S-1978): Se pesaron 9 g de queso en balanza analítica (Ohaus) y fueron colocados en un matraz de 250 mL con 100 mL de agua destilada pH= 7 a temperatura ambiente. Se incubaron a 30 °C/200 rpm/15 min. Se filtró cada muestra por gravedad. Se midió el pH con potenciómetro (Hanna HI 4211).

6.12 Acidez (NMX-F-206-1986): Se pesaron 9 g de queso en balanza analítica (Ohaus) y fueron colocados en un matraz de 250 mL con 100 mL de agua destilada pH= 7 a temperatura ambiente. Se incubó a 30 °C/200 rpm/15 min. Se filtró cada muestra por gravedad. Se tomaron 25 mL de filtrado con 0.5 mL de fenolftaleína 1 % (v/v). Se tituló con NaOH 0.1 N hasta la obtención de vire rosa claro persistente. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\text{Ácido láctico (\%)} = \left(\frac{\text{ml NaOH} \times \text{Normalidad NaOH} \times 0.09 \text{ milieq. ácido láctico}}{\text{gramos de muestra}} \right) \times 100$$

6.13 aw (Manual LabSwift- a_w . Neutec Group Inc. Novasina): Se colocó 1 g de muestra bien distribuida en la base de plástico que incluye el equipo (LabSwift- a_w marca Neutec Group Inc. Novasina). El equipo fue cerrado cuidadosamente y se esperó hasta que se obtuviera una medición constante.

6.14 Aislamiento de bacterias ácido lácticas: Se pesaron 10 g de queso. Se agregaron 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó 1 min/250 rpm. Se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada estéril hasta 10^{-3} . De las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , se sembró por agotamiento en agar MRS (Oxoid) y se incubó a 37 °C/ 48 h.

6.15 Confirmación de la pureza de las cepas: Del aislamiento realizado por estría en cuadrante radial en agar MRS, incubado a 37 °C/ 24-48 h, se seleccionaron colonias aisladas en agar MRS, a las cuales se les realizó picadura con un asa microbiológica estéril y se continuó realizando el procedimiento descrito en el manual de Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos 2ª ed. Facultad de Química UNAM para la

técnica de tinción de Gram (Anexo) para observar la pureza de cada cepa, así como las características morfológicas que presentaban.

6.16 Conservación de las cepas: Posterior a la tinción de Gram donde se confirmó mediante la morfología observada que las cepas se encontraban puras, seis cepas fueron seleccionadas al azar y se colocaron, en un criovial, 900 μ L de caldo MRS con cultivo más 900 μ L de glicerol al 30 % (v/v) estéril y se almacenaron en un congelador a -20 °C. De cada cepa se realizó un total de 15 gliceroles para cada una.

6.17 Extracción de ADN de cepas aisladas del queso bola: Un cultivo de 10 mL de caldo MRS se centrifugó a 8,000 rpm/10 min/4 °C (Biofuge Primo R, Haereus), para obtener un botón celular que se lavó con 20 mL de solución salina estéril 0.85 % (m/v) dos veces, se recuperó el paquete celular y se siguieron las indicaciones del protocolo de extracción de ADN del kit: Fast ID Genomic DNA Extraction Kit (Genetic ID NA, INC; USA). Se cuantificó la concentración de ADN obtenido para cada cepa, a una absorbancia de 260 nm utilizando el espectrofotómetro para microplacas Epoch (Bio Tek) y una placa Take 3 micro-volume (Bio Tek). Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio 0.1 % (v/v). El ADN se une por afinidad a una membrana de sílice y se eliminan contaminantes con lavados con etanol al 70 % (v/v), para ser eluido con buffer Tris-EDTA (Genomic DNA Extraction Kit Manual).

6.18 Amplificación del gen 16S: El ADN se sometió a una reacción de amplificación del gen 16S usando los cebadores fD1 y rD1. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio 0.1 % (v/v) para visualizar los productos de amplificación, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1kb, esto para observar bandas de un tamaño aproximado de 1500 pb.

Tabla 1. Condiciones de amplificación.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Etapa
1	95	3	Desnaturalización inicial
35	95	0.5	Desnaturalización
	42	0.5	Alineamiento
	72	3	Extensión
1	72	10	Extensión final

Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación.

Cebador	Secuencia 5' -3'
fD1	CCGAATTCGTCGACCACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTTGATCCAGCC

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Amortiguador Pfu + MgSO ₄	10 X	1 X	5
dNTP	10 mM	0.2 mM	1
Cebador directo fD1	100 µM	0.2 µM	0.1
Cebador reverso rD1	100 µM	0.2 µM	0.1
ADN polimerasa Pfu	2.5 U/µL	1 U	0.4
ADN	X ng/reacción	100 ng/reacción	X
Agua	-	-	50

6.19 Purificación de los productos de PCR: Se utilizó el kit DNA Clean & Concentrator TM-5 (Zymo Research; USA). Se cuantificó la concentración y pureza de los amplicones con un espectrofotómetro para microplacas Epoch (Bio Tek) y una placa Take 3 (Bio Tek, USA) a 260 y 280 nm.

6.20 Secuenciación: Los productos purificados, fueron secuenciados en MACROGEN Co., Seúl, Corea.

6.21 Alineamiento de las secuencias y comparación contra bases de datos: Las secuencias se analizaron con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

6.22 Cinéticas de crecimiento: A partir de los gliceroles se realizaron preinóculos agregando 50 μ L en 50 mL de caldo MRS, se incubaron por 12 h a 37°C. Posteriormente se adicionaron en 50 mL de caldo MRS 20 μ L de preinóculo, se incubaron a 37 °C y se tomó una alícuota de 1 mL cada 120, 60 o 30 min dependiendo del crecimiento medido. Se determinó la densidad óptica en cada uno de los puntos de la cinética de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro (TermoFisher Scientific Biomate 3; USA). Se elaboró para cada cepa una gráfica de densidad óptica (LnDO) vs tiempo.

6.23 Análisis del efecto antagónico contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* de las BAL aisladas. Liofilización: Las muestras se obtuvieron de la fase exponencial tardía-estacionaria temprana de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei*. Después de la incubación cada medio se centrifugó a 8,500 rpm durante 15 min a 4 °C (Biofuge Primo R). Los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron a pH 7 con NaOH 50 % (m/v). Posteriormente, cada muestra fue filtrada con una membrana de 0.22 μ m. Este sobrenadante fue colocado a -20 °C hasta su total congelación. Posteriormente se liofilizó cada muestra y se suspendió en buffer de fosfatos pH= 7. La actividad inhibitoria se probó contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Estos microorganismos se reactivaron en caldo BHI, se agregaron 50 μ L de cada microorganismo en 5 mL de caldo y se incubó a 37 °C/12 h. De cada pre-inóculo se realizó una dilución 1:100 con solución salina isotónica (SSI). Se prepararon cajas Petri con 27.6 mL de BHI con 0.8 % de agar y 2.4 mL del pre inóculo de patógeno. Una vez solidificado el agar, se hicieron pozos con el extremo superior de una punta para micropipeta P1000 estéril. En los pozos se cargaron 200 μ L de cada una de las muestras

liofilizadas. Adicionalmente se colocaron 200 μ L de Nisaplin (10 mg/mL) como control positivo.

6.24 Análisis del efecto antagónico contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* de las BAL aisladas. Precipitación con $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 60 % (m/v): Las muestras se obtuvieron de la fase exponencial tardía-estacionaria temprana de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei*. Después de la incubación cada medio se centrifugó a 8,500 rpm durante 15 min a 4 °C (Biofuge Primo R). Los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron a pH 7 con NaOH 50 % (m/v). Posteriormente, cada muestra fue filtrada con una membrana de 0.22 μ m. A este sobrenadante se le adicionó $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 60 % (m/v). Se agregaron lentamente 18 g de $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ por cada 50 mL de sobrenadante, manteniéndolo en agitación y a 4 °C durante 2 h. Después de la agitación, se centrifugaron a 8,500 rpm por 20 min a 4 °C. Finalizado el tiempo, se obtuvo un pellet decantando el sobrenadante y cada muestra se suspendió en buffer de fosfatos pH= 7. La actividad inhibitoria se probó contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Estos microorganismos se reactivaron en caldo BHI, se agregaron 50 μ L de cada microorganismo en 5 mL de caldo y se incubó a 37 °C/12 h. De cada pre-inóculo se realizó una dilución 1:100 con solución salina isotónica (SSI). Se prepararon cajas Petri con 27.6 mL de BHI con 0.8 % de agar y 2.4 mL del pre inóculo de patógeno. Una vez solidificado el agar, se hicieron pozos con el extremo superior de una punta para micropipeta P1000 estéril. En los pozos se cargaron 200 μ L de cada una de las muestras liofilizadas. Adicionalmente se colocaron 200 μ L de Nisaplin (10 mg/mL) como control positivo.

6.25 Análisis del efecto antagónico contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* de las BAL aisladas. Precipitación con $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 80 % (m/v): Las muestras se obtuvieron de la fase exponencial tardía-estacionaria temprana de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei*. Después de la incubación cada medio se centrifugó a 8,500 rpm durante 15 min a 4 °C (Biofuge Primo R). Los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron a pH 7 con NaOH 50 % (m/v). Posteriormente, cada muestra fue filtrada con una membrana de 0.22 μ m. A este sobrenadante se le adicionó $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 80 % (m/v). Se

agregaron lentamente 25.8 g de $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ por cada 50 mL de sobrenadante, manteniéndolo en agitación y a 4 °C durante 2 h. Después de la agitación, se centrifugaron a 16,000 rpm por 20 min a 4 °C. Finalizado el tiempo, se obtuvo un pellet decantando el sobrenadante y cada muestra se suspendió en buffer de fosfatos 100 mM, EDTA 1 mM, NaCl 20 mM y PMSF 1mM, pH= 7. La actividad inhibitoria se probó contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Estos microorganismos se reactivaron en caldo BHI, se agregaron 50 µL de cada microorganismo en 5 mL de caldo y se incubó a 37 °C/12 h. De cada pre-inóculo se realizó una dilución 1:100 con solución salina isotónica (SSI). Se prepararon cajas Petri con 27.6 mL de BHI con 0.8 % de agar y 2.4 mL del pre inóculo de patógeno. Una vez solidificado el agar, se hicieron pozos con el extremo superior de una punta para micropipeta P1000 estéril. En los pozos se cargaron 200 µL de cada una de las muestras liofilizadas. Adicionalmente se colocaron 200 µL de Nisaplin (10 mg/ mL) como control positivo.

6.26 Monitoreo del pH durante la fermentación: A partir de los gliceroles se realizaron preinóculos agregando 50 µL en 50 mL de caldo MRS, se incubaron por 12 h a 37°C. Posteriormente se adicionaron en 50 mL de caldo MRS 20 µL de preinóculo, se incubó a 37 °C y se tomó una alícuota de 100 µL cada 120, 60 o 30 min dependiendo del crecimiento medido. Se determinó el pH en un potenciómetro (Hanna HI-4211). Se elaboró para cada cepa una gráfica de pH vs tiempo.

6.27 Acidez titulable de las bacterias ácido lácticas: Se realizó la fermentación de cada cepa trabajada hasta alcanzar la fase estacionaria. De cada matraz de fermentación se tomaron alícuotas de 15 mL. Con un potenciómetro (Hanna), se determinó el pH del medio MRS sin cultivo que se tomó como referencia para la titulación de las alícuotas de cada cepa. Cada alícuota se tituló con NaOH 0.1 N, hasta llegar al pH de referencia. El cálculo correspondiente se muestra a continuación:

$$\text{Ácido láctico (\%)} = \left(\frac{\text{ml NaOH} \times \text{Normalidad NaOH} \times 0.09 \text{ milieq. ácido láctico}}{\text{gramos de muestra}} \right) \times 100$$

6.28 Evaluación de la actividad esterolítica: A partir de los glicerolos de conserva de las cepas de *Kocuria rhizophila*, se realizó una estría radial en agar leche descremada para obtener colonias aisladas y poder utilizarlas como control positivo. Cada caja de agar tributirina se dividió en cuatro partes iguales. Se tomó con un asa microbiológica una cantidad de colonia aislada de *Kocuria rhizophila* y de cepa de BAL aisladas, se sembraron por triplicado mediante picadura en uno de los cuadrantes de las cajas de agar tributirina. Se incubó a 37 °C y se observó cada 24 h si presenta actividad.

6.29 Evaluación de la actividad lipolítica: A partir de los glicerolos de conserva de las cepas de *Kocuria rhizophila*, se realizó una estría radial en agar leche descremada para obtener colonias aisladas y poder utilizarlas como control negativo. Cada caja de agar aceite de oliva se dividió en cuatro partes iguales. Se tomó con un asa microbiológica una cantidad de colonia aislada de *Kocuria rhizophila* y de cepa de BAL aisladas, se sembraron por triplicado mediante picadura en uno de los cuadrantes de las cajas de agar aceite de oliva. Se incubó a 37 °C y se observó cada 24 h si presenta actividad.

6.30 Evaluación de la actividad proteolítica: A partir de los glicerolos de conserva de las cepas de *Kocuria rhizophila*, se realizó una estría radial en agar leche descremada para obtener colonias aisladas y poder utilizarlas como control positivo. Cada caja de agar leche descremada se dividió en cuatro partes iguales. Se tomó con un asa microbiológica una cantidad de colonia aislada de *Kocuria rhizophila* y de cepa de BAL aisladas, se sembraron por triplicado mediante picadura en uno de los cuadrantes de las cajas de agar leche descremada. Se incubó a 37 °C y se observó cada 24 h si presenta actividad.

6.31 Evaluación de resistencia al paso gastrointestinal de bacterias ácido lácticas:

Las condiciones de estrés se adaptaron del trabajo de Lo Curto et al., (2011) y Adouard et al., (2014). Los jugos gástricos y duodenales simulados fueron preparados un día antes del experimento. El jugo gástrico consiste en pepsina (0.025 g/L), lipasa (0.2 g/L) y NaCl (2.75 g/L) suspendidos en buffer glicina-HCl 0.020 M pH 3 a 37 °C. El jugo duodenal consiste en pancreatina (9 g/L), sales biliares (30 g/L) y NaCl (7 g/L) suspendidos en

buffer 0.1 M de fosfatos pH 6.5 a 37 °C. Para el experimento de estrés continuo se partió de la composición del jugo gástrico y después de 1 h de incubación, se ajustó el pH a 6.5 y se agregaron sales biliares y pancreatina.

Se llevó a cabo la fermentación en caldo MRS de las seis cepas. Estas se incubaron a 37 °C durante el tiempo necesario para llegar a la fase logarítmica tardía. Posteriormente, se agregó cuantitativamente 1 mL de cultivo de MRS en 9 mL de buffer glicina-HCl pH = 3, simulando el paso de alimentos por el jugo gástrico. Se tomó 1 mL y se sembró en agar MRS (t = 0) y se incubó a 37 °C / 24 o 48 h. El buffer glicina-HCl con cultivo se incubó a 37 °C / 100 rpm / 1 h. Terminado el tiempo de incubación se sembró 1 mL en agar MRS (t = 1) y se incubó a 37 °C / 24 o 48 h. Del mismo matraz del cultivo inicial se inoculó 1 mL en buffer de fosfatos pH = 6.5, simulando el paso de alimentos por el jugo duodenal. Se tomó 1 mL y se sembró en agar MRS (t = 0) y se incubó a 37 °C / 24 o 48 h. El buffer de fosfatos con cultivo se incubó a 37 °C / 100 rpm / 2 h. Terminado el tiempo de incubación se sembró 1 mL en agar MRS (t = 2) y se incubó a 37 °C / 24 o 48 h.

Adicionalmente, se realizó el experimento de estrés conjunto en serie, tomando la base de la composición del jugo gástrico, se inoculó 1 mL de cultivo fermentado en 9 mL de buffer glicina-HCl pH = 3. Se tomó 1 mL y se sembró en agar MRS, se incubó a 37 °C / 24 o 48 h. El buffer con cultivo se incubó a 37 °C / 100 rpm / 1 h, posteriormente se ajustó el pH a 6.5 con Na₂CO₃ 1 M y se adicionaron sales biliares y pancreatina. Se incubó durante 2 h más a 37 °C / 100 rpm. Terminado el tiempo de incubación se sembró 1 mL en agar MRS (t = 3) y se incubó a 37 °C / 24 o 48 h. Se calculó el % de sobrevivencia de la siguiente manera:

$$\text{Sobrevivencia (\%)} = \left(\frac{\log \frac{UFC}{ml} \text{ de sobrevivientes}}{\log \frac{UFC}{ml} \text{ de células iniciales}} \right) \times 100$$

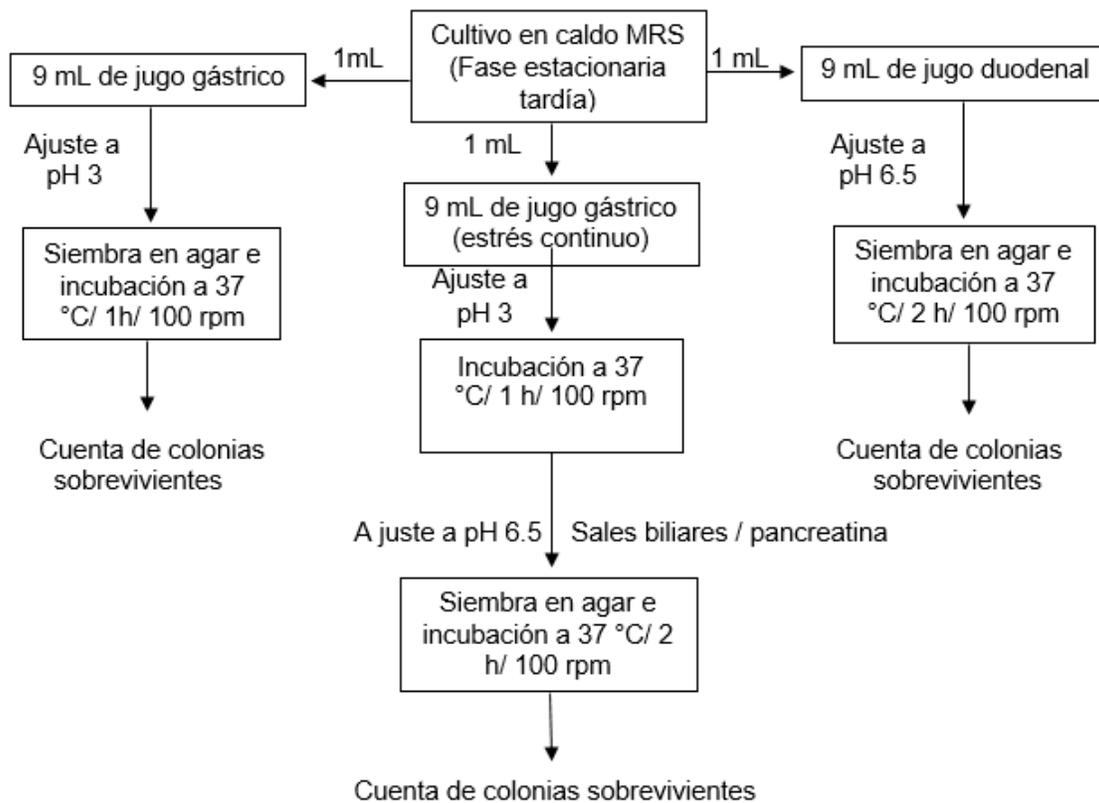


Figura 13. Experimentos *in vitro* de estrés gástrico, duodenal y continuo.

7. Resultados y discusión

7.1 Análisis microbiológico (únicamente del centro de los quesos)

Tabla 4. Calidad microbiológica del queso bola de Ocosingo.

Lote	Determinación					
	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
1	25x10 ⁶	<10	14x10 ⁶	7x10 ²	<10	8x10 ³
2	4x10 ⁶	<10	14x10 ⁶	16x10 ³	<10	23x10 ³
NOM-243-SSA1-2010	-	500	500	≤100	100	≤100

n= 3

La cuenta obtenida de mesófilos aerobios resultó ser muy alta y la de levaduras no cumple con los parámetros establecidos en la NOM-243-SSA1-2010. Sin embargo, hay que considerar que esta norma sólo establece límites para aquellos quesos que han sido elaborados a partir de leche pasteurizada. Actualmente la legislación mexicana no cuenta con parámetros de calidad para quesos no industrializados. Los quesos artesanales por ser elaborados con leche cruda, permiten el desarrollo de características organolépticas únicas otorgadas por la microbiota nativa inicial de la leche, que ocasiona que las cuentas de mesófilos y levaduras resulten altas. La alta carga microbiana obtenida es debida a la utilización de leche cruda y a las condiciones higiénicas durante el proceso de elaboración, que pudieron no haber sido las adecuadas.

La cuenta de microorganismos coliformes totales tampoco cumple con la normatividad mexicana. Una fuente importante de contaminación de coliformes se da mediante el contacto del alimento con las manos de los obreros y sobre todo en el ordeño de las vacas, ya que la producción de leche para la elaboración de quesos bola es realizada comúnmente mediante un sistema de doble propósito donde las vacas están en libre pastoreo, el ordeño no suele ser el adecuado y los corrales no suelen estar pavimentados, ocasionando que las ubres pueden estar en contacto con materia fecal.

S. aureus es un microorganismo que suele encontrarse en la leche cruda como resultado de un ordeño inadecuado debido a que el microorganismo puede llegar a alojarse en las ubres (y zonas externas) de vacas que tienen mastitis; y una baja calidad higiénica y sanitaria (Touch et al., 2009). Esta bacteria también puede encontrarse en el ambiente como en el aire, polvo, superficies y agua y puede localizarse en el tracto nasofaríngeo de personas, cabello y piel sin causar daños aparentes (Camacho et al., 2009). A pesar de haber obtenido una cuenta de 10^3 , el número de UFC/g para que un alimento pueda provocar intoxicación sería de 10^5 de acuerdo a la FDA. Sin embargo, es muy importante reducir la carga para evitar una posible intoxicación de los consumidores.

La elevada carga encontrada de *S. aureus* también podría ser debida a la contaminación directa por manipulación de los obreros y a contaminación cruzada causada porque el proceso no es lineal, ya que la materia prima está en contacto con las mismas superficies que el producto terminado.

El único parámetro de la NOM-243-SSA1-2010 que el queso bola cumple es la cuenta de *E. coli*, ya que se encontró ausencia de este microorganismo.

Para mejorar la calidad microbiológica del queso y generar un mejor impacto y confiabilidad en los consumidores, además de tomar en cuenta que la legislación mexicana obliga a contar con un sistema HACCP a todos los productos lácteos que han sido elaborados con leche no pasteurizada, se pueden plantear una serie de recomendaciones para los productores que les permita reducir las cuentas de *S. aureus*, levaduras y coliformes totales. Es importante considerar que al utilizar leche no pasteurizada durante el proceso de elaboración, la implementación de un sistema HACCP no ayudará a disminuir la cuenta de mesófilos aerobios y levaduras en gran cantidad.

Una de las recomendaciones es mejorar las condiciones de ordeño para evitar contaminación directa en la leche. Lo ideal es seguir las 12 reglas de oro para la rutina de ordeño propuestas por DeLaval. Se señalan en letras *itálicas y negritas* los puntos más importantes a considerar para el proceso de elaboración del queso bola.

Antes del ordeño.

1. ***Controlar la salud de la ubre regularmente.***
2. Seguir el orden de ordeño correcto.
3. ***Depositar los primeros tres chorros de leche en un jarro de fondo oscuro.***
4. ***Desinfectar y secar los pezones antes del ordeño.***

Durante el ordeño.

5. Comprobar el nivel de vacío de las pezoneras.
6. Colocar la unidad de ordeño a tiempo.
7. Evitar el sobre ordeño.
8. Retirar la unidad de ordeño correctamente.

Después de ordeñar.

9. ***Sellar para desinfectar los pezones de inmediato.***
10. Limpiar y desinfectar el equipo de ordeño.
11. ***Asegurar un correcto enfriamiento de la leche.***
12. Controlar regularmente los resultados del ordeño.

También es importante revisar el manual de buenas prácticas de ordeño de la FAO, donde se mencionan puntos adicionales como la limpieza del local de ordeño, correcto arreo de las vacas, implementación de horarios fijos para el ordeño, lavado correcto de manos y brazos de ordeñadores, lavado de utensilios y uso de ropa adecuada para el ordeño. Al seguir estas recomendaciones se mejorará la calidad de los quesos y sobre todo disminuirá la carga de microorganismos coliformes y *S. aureus*.

Es importante considerar prácticas de higiene más generales como las descritas en los Textos Básicos Sobre Higiene de los Alimentos del Codex Alimentarius y la NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. en estos documentos se encontrará la información necesaria para evitar contaminación directa y cruzada del personal que maneja los alimentos, equipos utilizados en el proceso, etc. Por último, para evitar el riesgo de contaminación ambiental, se recomienda implementar en lo

posible los procedimientos descritos en el capítulo 3: Diseño higiénico de plantas para la elaboración de alimentos, del libro Higiene en el proceso de alimentos. Donde se detalla el diseño que deben tener los lugares donde se elaboran alimentos para reducir los riesgos de contaminación provenientes del exterior de la planta.

7.2 Análisis Químico Proximal

Determinación de cenizas.

Tabla 5. Contenido de cenizas en quesos bola de Ocosingo.

Lote	Muestra	Cenizas (%)	Cenizas (%) (López et al., 2015)
1	Centro	3.84 ± 0.05	2.8 ± 0.6
	Corteza	6.23 ± 0.04	5.3 ± 0.9
2	Centro	4.09 ± 0.53	-
	Corteza	6.21 ± 0.04	-

n= 3

El contenido de cenizas en quesos está relacionado principalmente con la cantidad de sal que se utiliza como ingrediente y con la composición de la leche utilizada, que a su vez varía de acuerdo con diversos factores, tales como raza y edad de la vaca, tipo y frecuencia de la alimentación (proporción de los forrajes y concentrados, contenido de proteínas y composición de la grasa), estado de lactación, temperatura ambiente, enfermedades, época del año, hora del día del ordeño, etc. (Badui, 2006). La diferencia del contenido de cenizas entre el centro y la corteza es debida a una mayor evaporación de agua que sufre la corteza durante la maduración, ocasionando una mayor concentración de compuestos minerales.

Determinación de humedad.

Tabla 6. Contenido de humedad en quesos bola de Ocosingo

Lote	Muestra	Humedad (%)	Humedad (%) (López et al., 2015)
1	Centro	39.01 ± 0.04	35.7 ± 5.5
	Corteza	32.93 ± 0.40	45.9 ± 5.1
2	Centro	41.54 ± 0.30	-
	Corteza	38.39 ± 0.53	-

n= 3

El queso bola es un queso madurado durante 21 días, aproximadamente. Su porcentaje de humedad disminuye a medida que el queso se va madurando. El tiempo de maduración es un

factor determinante en el descenso de la humedad (Osorio et al., 2004). Los resultados obtenidos son los esperados, pues al ser un queso madurado el contenido de humedad no debe de ser muy alto como el de un queso fresco, que llegan a contener más del 50 %. Debido a la protección brindada por la corteza al recubrir el centro del queso, la pérdida de humedad es mayor en la parte exterior del queso, por lo cual se observa un mayor contenido de humedad en el centro. La humedad del queso además de ser modificada por la maduración, se ve afectada por el corte de la cuajada y el prensado.

Determinación de grasa.

Tabla 7. Contenido de grasa en quesos bola.

Lote	Muestra	Grasa (%)	Grasa (%) (López et al., 2015)
1	Centro	31.66 ± 1.04	39.3 ± 7.9
	Corteza	1.50 ± 0.00	1.5 ± 1.0
2	Centro	25.66 ± 2.02	-
	Corteza	2.83 ± 0.76	-

n= 3

El elevado contenido de grasa del centro del queso es debido a que durante su proceso de elaboración se añade crema a la leche previo al cuajado, lo cual incrementa significativamente el porcentaje de materia grasa con el objetivo de obtener como producto final una bola de queso doble crema. Por otro lado, el contenido de grasa de la corteza es mucho menor como resultado de su elaboración. Esta parte del queso es elaborada con leche descremada, la leche se descrema con el propósito de utilizarla para la elaboración del centro. Lo anterior explica por qué el centro del queso es mucho más suave que la corteza, que es muy dura. En la estructura del queso, la grasa se encuentra distribuida como material de relleno en la matriz proteínica, por lo tanto si se incrementa su contenido en la formulación, el queso presentará menor firmeza y mayor elasticidad, mientras que cuando su contenido se reduce (ya sea por acción lipolítica o intencional para fines de obtener un producto con bajo contenido en grasa) se obtendrán quesos más duros y rígidos (Brighenti et al., 2008).

Determinación de proteína.

Tabla 8. Contenido proteínico de quesos bola.

Lote	Muestra	Proteína (%)	Proteína (%) (López et al., 2015)
1	Centro	22.40 ± 1.93	22 ± 3.6
	Corteza	34.08 ± 1.40	45.3 ± 3.9
2	Centro	25.59 ± 0.67	-
	Corteza	32.74 ± 0.55	-

n= 3

Marilley y Casei (2004) establecen que el contenido de proteína en quesos madurados además de depender directamente de la composición de la leche de su elaboración, está relacionado con el tiempo de maduración. Durante la maduración del queso ocurren diferentes reacciones químicas y bioquímicas que involucran a las proteínas (proteólisis). A pesar de que el queso es un concentrado de proteínas, durante esta etapa la composición de péptidos disminuirá debido a la transformación de estos en aminoácidos y después en productos finales como ácidos orgánicos, alcoholes y aldehídos que contribuirán a las características sensoriales finales del queso. También, hay un mayor contenido de proteína en la corteza debido a la pérdida de humedad en esta durante la maduración.

Durante los 21 días de maduración, el queso bola adopta las características organolépticas tan únicas que posee.

Contenido de carbohidratos.

Tabla 9. Porcentaje de carbohidratos en quesos bola.

Lote	Muestra	Carbohidratos (%)
1	Centro	3.09
	Corteza	25.26
2	Centro	3.12
	Corteza	19.83

La cantidad de carbohidratos de la corteza se sobreestimó debido a una digestión incompleta durante la determinación de Kjeldahl. La corteza está hecha de caseína y contiene una baja cantidad de grasa, como resultado se obtiene un material muy rígido que no se alcanzó a digerir por completo con H₂SO₄. Se recomienda que para la determinación de proteínas de la corteza, el tratamiento de la muestra sea el necesario para pulverizarla por completo.

El carbohidrato más importante presente en la leche es la lactosa. Constituye la mitad de los sólidos no grasos y cerca de un 4.8 % total de la leche. La lactosa tiene un importante papel durante la maduración de los quesos debido a la fermentación de este compuesto por bacterias ácido lácticas (Revilla 1985).

Los carbohidratos presentes en la leche se ven afectados durante su transformación en queso debido a la acción de los microorganismos presentes en el proceso de elaboración y maduración. Dichos microorganismos transforman a la lactosa en ácido láctico durante la elaboración y maduración del producto. Debido al bajo contenido de lactosa encontrado en los quesos, ocasionado por lo descrito anteriormente, se convierten en un producto adecuado para ser consumido por personas con deficiencia en lactasa (Amiot, 1991). La mayor parte de la lactosa se pierde durante el desuerado y, el remanente prácticamente desaparece durante la fermentación láctica (Hernández 2007).

7.3 Caracterización fisicoquímica

Determinación de a_w

Tabla 10. Resultados de la a_w de quesos bola

Lote	Muestra	a_w	a_w (López et al., 2015)
1	Centro	$0.912 \pm 5.77E-04$	0.938 ± 0.03
	Corteza	$0.911 \pm 5.77E-04$	0.960 ± 0.02
2	Centro	$0.906 \pm 1.52E-03$	-
	Corteza	$0.909 \pm 3.00E-03$	-

n= 3

Marcos y Esteban (1990) establecen que la a_w de quesos disminuye por el salado y la maduración, como resultado de la concentración de sólidos y, además, por la producción de compuestos nitrogenados no proteínicos de bajo peso molecular y de solutos solubles derivados de los procesos de glicólisis, proteólisis y lipólisis. Debido a que el proceso de elaboración del queso bola es completamente artesanal, la adición de sal no está estandarizada, esta es una de las operaciones unitarias que afectan las variaciones de los resultados obtenidos, así como también el corte de la cuajada, maduración y prensado. La a_w obtenida en los quesos es apta para el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras.

Determinación de pH y acidez.

Tabla 11. Resultados de pH y acidez en Quesos Bola

Lote	Muestra	pH	pH (López et al., 2015)	Acidez (% ác. láctico)
1	Centro	5.08 ± 0.0351	4.5 ± 0.2	0.10 ± 0.0
	Corteza	$5.62 \pm 5.77E-03$	5.5 ± 0.1	$0.23 \pm 5.77E-03$
2	Centro	5.25 ± 0.0378	-	$0.11 \pm 5.77E-03$
	Corteza	5.74 ± 0.01	-	0.20 ± 0.0

n= 3

La corteza del queso al estar más expuesta al medio que el centro, sufre mayores cambios fisicoquímicos. De acuerdo a Baer, et al., (1996) estos cambios son generados principalmente por las diferentes rutas metabólicas como la proteólisis, dando como resultado la formación de grupos amino libres que al ser de naturaleza básica incrementan el pH de la corteza. El porcentaje de acidez en la corteza es mayor debido a su elaboración, ya que parte de leche descremada. Spreer (1991) menciona que en el proceso de descremado de la leche, la acidez se concentra en la leche descremada y no en la crema obtenida. Otro factor que afecta la acidez es el crecimiento microbiano, pues durante la maduración los microorganismos que se encuentran en el queso son capaces de fermentar la lactosa del medio generando ácido láctico.

7.4 Aislamiento de bacterias ácido lácticas en agar MRS (únicamente del centro de los quesos)

Con la finalidad de buscar BAL con potencial biotecnológico, se sembraron colonias en agar MRS para probar su efecto antagónico contra patógenos, actividad enzimática y su posible uso como probióticos. De las diferentes colonias aisladas en placa, se seleccionaron únicamente seis al azar. Estas seis colonias fueron con las que se trabajó para realizar todos los experimentos posteriores.

Se realizaron diversas resiembras para purificar las colonias. A las colonias aisladas se les realizó tinción de Gram y se observó su morfología al microscopio (Figura 14 y 15, Tabla 12). El aislamiento se realizó en el medio MRS debido a que en su composición cuenta con fuentes nutritivas para el crecimiento bacteriano como peptona y glucosa, cofactores como

monoleato de sorbitán y sales de sodio, y además, citrato de amonio que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas.

Tabla 12. Resultado de la tinción de Gram a las cepas aisladas del queso en agar MRS.

Cepa	Gram	Morfología
1	+	Bacilos cortos y delgados
2	+	Bacilos cortos y delgados
3	+	Bacilos cortos y delgados
4	+	Bacilos cortos y delgados
5	+	Bacilos medianos, ligeramente anchos
6	+	Bacilos medianos, ligeramente anchos



Figura 14. Tinción de Gram a bacilos Gram positivos de “cepa 1”.



Figura 15. Tinción de Gram a bacilos Gram positivos de “cepa 5”.

Se logró observar dos tipos de morfologías diferentes, por lo cual se sospechó que se contaba con dos microorganismos diferentes.

7.5 Extracción de ADN, secuenciación e identificación de las cepas aisladas

Para la identificación de las seis cepas aisladas al azar, se realizó una purificación y extracción de ADN de cada cepa mediante métodos de biología molecular.

Tabla 13. Identificación de las cepas aisladas. Comparación con base de datos NCBI

Cepa	Secuencia nucleótidos	Microorganismo identificado	Cobertura (%)	Expectancia	Identidad (%)	NCBI secuencia de referencia
1	700	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	0.0	99	NR_115605.1
2	1000	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99	NR_115605.1
3	1100	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	0.0	99	NR_115605.1
4	1000	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	0.0	93	NR_104573.1
5	750	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100%	0.0	99	NR_041054.1
6	900	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99%	0.0	93	NR_041054.1

Como se observa en la Tabla 13, los microorganismos aislados del queso, se identificaron como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*. Las cepas 1, 2, 3 y 6 fueron las que obtuvieron los resultados más certeros ya que el porcentaje de identidad, que indica la semejanza que existe entre la secuencia del nuestro microorganismo aislado con la secuencia de referencia usada por la base de datos comerciales NCBI, es prácticamente del 100 %. El valor de expectancia en todas las secuencias es de 0.0, esto es lo deseado ya que este valor representa la probabilidad de que el resultado de alineamiento sea al azar, por lo cual la identificación es más certera. La cobertura nos indica la cantidad de nucleótidos comparados en toda la secuencia.

Se identificaron las seis cepas como microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*. En estudios previos se ha demostrado que algunas cepas de este grupo de bacterias tienen la capacidad de ser utilizadas como bioconservadores en alimentos.

7.6 Cinéticas de crecimiento de las BAL aisladas y monitoreo del pH

En algunas investigaciones se ha demostrado que la mayor producción de compuestos con actividad inhibitoria bacteriana producidos por algunos géneros de bacterias ácido lácticas se lleva a cabo durante la fase logarítmica y la fase estacionaria temprana (Delgado, 2013; García *et al.*, 2014). Estableciendo que la producción del compuesto antibacteriano está

relacionado con el desarrollo celular. Debido a este antecedente se realizó una cinética de crecimiento para cada cepa aislada de las BAL identificadas.

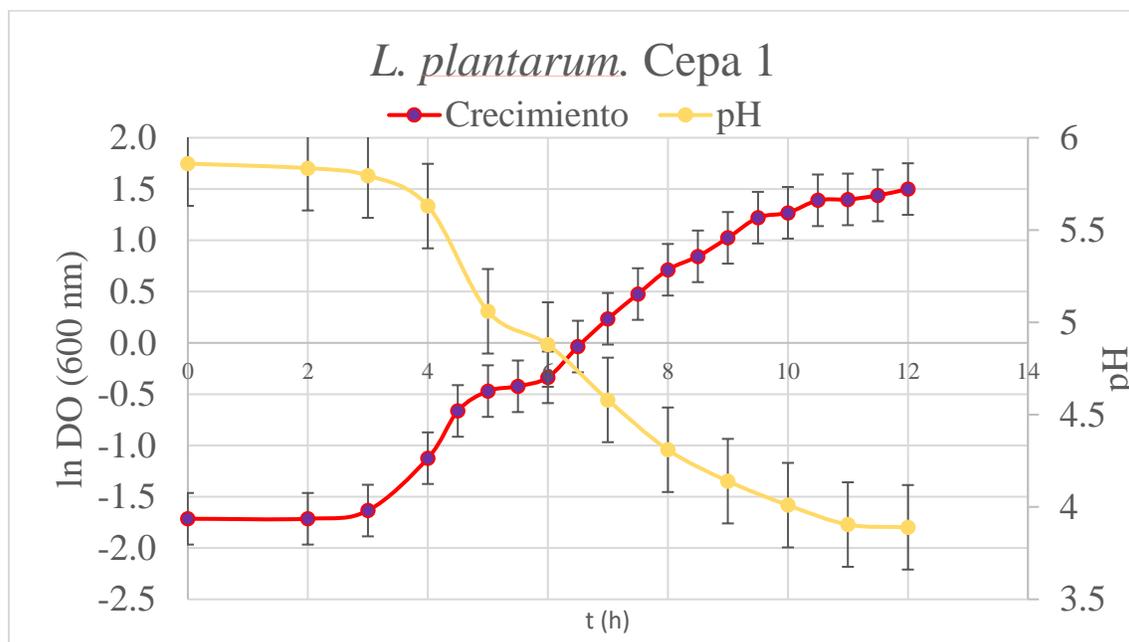


Figura 16. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, cepa 1 aislada del centro del queso bola de Ocosingo. Se muestra el promedio de dos réplicas leídas a 600nm.

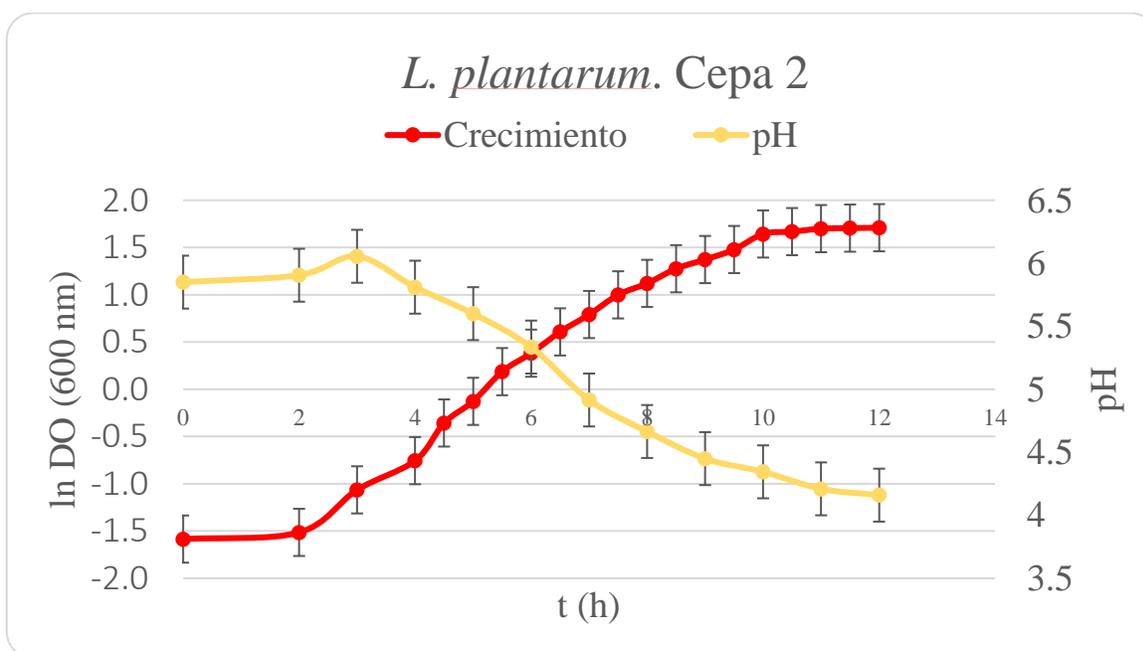


Figura 17. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, cepa 2 aislada del centro del queso bola de Ocosingo. Se muestra el promedio de dos réplicas leídas a 600nm.

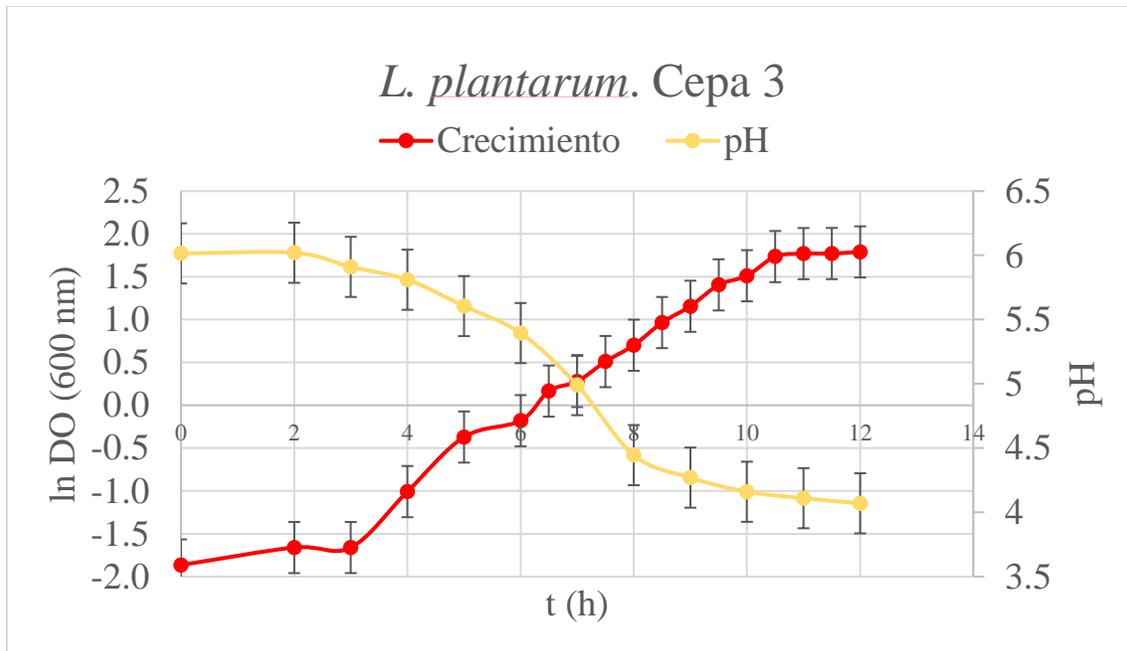


Figura 18. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, cepa 3 aislada del centro del queso bola de Ocosingo. Se muestra el promedio de dos réplicas leídas a 600nm.

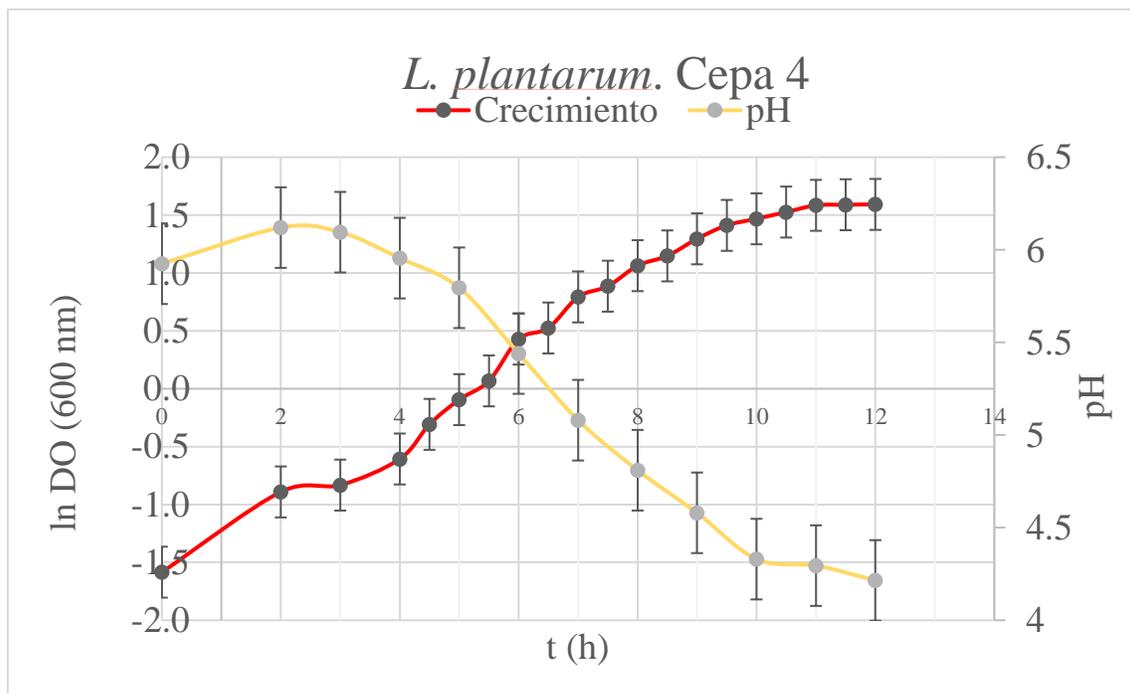


Figura 19. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, cepa 4 aislada del centro del queso bola de Ocosingo. Se muestra el promedio de dos réplicas leídas a 600nm.

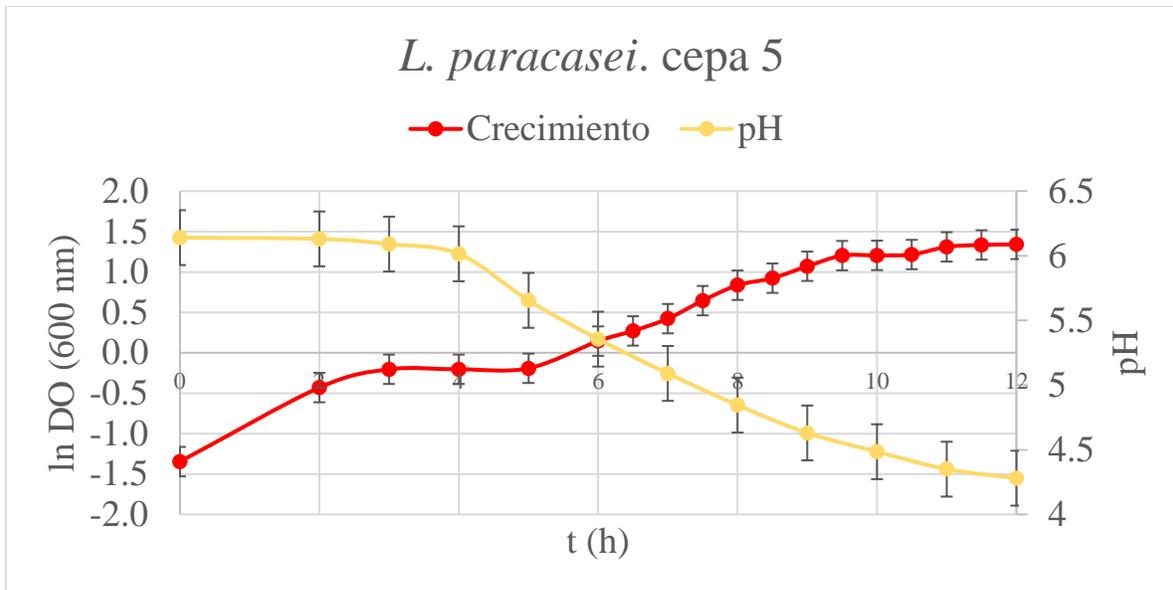


Figura 20. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus paracasei*, cepa 5 aislada del centro del queso bola de Ocosingo. Se muestra el promedio de dos réplicas leídas a 600nm.

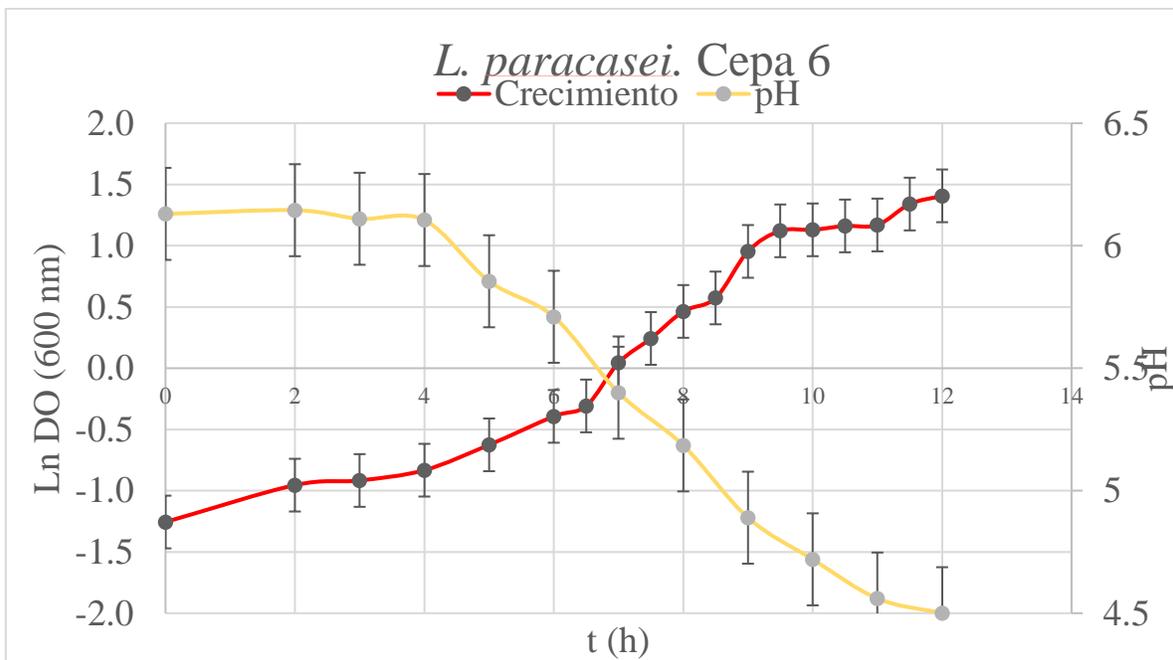


Figura 21. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus paracasei*, cepa 6 aislada del centro del queso bola de Ocosingo. Se muestra el promedio de dos réplicas leídas a 600nm.

Las cinéticas realizadas de cada microorganismo se pueden observar en las Figuras 16 a 21. De estas cinéticas podemos destacar que se encontraron resultados muy parecidos entre sí. Se observa que las seis cepas tardan en llegar a la fase logarítmica tardía entre 10 y 10.5 h y

del mismo modo, estas cepas alcanzan la fase estacionaria temprana en un lapso de 11, 11.5 y 12 h. Por lo cual, para realizar experimento donde se busque actividad inhibitoria contra bacterias producida por bacteriocinas y PGHs será necesario fermentar cada cepa dentro de estos periodos.

También se monitoreó el pH de cada cepa y se encontró que durante 12 h de incubación el pH sufre una disminución considerable y el comportamiento nuevamente es similar entre las seis cepas. El decremento de pH observado va de un pH inicial de alrededor de 6 a 6.2 y después de 12 h de fermentación decae hasta valores de pH de 3.7 a 4.3. Esta disminución de pH es derivada de la fermentación de la glucosa a cargo de las BAL, la cual deriva en metabolitos como el ácido láctico, dependiendo de la naturaleza del metabolismo de cada bacteria.

7.7 Acidez titulable de las cepas.

Las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico como producto de la fermentación único o mayoritario a partir de la fermentación de azúcares. Existen dos vías fermentativas. Una es la homofermentativa (Figura 22), que produce un solo producto de fermentación, el ácido láctico. La otra, llamada heterofermentativa (Figura 23), genera otros productos además del lactato, principalmente etanol y CO₂ (Mandigan et al., 2015). Para el caso de los productos lácteos madurados, las bacterias ácido lácticas que siguen la vía heterofermentadoras podrían ser más importantes desde el punto de vista sensorial, esto es debido a que dentro de los metabolitos secundarios generados durante la fermentación se encuentra el diacetilo y el acetaldehído que intensifican sabores y olores durante la maduración de los quesos (García et al., 1998; Jay, 2000).

Tabla 14. Ácido láctico (%) producido por bacterias ácido lácticas aisladas

Cepa	Muestra	Acidez (% ácido láctico)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	$0.81 \pm 9.16 \times 10^{-3}$
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	$0.95 \pm 3.46 \times 10^{-3}$
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	$0.94 \pm 6 \times 10^{-3}$
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	$0.91 \pm 3.46 \times 10^{-3}$
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	0.86 ± 0.03
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	0.81 ± 0.02

n = 3

Las diferencias observadas en las Figuras 22 y 23 se pueden reducir a la presencia o ausencia de aldolasa. Las bacterias ácido lácticas homofermentadoras poseen aldolasa y producen dos moléculas de lactato a partir de glucosa mediante la ruta glicolítica. Las bacterias heterofermentadoras carecen de aldolasa, de manera que no pueden romper el difosfato de fructosa en fosfatos de triosa. En cambio, oxidan la glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan a fosfato de pentosa. Este último compuesto es convertido a fosfato de triosa y fosfato de acetilo por la enzima fosfoacetolasa. El fosfato de triosa es convertido en ácido láctico con producción de ATP (Mandigan et al., 2015).

De acuerdo a Ramírez y Vélez (2016) *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* son bacterias heterofermentadoras facultativas, es decir tienen la capacidad de seguir la vía heterofermentadora y la vía homofermentadora, que en realidad es la que siguen la mayor parte del tiempo. Como resultado se podría pensar que la acidez producida durante la fermentación de las seis cepas es causada únicamente por la producción de ácido láctico. En adición, durante ninguna de estas fermentaciones se observó formación de burbujas como resultado de la producción de dióxido de carbono.

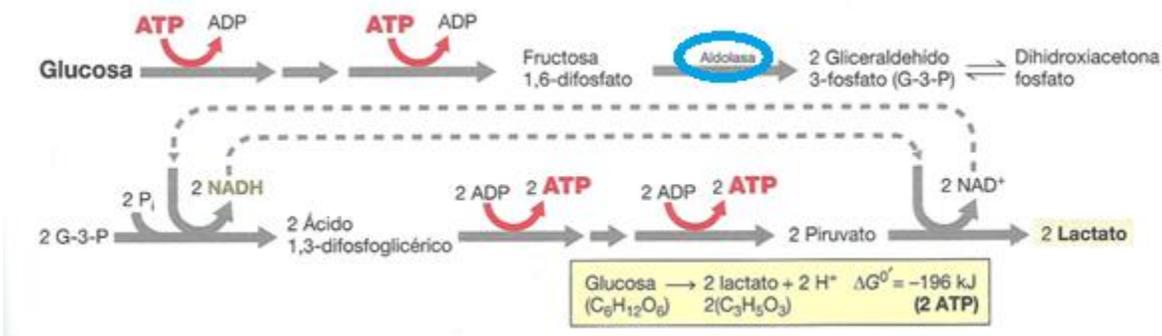


Figura 22. Ruta de las bacterias homofermentadoras para la fermentación de la glucosa (Mandigan et al., 2015).

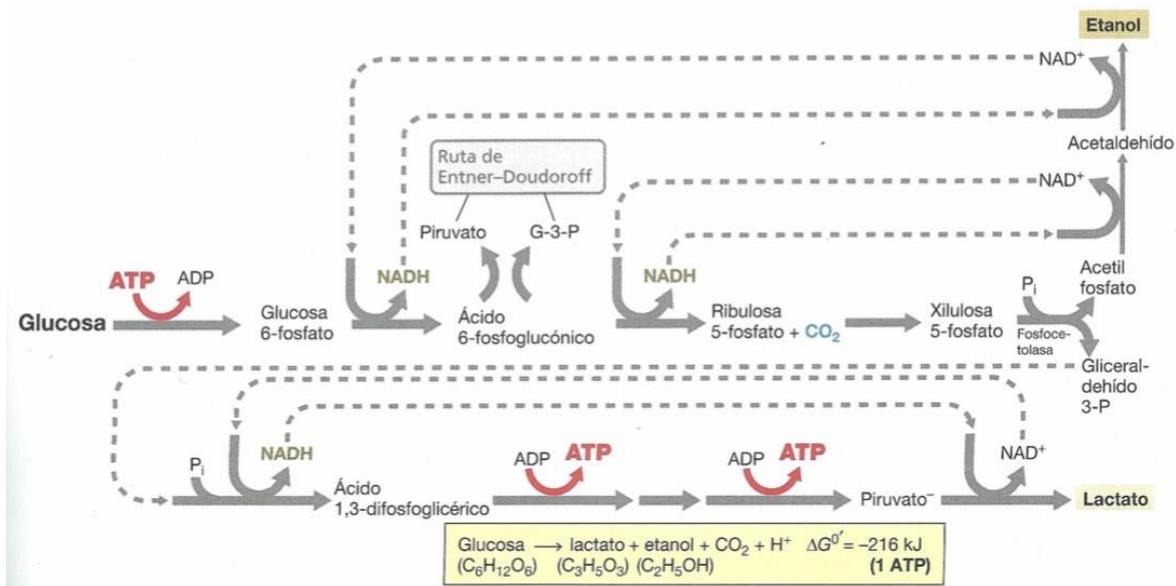


Figura 23. Ruta de las bacterias heterofermentadoras para la fermentación de la glucosa (Mandigan et al., 2015).

Los resultados obtenidos muestran que *Lactobacillus plantarum* produce una mayor cantidad de ácido láctico que *Lactobacillus paracasei* al llegar a la fase estacionaria temprana. Las cepas de trabajo se podrían considerar altamente acidificantes ya que se compararon con el estudio de Venegas (2018), en el cual se trabaja con cepas del género *Enterococcus* que son cepas con débil capacidad acidificante. En dicho estudio la producción de ácido láctico fue de 0.30 a 0.33 % al llegar a la fase estacionaria temprana, resultados muy inferiores a los obtenidos por *L. plantarum* y *L. paracasei*. Con estos resultados podemos resaltar que las

seis cepas estudiadas tendrían potencial como bioconservador en alimentos al inhibir microorganismos debido a la disminución del pH generada por la producción de lactato. Sin embargo, es importante considerar que un bioconservador no será bien aprovechado si no se siguen las buenas prácticas de higiene durante la producción de alimentos.

7.8 Pruebas de inhibición contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* en difusión en agar.

Se realizaron diferentes métodos de concentración de proteínas para evaluar si las bacterias analizadas ejercían algún efecto inhibitorio contra microorganismos patógenos. Todos los métodos se probaron mediante la técnica de difusión en agar que se basa en la generación de halos de inhibición y los extractos crudos utilizados fueron obtenidos de la fase logarítmica tardía y estacionaria temprana.

Para estas pruebas los extractos crudos de caldo MRS fueron centrifugados, los botones celulares fueron desechados y se utilizó el sobrenadante que posteriormente se neutralizó a $\text{pH} = 7$ con NaOH 50 % (m/v) con el fin de descartar que el efecto inhibitorio sea debido a la producción de ácidos orgánicos, H_2O_2 , diacetilo, etc. Como control positivo se utilizó Nisaplin (10 mg/mL) debido a que es el nombre comercial de la nisina, la cual es producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Es una bacteriocina que se utiliza comúnmente como conservador en alimentos y es la única bacteriocina reconocida como segura por la OMS (Chacón et al., 2016). Esta bacteriocina presenta actividad bactericida contra importantes patógenos Gram positivos y además tiene actividad bacteriostática contra esporas microbianas. (Oshima et al., 2014).

- Concentración de proteínas por liofilización



Figura 24. Inhibición vs *L. monocytogenes*

1: *L. plantarum* (-)

2: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

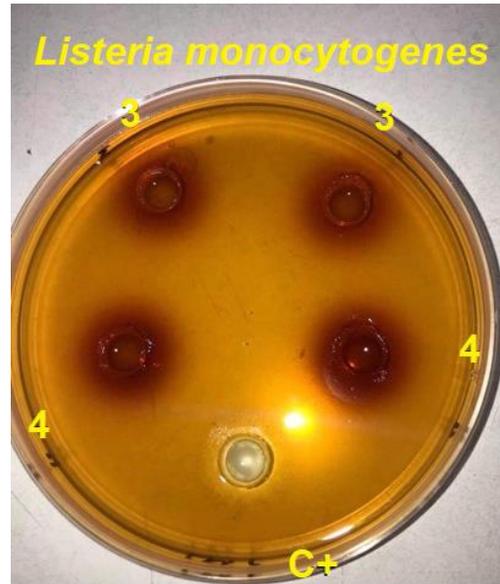


Figura 25. Inhibición vs *L. monocytogenes*

3: *L. plantarum* (-)

4: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

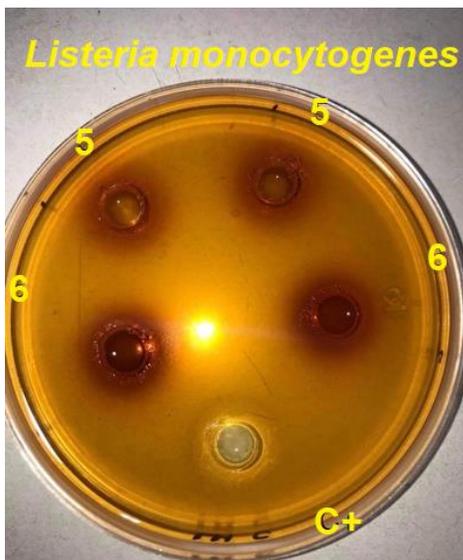


Figura 26. Inhibición vs *L. monocytogenes*

5: *L. paracasei* (-)

6: *L. paracasei* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

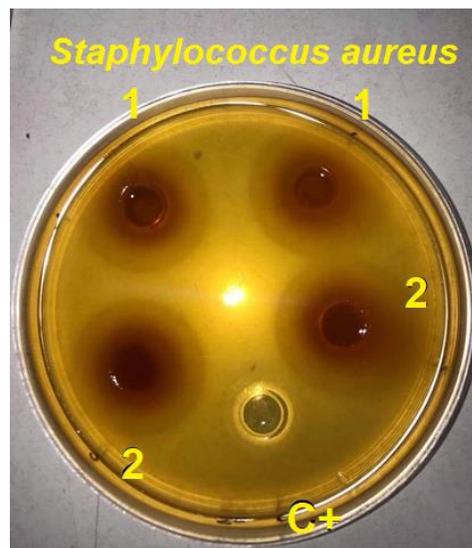


Figura 27. Inhibición vs *S. aureus*

1: *L. plantarum* (-)

2: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)



Figura 28. Inhibición vs *S. aureus*
 3: *L. plantarum* (-)
 4: *L. plantarum* (-)
 C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

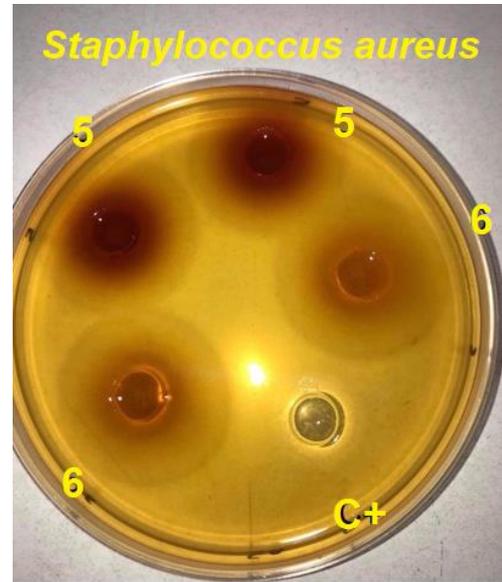


Figura 29. Inhibición vs *S. aureus*
 5: *L. paracasei* (-)
 6: *L. paracasei* (-)
 C+: Nisaplin 10mg/mL (+)



Figura 30. Inhibición vs *S. aureus*
 N: Nisaplin 10mg/mL (+)
 A: Ampicilina 10mg/mL (+)



Figura 31. Inhibición vs *L. monocytogenes*
 N: Nisaplin 10mg/mL (+)
 A: Ampicilina 10mg/mL (+)

En las pruebas de difusión en agar mostradas en las Figuras 24 a 29, no se encontró que las cepas probadas tuvieran actividad antibacteriana de origen proteínico contra bacterias patógenas de interés en alimentos como *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Se realizó, por separado, una difusión en agar BHI (Figuras 30 y 31) utilizando únicamente el control positivo Nisaplin y añadiendo Ampicilina para demostrar la actividad de estos compuestos contra patógenos de interés.

Con los resultados obtenidos, se continuó buscando inhibición bacteriana por bacteriocinas y/o PGHs a partir de difusión en agar con otros métodos de concentración debido a que la producción de estos compuestos se lleva a cabo en concentraciones muy bajas.

- Precipitación de proteínas con sulfato de amonio 60 % (m/v).

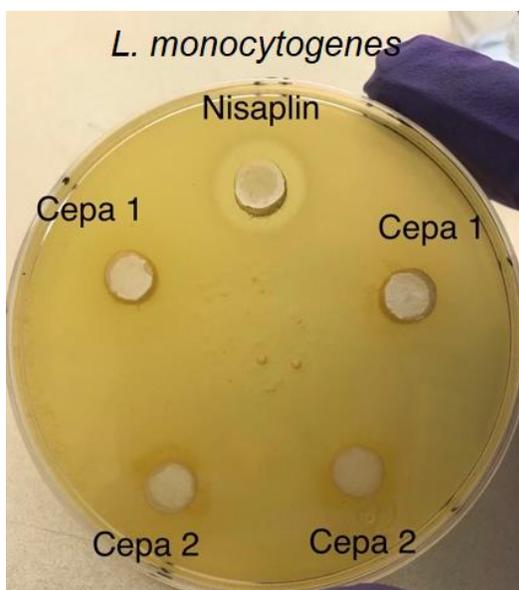


Figura 32. Inhibición vs *L. monocytogenes*

1: *L. plantarum* (-)

2: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

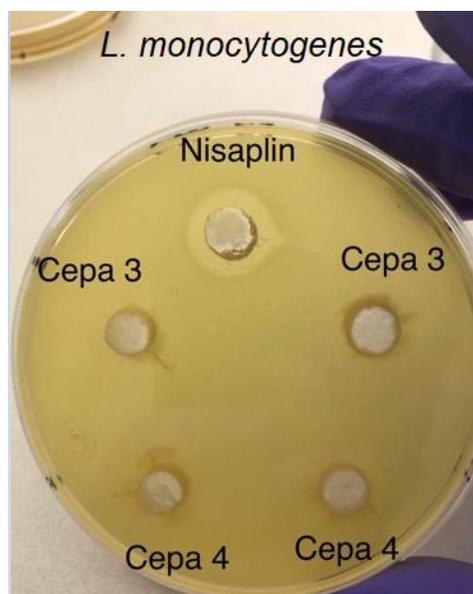


Figura 33. Inhibición vs *L. monocytogenes*

3: *L. plantarum* (-)

4: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

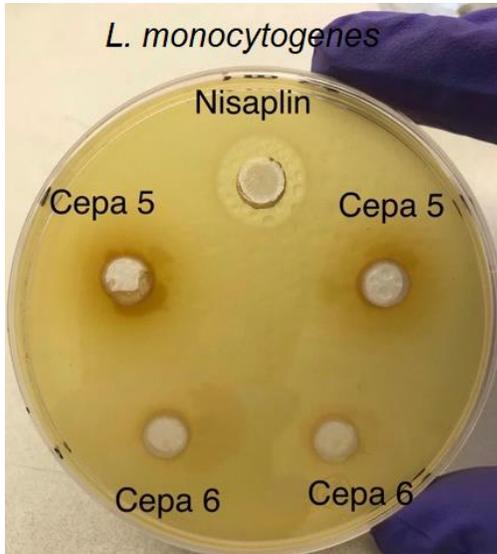


Figura 34. Inhibición vs *L. monocytogenes*

5: *L. paracasei* (-)

6: *L. paracasei* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

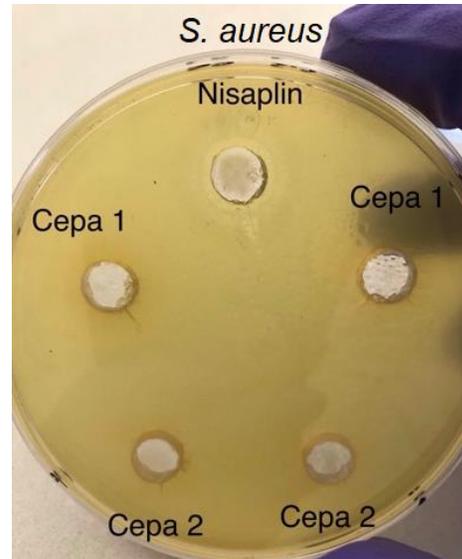


Figura 35. Inhibición vs *S. aureus*

1: *L. plantarum* (-)

2: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

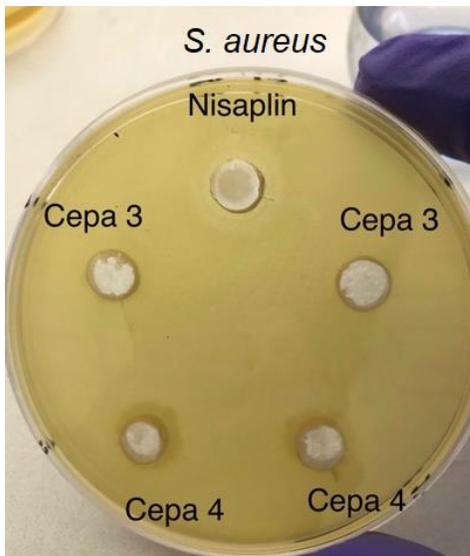


Figura 36. Inhibición vs *S. aureus*

3: *L. plantarum* (-)

4: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

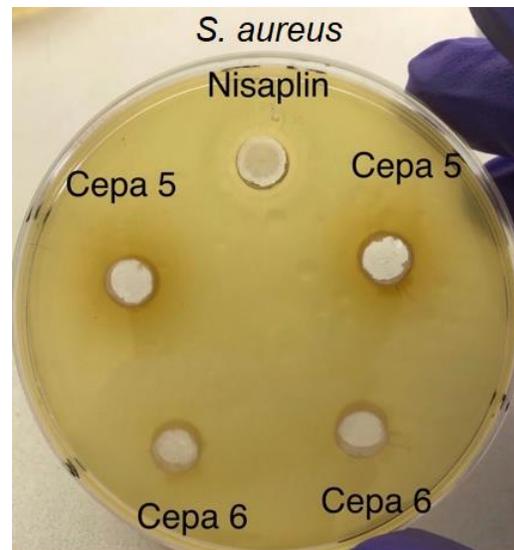


Figura 37. Inhibición vs *S. aureus*

5: *L. paracasei* (-)

6: *L. paracasei* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

- Precipitación de proteínas con sulfato de amonio 80 % (m/v).

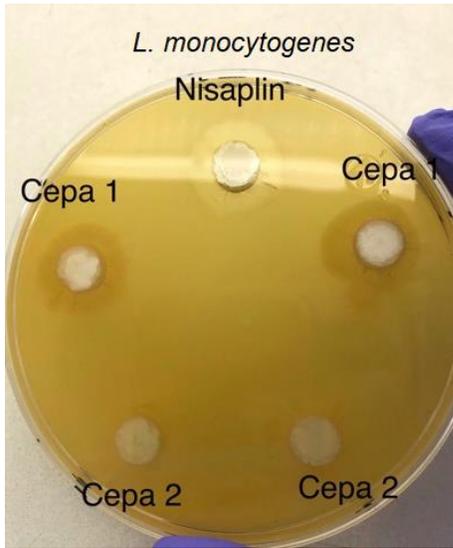


Figura 38. Inhibición vs *L. monocytogenes*

1: *L. plantarum* (-)

2: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

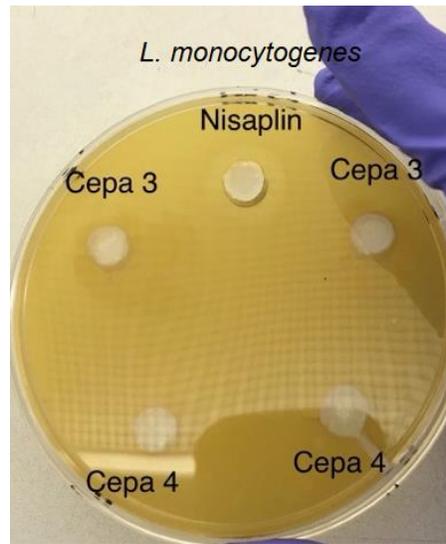


Figura 39. Inhibición vs *L. monocytogenes*

3: *L. plantarum* (-)

4: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

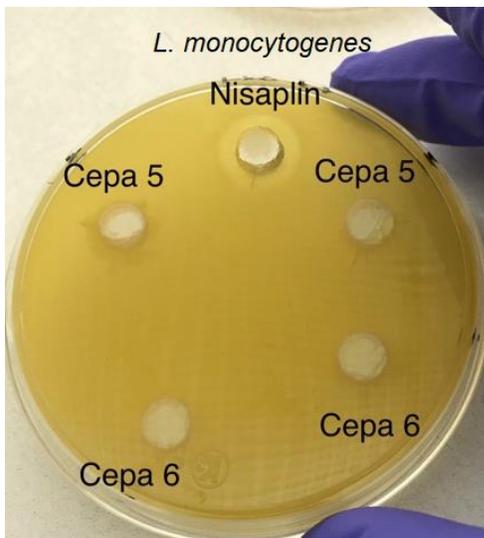


Figura 40. Inhibición vs *L. monocytogenes*

5: *L. paracasei* (-)

6: *L. paracasei* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

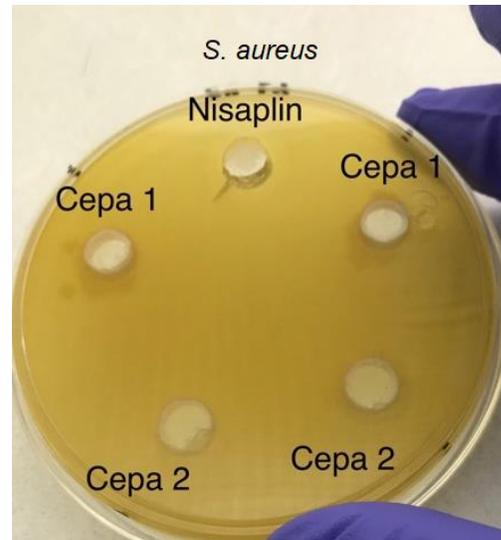


Figura 41. Inhibición vs *S. aureus*

1: *L. plantarum* (-)

2: *L. plantarum* (-)

C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

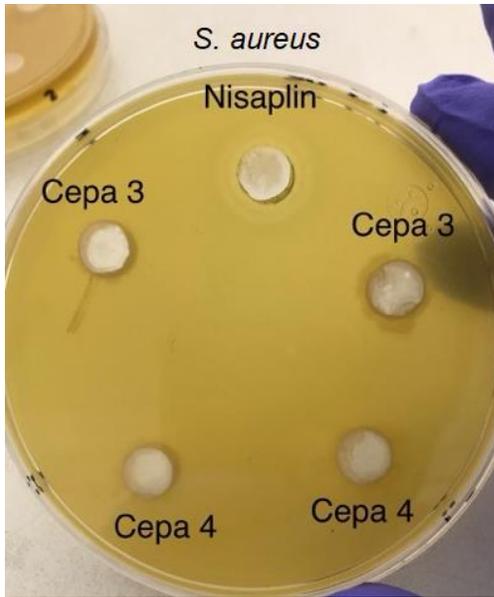


Figura 42. Inhibición vs *S. aureus*
 3: *L. plantarum* (-)
 4: *L. plantarum* (-)
 C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

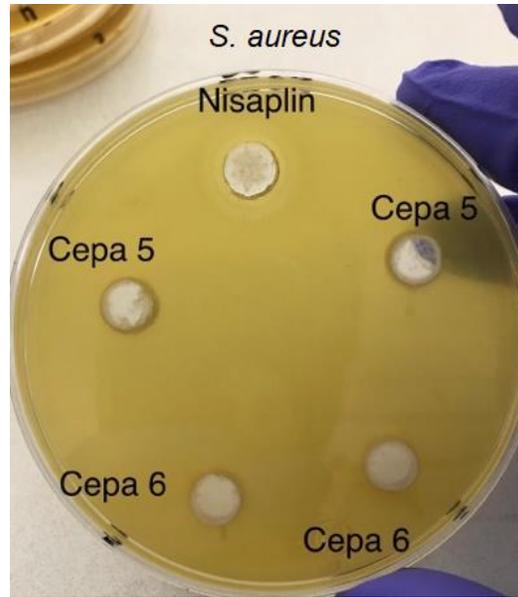


Figura 43. Inhibición vs *S. aureus*
 5: *L. paracasei* (-)
 6: *L. paracasei* (-)
 C+: Nisaplin 10mg/mL (+)

Como se muestra en las Figuras 32 a 37 la precipitación de proteínas con sulfato de amonio 60 % (m/v) de las cepas aisladas no muestra inhibición en las pruebas de difusión en agar. Como consecuencia, la metodología se repitió precipitando las proteínas con una mayor concentración de sulfato de amonio debido a que el grupo de trabajo del laboratorio 312 ha observado mejores resultados al concentrar el sulfato de amonio al 80 % (m/v). Al repetir la metodología variando la concentración, se obtuvieron los mismos resultados.

Aunque hay investigaciones que señalan que la inhibición de *L. plantarum* es debida principalmente a la producción de ácidos orgánicos; Alvarado et al., (2009) menciona que existen cepas que son capaces de presentar inhibición importante en *L. monocytogenes* debido a la producción de moléculas de naturaleza proteínica estables al calor, que pierden actividad al ser tratadas con tripsina. Se conoce que la estabilidad al calor y la sensibilidad a tripsina son características de muchas bacteriocinas de bacterias Gram positivas.

Sin embargo, las cepas de bacterias ácido lácticas con las que se trabajaron los experimentos y que fueron aisladas del centro del queso bola de Ocosingo (*L. plantarum* y *L. paracasei*) no tendrían inhibición contra bacterias patógenas por producción de compuestos de origen proteínico como bacteriocinas y PGHs. Con los experimentos que se realizaron, el único factor de inhibición que muestran es la producción de ácido láctico.

Estos resultados no quieren decir que la microbiota presente en el queso bola de Ocosingo no es capaz de producir compuestos que presenten inhibición contra microorganismos patógenos. Ya que es importante tener en cuenta que únicamente se trabajó con seis cepas seleccionadas al azar de toda la gran diversidad de microorganismos que existen en el queso. Dentro de estos microorganismos no sólo se encuentran BAL, existen otro tipo de bacterias e incluso levaduras que provocan cambios físicos y químicos en el queso bola. También es importante mencionar que estas cepas sólo fueron aisladas del centro del queso, pero también la doble corteza protectora posee microorganismos en ella.

7.9 Evaluación de la actividad enzimática de las BAL

Se realizó la evaluación de la actividad proteolítica, esterolítica y lipolítica. Estas actividades son de suma importancia en la industria de los quesos debido a que provocan reacciones que confieren características únicas como sabor, olor, textura, etc.

En la Tabla 15 se observan los resultados obtenidos de cada actividad enzimática.

Tabla 15. Actividad enzimática presentada por *L. plantarum* y *L. paracasei*.

Muestra	Actividad proteolítica	Actividad esterolítica	Actividad lipolítica
<i>K. rhizophila</i>	xxxxx	xxxx	0
<i>L. plantarum</i> Cepa 1	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Cepa 2	x	0	0
<i>L. plantarum</i> Cepa 3	x	0	0
<i>L. paracasei</i> Cepa 4	xxx	0	0
<i>L. paracasei</i> Cepa 5	x	0	0
<i>L. paracasei</i> Cepa 6	x	0	0

- Actividad proteolítica

Para la evaluación de la actividad proteolítica se eligió el medio agar leche descremada (LD) debido a que contiene como sustrato caseína. Se utilizó una escala de 0 a 5, donde se tomó al control positivo *Kocuria rhizophila* como la mayor actividad presentada señalándose como (xxxxx). El 0 indica la ausencia de proteólisis.

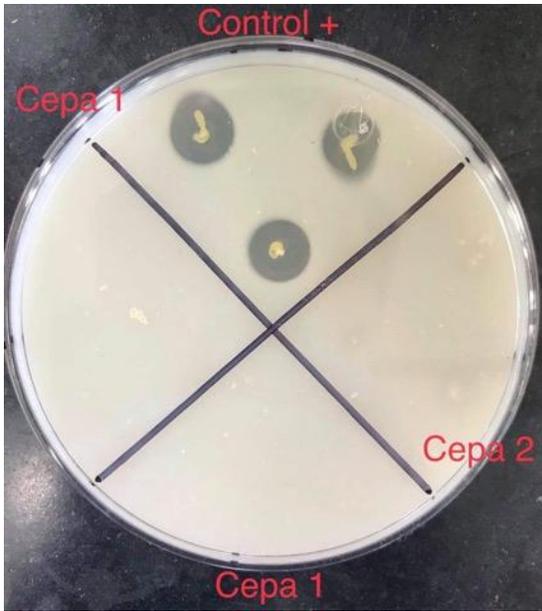


Figura 44. Agar LD 96 h de incubación.

1: *L. plantarum*

2: *L. plantarum*

Control +: *Kocuria rhizophila*

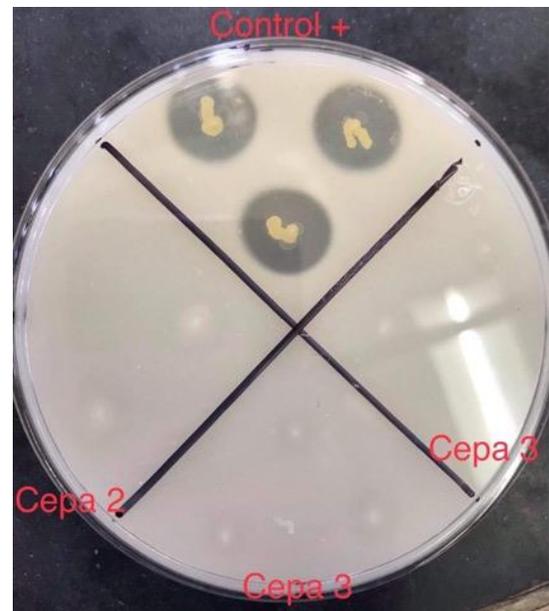


Figura 45. Agar LD 96 h de incubación.

2: *L. plantarum*

3: *L. plantarum*

Control +: *Kocuria rhizophila*

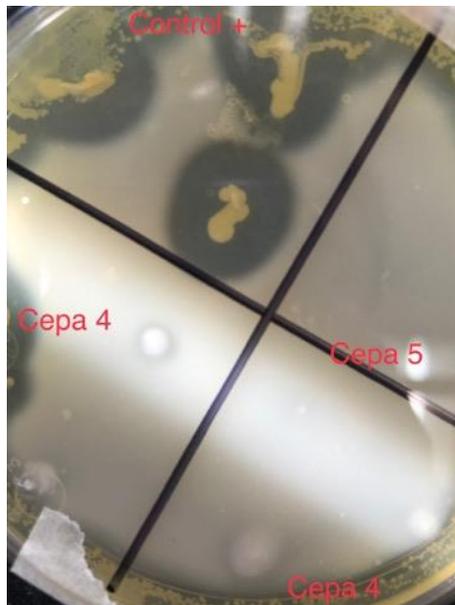


Figura 46. Agar LD 96 h de incubación.

4: *L. plantarum*

5: *L. paracasei*

Control +: *Kocuria rhizophila*

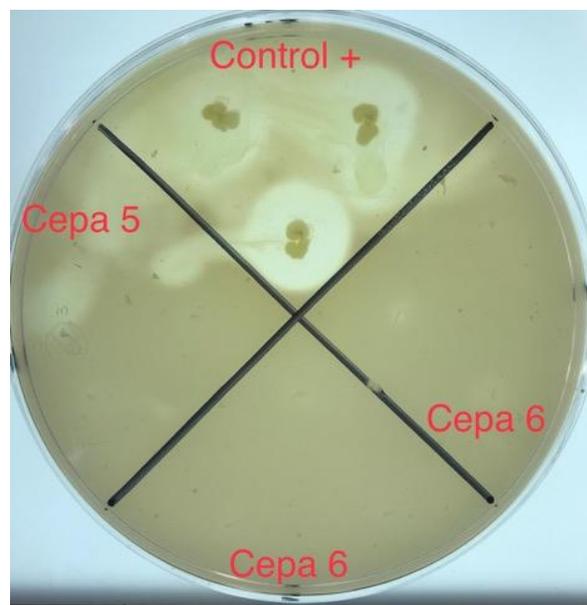


Figura 47. Agar LD 96 h de incubación.

2: *L. paracasei*

3: *L. paracasei*

Control +: *Kocuria rhizophila*

- Actividad esterolítica

Se utilizó el medio de cultivo agar tributirina (AT) que utiliza como sustrato a la tributirina y actúa como sustrato de carboxilesterasas, al ser un ácido graso de cadena corta. Se utilizó la misma escala para este experimento y el control positivo fue *Kocuria rhizophila*. Un resultado positivo se observa por la formación de halos alrededor del crecimiento de la colonia como resultado de la hidrólisis.

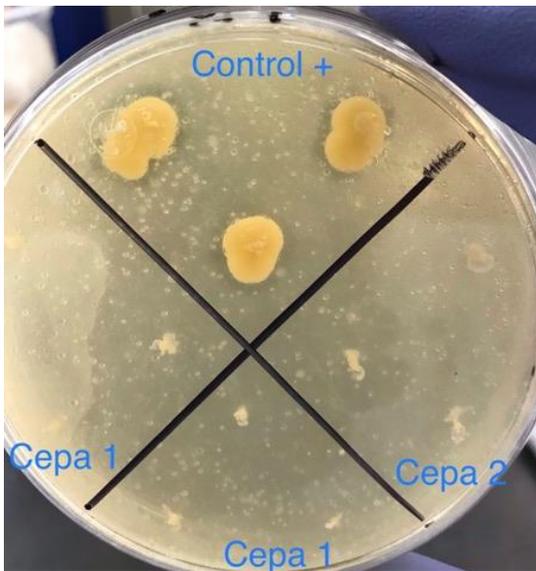


Figura 48. AT 96 h de incubación.

1: *L. plantarum*

2: *L. plantarum*

Control +: *Kocuria rhizophila*

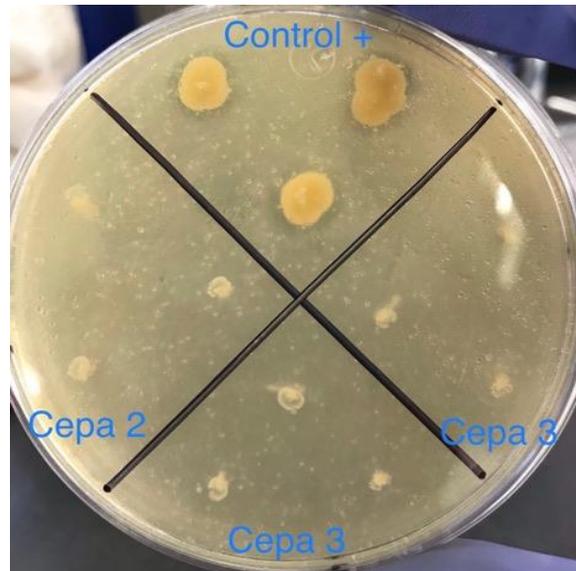


Figura 49. AT 96 h de incubación.

2: *L. plantarum*

3: *L. plantarum*

Control +: *Kocuria rhizophila*

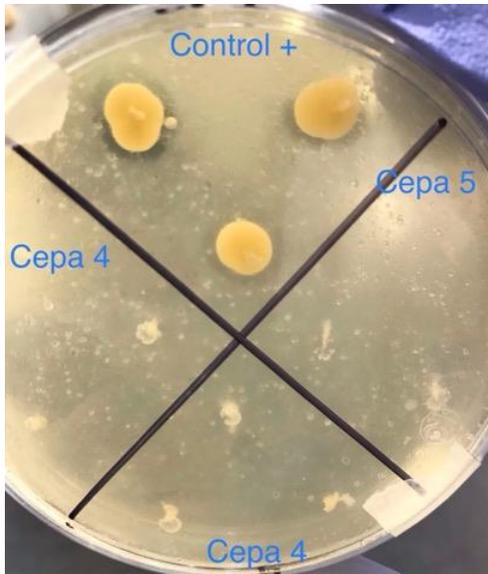


Figura 50. AT 96 h de incubación.

4: *L. plantarum*

5: *L. paracasei*

Control +: *Kocuria rhizophila*

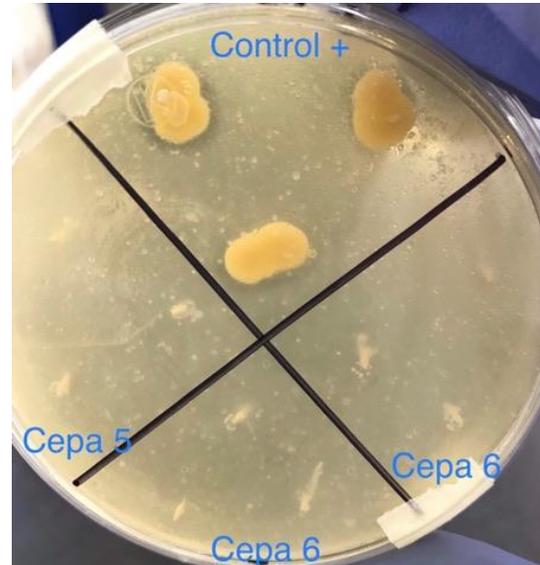


Figura 51. AT 96 h de incubación.

5: *L. paracasei*

6: *L. paracasei*

Control +: *Kocuria rhizophila*

- Actividad lipolítica

Se realizó en el medio agar aceite de oliva (AO) al cual se le adiciona aceite de oliva y que funciona como sustrato para lipasas, al contener ácidos grasos de cadena larga. Dentro de la composición del aceite de oliva está principalmente el ácido oléico (18:1), ácido linolénico (18:2) y ácido palmítico (16:0) (CODEX STAN 33-1981). Se utilizó la misma escala para este experimento y se utilizó como control negativo a *Kocuria rhizophila*. Un resultado positivo se observó por la formación de halos alrededor del crecimiento de la colonia como resultado de la hidrólisis.

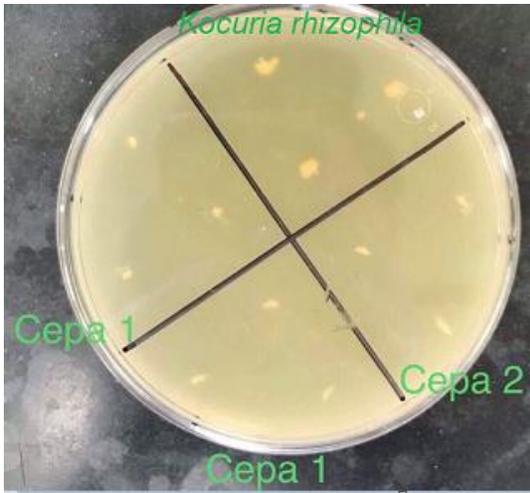


Figura 52. AT 96 h de incubación.

1: *L. plantarum*

2: *L. plantarum*

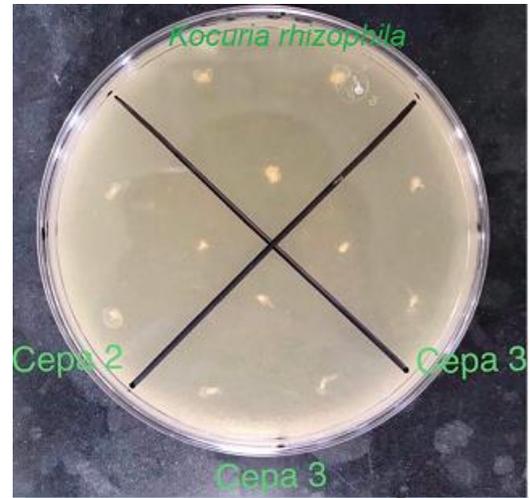


Figura 53. AT 96 h de incubación.

2: *L. plantarum*

3: *L. plantarum*

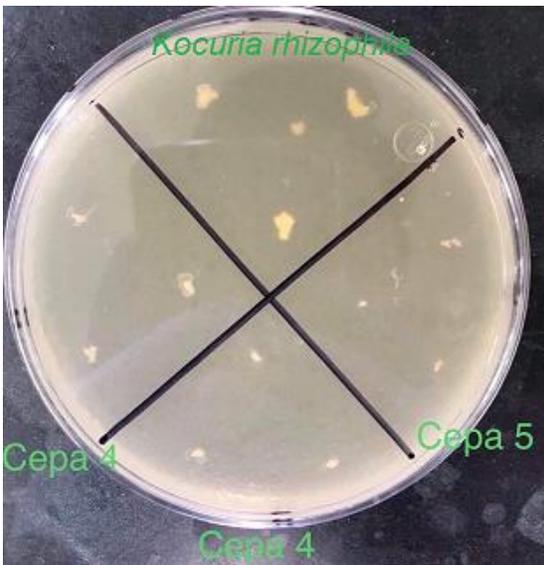


Figura 54. AT 96 h de incubación.

4: *L. plantarum*

5: *L. paracasei*

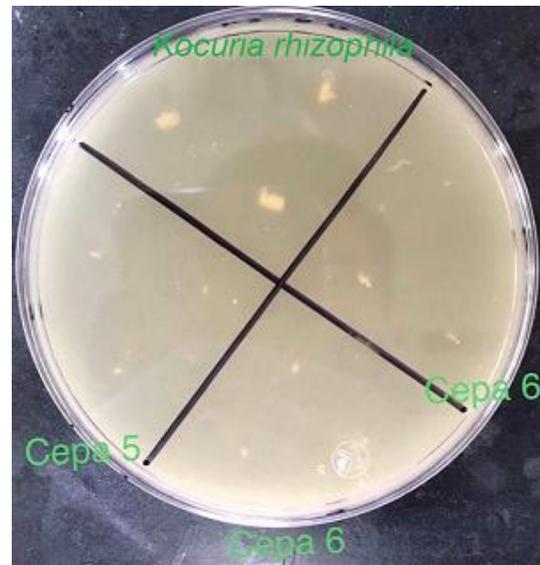


Figura 55. AT 96 h de incubación.

5: *L. paracasei*

6: *L. paracasei*

Las cepas 2, 3 y 4 de *L. plantarum* presentan actividad proteolítica, mientras que ninguna presenta actividad esterolítica ni lipolítica. Algunas cepas de *L. plantarum* como la NRRL B4004 cuentan con actividad proteolítica, ya que se ha observado que después de 125 h hidroliza la β -caseína, llegando a su hidrólisis completa después de 215 h (Khalid y Marth, 1990). También existe evidencia de algunas otras cepas que no tienen la capacidad de hidrolizar proteínas como la cepa 1 aislada y otras como *L. plantarum* WCFS1, reportada por Vermeulen et al., (2015).

La proteólisis es conocida como la principal reacción que se lleva a cabo durante la maduración de distintas variedades de quesos y que les provee características sensoriales únicas. En las Figuras 44, 45, 46 y 47 se observa que las bacterias que presentaron actividad proteolítica no muestran una hidrólisis intensa, lo cual era lo esperado debido a que la textura del queso no es tan suave como en otros quesos donde existe una alta actividad proteolítica. La suavidad del centro del queso bola es debida principalmente a la cantidad de grasa presente.

Ninguna cepa de *L. paracasei* mostró actividad esterolítica ni lipolítica. Únicamente la cepa 6 de *L. paracasei* mostró capacidad para hidrolizar proteínas, la intensidad de hidrólisis fue baja. Mukhtar y Haq-ul (2006) destacan que existen cepas que son capaces de producir proteasas. Esta característica de algunas cepas de *L. paracasei* les permite ser utilizadas en la industria láctea como cultivos iniciadores en la producción de quesos, o ser aplicados directamente sobre quesos ya elaborados.

Aunque ninguna de las 2 bacterias ácido lácticas del estudio demuestran actividad esterolítica o lipolítica y que en general se reconoce que las bacterias lácticas exhiben baja actividad lipolítica, existen trabajos que han evidenciado que algunas especies poseen enzimas lipasas y/o esterases, capaces de hidrolizar los triglicéridos y ácidos grasos presentes en la leche, contribuyendo de este modo a la generación de aromas y sabores (Leroy y De Vuyst, 2004; Kongo, 2013).

7.10 Evaluación de la resistencia al paso gastrointestinal de las BAL

Una de las pruebas más comunes que se realiza a las bacterias para saber si podrían utilizarse como probióticos, es la evaluación de la resistencia al paso gastrointestinal.

La evaluación consistió en tres etapas: la sobrevivencia en pH 3 (resistencia al paso por jugos gástricos), la sobrevivencia en pH 6 y sales biliares (resistencia al paso por jugos duodenales) y el estrés continuo (resistencia al paso por jugos gástricos y duodenales). El experimento de estrés continuo se realizó debido a que es lo que más se asemeja al paso que sufren los alimentos por el tracto gastrointestinal. Este tratamiento comienza a condiciones de pH 3, después de una hora de incubación a 37 °C, las condiciones son modificadas a pH 6 y la adición de pancreatina y sales biliares.

En la Tabla 16 se muestran los porcentajes de sobrevivencia obtenidos para *L. plantarum* y *L. paracasei*.

Tabla 16. Supervivencia (%) de las BAL a diferentes condiciones de estrés

Cepa	Estrés gástrico. Supervivencia (%)	Estrés duodenal. Supervivencia (%)	Estrés continuo. Supervivencia (%)
Cepa 1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	98.61	99.74	98.12
Cepa 2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	99.46	97.98	97.88
Cepa 3. <i>Lactobacillus plantarum</i>	96.27	98.51	97.24
Cepa 4. <i>Lactobacillus plantarum</i>	99.27	98.88	95.87
Cepa 5. <i>Lactobacillus paracasei</i>	92.04	94.74	89.12
Cepa 6. <i>Lactobacillus paracasei</i>	94.26	94.45	95.95

n = 2 (ver cuenta en placa en Anexo)

Los resultados demuestran que las cepas de *Lactobacillus plantarum* presentan un alto porcentaje de supervivencia a las diferentes condiciones de estrés. Esta resistencia a los cambios de pH, característica del grupo de las bacterias ácido lácticas, le daría la capacidad de usarse en alimentos debido al potencial probiótico que muestra. Los resultados concuerdan con el trabajo de Jurado et al., (2014) para *L. plantarum* donde se destaca su capacidad para desarrollarse a pesar de las variaciones de pH a las que se le puede someter, su resistencia al paso gastrointestinal y la inhibición del crecimiento de *Yersinia pseudotuberculosis*. Ramírez

et al., (2011) también hace referencia a *L. plantarum* como uno de los microorganismos que se usa en alimentos con efecto benéfico a la salud, debido a su características probióticas.

Mandigan et al., (2015) menciona que este tipo de bacterias son capaces de crecer satisfactoriamente en valores de pH tan bajos como 4. Son capaces de crecer incluso en valores más bajos como el pH de los jugos gástricos que llegan a alcanzar un pH de 3. Incluso resisten cambios bruscos de pH de 3 a 6, que es el cambio de pH que sufrirían por el paso de los jugos gástricos a los jugos duodenales.

Para las cepas de *Lactobacillus paracasei*, aunque muestran valores menores de sobrevivencia que los de *L. plantarum*, su crecimiento bacteriano sigue sin verse afectado significativamente por los niveles de pH. Esto indica que son capaces de sobrevivir a la acidez producida en el estómago, que es uno de los obstáculos que enfrentan los probióticos durante su paso por el tracto gastrointestinal. Debido a los resultados obtenidos durante esta prueba, las cepas aisladas podrían tener potencial probiótico ya que se reconoce a *L. paracasei* como probiótico. Incluso Desmond et al., (2004) señalan el uso dentro de la industria de alimentos de la cepa *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. Adicionalmente, Verdenelli et al., (2009) destacan las buenas características probióticas de la cepa *L. paracasei* IMC 502 como la buena resistencia a valores bajos de pH durante 5 h y la tolerancia a sales biliares. También, esta cepa ha demostrado ser capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos a la salud humana, sobre todo a *Candida albicans* que es capaz de producir importantes infecciones.

8. Conclusiones

- La composición proximal y fisicoquímica del queso bola de Ocosingo puede llegar a presentar variaciones entre lotes y productores debido a la falta de estandarización del proceso de elaboración.
- La pérdida de humedad en la corteza se hace evidente en su composición proximal y fisicoquímica, ya que sus componentes se encuentran más concentrados. Esta corteza funciona como empaque natural.
- La cantidad de grasa que contiene el centro del queso es debida a la adición de crema durante el proceso con el propósito de obtener un queso doble crema, el cual cumple con las especificaciones de la norma del CODEX STAN 275-1973 para el queso crema de mínimo 25 % de grasa.
- El queso bola de Ocosingo posee bacterias capaces de producir una gran cantidad de ácido láctico, que puede resultar en la inhibición de microorganismos no deseados.
- Los quesos analizados tuvieron una cuenta alta de *S. aureus* y coliformes totales, por lo que se deben aplicar las buenas prácticas de producción y NOMs para mejorar su calidad microbiológica.
- Se logró identificar mediante métodos moleculares a *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei*.
- Las bacterias ácido lácticas aisladas no producen moléculas de naturaleza proteínica que inhiban el crecimiento de *S. aureus* y *L. monocytogenes*.
- El único factor de inhibición que poseen dichas cepas contra bacterias patógenas, es la generación de ácido láctico a partir de la fermentación de lactosa por acción de las BAL.
- *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* podrían ser utilizadas como bacterias probióticas en alimentos.

9. Perspectivas

- Capacitar e informar a los productores sobre la aplicación de las buenas prácticas de higiene y sanidad en la elaboración y manejo de alimentos, así como el sistema HACCP en el proceso de elaboración del queso bola de Ocosingo.
- Aislar e identificar más bacterias ácido lácticas e incluso levaduras para observar si estas presentan producción de compuestos capaces de inhibir bacterias patógenas de interés como *S. aureus* y *L. monocytogenes*.
- Realizar de nuevo el análisis microbiológico, fisicoquímico y proximal con quesos elaborados en una época distinta a la de los analizados para observar las diferencias que implica la estacionalidad.
- Realizar un análisis microbiológico y proximal a la leche con la que se elabora el queso bola de Ocosingo.
- Se propone realizar el mismo estudio, pero con quesos de distintos productores y observar la variabilidad entre éstos, para tener un panorama más completo de los quesos de la región.
- Se sugiere el análisis de otros quesos madurados para poder analizar la microbiología de estos y poder establecer referencias. Ya que no existe normatividad mexicana para quesos elaborados con leche cruda.
- Continuar con la evaluación del potencial probiótico con pruebas de resistencia a diferentes antibióticos y de adherencia a las células y/o mucus intestinales.

10. Bibliografía

1. Adouard., N., Foligné, B., Dewulf, J., Bouix, M., Picque, D. y Bonnarme, P. 2014. In vitro characterization of the digestive stress response and immunomodulatory properties of microorganisms isolated from smear-ripened cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 197, 98-107.
2. Agudelo, M., Cesín, A., y Thomé, H. 2016. Alimentos Emblemáticos y Turismo. La vinculación del queso bola de Ocosingo con la oferta turística regional. *Agricultura, Desarrollo y Sociedad*, 13, 131-149.
3. Alvarado, C., y Díaz, C. 2009. Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. *Salud pública y nutrición*, 10, 51-59.
4. Amiot, J. 1991. *Ciencia y tecnología de la leche*. Zaragoza: Acribia.
5. Arrieta, L. 2011. *Evaluación microbiológica de la leche y los productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
6. Badui, S. 2006. Leche. En: S. Badui ed. *Química de los Alimentos*. Ciudad de México: Pearson Educación, 603-629.
7. Baer, A., Ryba, I., Mayer, J. y Bütikofer, U. 1996. Microplate assay of free amino acids in Swiss cheeses. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 49, 58-62.
8. Bemena, L., Mohamed, L., Fernandes, A., y Lee, B. 2014. Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3, 924-949.
9. Bourrie, B., Willing, B. y Cotter, P. 2016. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-17.
10. Brighenti, M., Govindasamy-Lucey, S., Lim, K., Nelson, K., y Lucey, J. 2008. Characterization of rheological, textural and sensory properties of samples of commercial US cream cheese with different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 91, 4501-4517.

11. Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. 2009. *Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos*. 2ª edición. Ciudad de México: UNAM.
12. Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. y Lavigne, R. 2011. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 164-171.
13. Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A. y Espinoza, A. 2008. *Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio cultural que debe rescatarse*. 1ª edición. Guadalajara: Biblioteca Básica de Agricultura.
14. Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A. y Espinoza, A. 2013. *Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio cultural que debe rescatarse*. 2ª edición. Guadalajara: Biblioteca Básica de Agricultura.
15. Chacón, R., Ortiz, V., Thomazini, N., Fávoro, C., y Souza, A. 2016. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *Food Science and Technology*, 68, 67-75.
16. CODEX Standard 283-1978. Norma general del CODEX para el queso.
17. CODEX Stan 33-1981. Standard for olive oils and olive pomace oils.
18. Correa, F., Golowczyc, M., De Antoni, G., Pérez, P., Humen, M. y Serradell, M. 2013. Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1815–1822.
19. Delgado, E. 2013. *Producción de compuestos antibacterianos por bacterias ácido lácticas del queso Cotija*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México.
20. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, E. y Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, 193-194.
21. Desmond, C., Fitzgerald, G., Stanton C. y Ross, R. 2004. Improved Stress Tolerance of GroESL-Overproducing *Lactococcus lactis* and Probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5929–5936.
22. Fox, P., Guinee, T., Cogan, T. y McSweeney, P. 2017. *Fundamentals of Cheese Science*. 2ª edición. New York: Springer.

23. Gaggía, F., Mattarelli, P. y Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. 15-28.
24. García, I., Serrano, C., Olvera, M., Delgado, M., Peña, C., Mendoza, G., y Quirasco, M. 2014. Antibacterial activity produced by *Enterococcus spp.* Isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT – Food Science and Technology* 59, 26-34.
25. García, J. 2018. *Evaluación de la capacidad antagonista de Lactobacillus aislados de queso de Ocosingo contra patógenos de interés en alimentos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México.
26. García, M., Revah, S. y Gómez, L. 1998. Productos lácteos. *Biotecnología alimentaria*. Ciudad de México: Limusa.
27. Guevara, J. 2011. Probióticos en nutrición animal. *Sistema de Revisiones en Investigación*, 1-10.
28. Hamet, M., Medrano, M., Pérez, P. y Abraham, A. 2016. Oral administration of kefir exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. *Beneficial Microbes*, 7, 237-246.
29. Hempel, S., Newberry, S., Maher, A., Wang, Z. y Miles, J. 2012. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 1959-1969.
30. Heredia, P., Hernández, A., González, A., y Vallejo, B. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42, 340-346.
31. Hernández, V. 2010. *Composición nutrimental de queso Cotija región de origen en función de condiciones de producción y maduración*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México.
32. Hernández, V. 2007. Queso Cotija: estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México.

33. Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y. y Yang, L. 2013. *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of Dairy Science*, 96, 2746–2753.
34. Hugo, A., Kakisu, E., De Antoni, G. y Perez, P. 2008. *Lactobacilli* antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 613–619.
35. Iñiguez, P., Pérez, R. y Acedo, F. 2007. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49, 46-54.
36. Jay, J. 2000. *Modern food microbiology*. Maryland: Aspen.
37. Jurado, H., Calpa, F. y Chaspuengal, A. 2014. Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 61, 241-257.
38. Kakisu, E., Abraham, A., Tironi, C., Ibarra, C. y De Antoni, G. 2013. *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Dairy Research*, 80, 64–71.
39. Kakisu, E., Abraham, A., Perez, P. y De Antoni, G. 2007. Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 70, 2613–2616.
40. Khalid, N. y Marth, E. 1990. Proteolytic Activity by Strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 73, 3068-3076.
41. Kongo, J. 2013. Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: Past, present and future developments. En: *Lactic Acid Bacteria-R&D for Food, Health and Livestock purposes*. University of Azores: Azores.
42. Kumar, J. 2008. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 555-561.
43. Lelieveld, H., Holah, J. y Napper, D. 2013. Hygienic factory design for food processing. En J. Holah ed. *Hygiene in food processing*. Cambridge: Woodhead Publishing, 53-90.

44. Leroy, F. y De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (2), 67–78.
45. Liu, J., Wang, S., Chen, M., Yueh, P. y Lin, C. 2006. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2527-2533.
46. López, R., Hernández, A., Villegas, A. y Santos, A. 2015. Caracterización socio técnica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2, 345-353.
47. Lortal, S. y Chapot-Chartier, M. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 857-871.
48. Mandigan, M., Martiniko, J., Bender, K., Buckley, D., y Stahl, D. 2015. *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson.
49. Marcos, A. y Esteban, M. 1990. Equations for calculation of Water activity in cheese from its Chemical composition: A Review. *Food Chemistry*, 35, 179-186.
50. Marilley, L., y Casei, M. 2004. Flavor of cheese products: Metabolic pathway, and analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139-159.
51. Mariscal, P., Ibañez, R. y Gutiérrez, M. 2013. Características microbiológicas de leche cruda de vaca en mercados de abasto de Trinidad, Bolivia. *Agrociencias Amazonia*, 1 (2), 18-24.
52. Medina, Z. 2013. *Caracterización de quesos fresco y curado fabricados a partir de leche de cabras alimentadas con diferentes dietas*. Tesis de Maestría. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
53. Mukhtar, H y Hak-ul, I. 2006. Biosynthesis of protease from *Lactobacillus paracasei*: Kinetic analysis of fermentation parameters. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*.
54. Narváez, B., Cruz, M., Hernández, F., Flores, M., Martínez, D. y Rangel, S. 2017. Selección de bacterias ácido lácticas del queso artesanal de leche de cabra de Coahuila para su uso como cultivos iniciadores. *Investigación y Ciencia*, 25, 45-52.

55. NMX-F-206-1986. Alimentos. Lácteos. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
56. NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
57. NMX-F-710-COFOCALEC-2014. Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Determinación de grasa en quesos – Método de prueba.
58. NMX-F-730-COFOCALEC-2013. Sistema producto leche-alimentos-lácteos-prácticas de higiene recomendadas para la obtención de leche.
59. Norma del CODEX para el queso crema (queso de nata, “cream cheese”) CODEX Stan 275-1973.
60. NMX-F-701-COFOCALEC-2016, Sistema producto leche-alimentos-lácteos-determinación de cenizas en quesos-método de prueba.
61. NOM-F-68-S-1980, Alimentos Determinación de Proteínas.
62. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobios en placa.
63. NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
64. NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
65. NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.
66. Obed, D. y Liong, M. 2011. *Biology of prokaryotic in Probiotic Biology Genetics and health aspects*. New York: Springer Heidelberg Dordrecht.
67. Odermatt, P. y Santiago, C. 1997. Ventajas comparativas en la producción de leche en México. *Revista Agroalimentaria*, 5, 35-43.
68. Olveira, G. y González, I. 2007. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición hospitalaria*, 22, 24-36.
69. Olvera, M., Serrano, C. y Quirasco, M. 2015. Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *Biotecnología*, 19, 25-43.

70. Oshima, S., Hirano, A., Kamikado, H., Nishimura, J., Kawai, Y., y Saito T. 2014. Nisin. A extends the shelf life of high-fat chilled dairy dessert, a milk-based pudding. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1218-1228.
71. Osorio, J., Ciro, H. y Mejía, L. 2004. Caracterización textural y fisicoquímica del queso EDAM. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 57, 2269-2278.
72. Oyetayo, V. y Oyetayo, F. 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of Biotechnology*, 4, 123-127.
73. Peralta, M. y Lastra, I. 1999. Programa de producción de leche y de sustitución de las importaciones. En: *Dinámica del Sistema lechero mexicano en el marco regional y global*. Ciudad de México: UAM.
74. Ramírez, C y Vélez, J. 2016. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información tecnológica*, 27(6), 115-128.
75. Ramírez, C y Vélez, J. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 131-148.
76. Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J. y Arce, F. 2011. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7, 1-16.
77. Revilla, A. 1985. *Tecnología de la leche; procesamiento, manufactura y análisis*. San José: IICA.
78. Reyes, J. 2015. *Identificación de la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas del género Enterococcus*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana.
79. Salminen, S., vonWright, A. y Ouwehand, A. 2004. *Lactic acid bacteria: Microbiological and function aspects*. New York: Marcel Dekker.
80. Sánchez, L. y Tromps, J. 2014. *In vitro* characterization of acid lactic bacterias with probiotic potential. *Revista Salud Animal*, 36, 124-129.
81. Sandine, W. y Elliker, P. 1970. Microbiologically induced flavors and fermented foods: flavor in fermented dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 557-562.

82. Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres ,J. y Marquina, D. 2003. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 434–437.
83. Serafini, F., Turrone, F., Ruas-Madiedo, P., Lugli, G., Milani, C. y Duranti, S. 2014. Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 50–59.
84. Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 47, 125-137.
85. Spreer, E. 1991. *Lactología industrial*. Zaragoza: Acribia S. A.
86. Sumano, H. y Ocampo, L. 2006. *Farmacología Veterinaria*. 3ª edición. Madrid: McGraw-Hill.
87. Tamime, A. 2009. Microbiology of raw and market milk. En: V. Touch y C. Deeth eds. *Milk processing and quality management*. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 48-71.
88. Venegas, C. 2018. *Potencial biotecnológico de bacterias ácido lácticas aisladas de un queso madurado mexicano*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México
89. Verdenelli, M., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C. y Cresci, A. 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition*, 48, 355-363.
90. Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M., Gänzle, M. y Vogel, R. 2005. Functional Characterization of the Proteolytic System of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T during Growth in Sourdough. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6260-6266.
91. Villegas, A. 2003. *Los quesos mexicanos*. Texcoco: Universidad Autónoma de Chapingo.
92. Villegas, A., Cervantes, F., Cesín, A., Espinoza, A., Hernández, A., Santos, A y Martínez, R. 2014. *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. Guadalajara: Biblioteca Básica de Agricultura.

11.1 Referencias web

1. Codex Alimentarius. 1997. *Textos básicos sobre higiene de los alimentos*. [En línea] (Actualizado al 18 de septiembre de 2018). Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/CAC-RCP1-1969.PDF [Último acceso el 18 de septiembre de 2018].
2. DeLaval. 2017. *12 reglas de oro para el ordeño*. [En línea] (Actualizado al 18 de septiembre de 2018). Disponible en: <http://www.delaval.com.mx/-/Consejos-de-ordeno/12-golden-rules-for-milking/> [Último acceso el 18 de septiembre de 2018].
3. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2011. *Manual I. Buenas prácticas de ordeño*. [En línea] (Actualizado al 18 de septiembre de 2018). Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-bo952s.pdf> [Último acceso el 18 de septiembre de 2018]
4. SAGARPA. 2018. *Panorama de la leche en México*. [En línea]. (Actualizado al 24 de septiembre de 2019). Disponible en <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Panorama%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf> [Último acceso el 24 de septiembre de 2019]
5. Universidad Autónoma de Chapingo. 2014. *Quesos bola de Ocosingo, Chiapas*. [En línea]. (Actualizado al 21 de agosto de 2019). Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=p4tblkEbKZs&t=484s> [Último acceso el 21 de agosto de 2019].

11. Anexo

- Tinción de Gram

Alcohol-acetona

Etanol 95% (v/v) 700,0 mL

Acetona 300,0 mL

Mezclar perfectamente ambos líquidos.

Cristal violeta

Solución A

Cristal violeta 2,0 g

Etanol 95% (v/v) 20,0 mL

Disolver el cristal violeta en el etanol.

Solución de Yodo

Yodo 1,0 g

Yoduro de potasio 2,0 g

Agua 300,0 mL

Triturar finamente el yodo y el yoduro de potasio en un mortero, de ser posible en una campana de extracción. Añadir una pequeña cantidad de agua para lavar el mortero, agregar el resto del agua y agitar. Guardar la solución en envases de color ámbar.

Solución de Safranina

Safranina 0,25 g

Etanol 95% (v/v) 10,0 mL Agua 100,0 mL

Disolver la safranina en el etanol, mezclar, agregar el agua y volver a agitar. Filtrar la solución con papel filtro.

Técnica de la tinción de Gram:

1. Colocar sobre un porta-objetos una gota de agua y la colonia que se desea teñir, fijando a calor moderado la preparación. En caso de utilizar un cultivo líquido, omitir la gota de agua y colocar directamente sobre un porta-objetos una gota del cultivo líquido.
2. Adicionar cristal violeta a la preparación y dejarlo durante un minuto
3. Lavar con agua (usar de preferencia una piceta) y dejar escurrir
4. Cubrir la preparación el lugol (solución yodo-yodurada), y dejarlo actuar durante un minuto.
5. Lavar con agua y decolorar con etanol al 95% (v/v), hasta que deje de salir colorante, (aproximadamente 30 segundos).
6. Inmediatamente después enjuagar con agua y escurrir.
7. Aplicar el colorante de contraste (safranina), esperar durante 30 segundos y
8. Enjuagar con agua, escurrir y dejar secar, para posteriormente hacer la observación microscópica.

- Preparación de medios de cultivo

Agar tributirina

Reactivo	Cantidad
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Tributirina	10 g
Glucosa 20 % (m/v)	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Preparación:

1. Adicionar la bacto triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y tributirina en agua destilada y ajustar a pH = 7.5.
2. Emulsificar en homogeneizador (Ultraturax T25, Janke & Kunkel; USA) durante 2 minutos a velocidad mínima.
3. Adicionar agar y esterilizar en autoclave (121 °C, 15 min)
4. Dejar enfriar el medio y añadir la glucosa, previamente esterilizada por filtración en membrana de 0.22 µm.
5. Mezclar el medio con la glucosa y verter 20 mL a cada caja Petri.
6. Esperar a que solidifique.

Agar aceite de olivo

Reactivo	Cantidad
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Aceite de olivo	10 mL
Glucosa 20 % (m/v)	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Preparación:

1. Adicionar la bacto triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y aceite de oliva en agua destilada y ajustar a pH = 7.5.
2. Emulsificar en homogeneizador (Ultraturax T25, Janke & Kunkel; USA) durante 2 minutos a velocidad mínima.
3. Adicionar agar y esterilizar en autoclave (121 °C, 15 min)
4. Dejar enfriar el medio y añadir la glucosa, previamente esterilizada por filtración en membrana de 0.22 µm.
5. Mezclar el medio con la glucosa y verter 20 mL a cada caja Petri.
6. Esperar a que solidifique.

Agar leche descremada

Reactivo	Cantidad
Leche descremada	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Preparación:

1. Adicionar la leche descremada a la mitad del volumen de agua y esterilizar en autoclave.
2. Esterilizar el agar con la otra mitad de agua.
3. Mezclar ambas soluciones y verter en cajas Petri.

Agar MRS

Para 1 L de medio:

Reactivo	Cantidad
Medio MRS	70 g
Agar	55 g
Agua desionizada	100 mL

- Buffer de fosfatos pH 7.5 100mM

Para 100 mL de preparación

Reactivo	Cantidad
KH_2PO_4	0.23 g
K_2HPO_4	1.45 g
Agua desionizada	100 mL

Preparación:

Agregar en 100 mL de agua desionizada la cantidad necesaria de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , disolver y ajusta el pH a 7.5. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min y almacenar a 4 °C.

Tabla 17. Cuentas de UFC/mL sobrevivientes de la evaluación del potencial probiótico

Cepa	Juego gástrico (UFC/mL)		Jugo duodenal (UFC/mL)		Estrés continuo (UFC/mL)	
	0 h	1 h	0 h	2 h	0 h	3 h
1	215	200	271	266	213	188
	256	223	285	279	187	159
2	228	216	299	155	219	180
	197	192	171	163	173	154
3	110	90	127	105	94	77
	135	98	113	111	123	102
4	184	172	191	180	167	126
	209	200	205	184	166	112
5	146	84	135	101	180	76
	141	77	149	93	129	63
6	188	103	108	76	112	98
	151	114	121	79	143	93

n= 2

Tabla 18. Cuentas de UFC/mL de la evaluación del potencial probiótico corregidas por diluciones

Cepa	Juego gástrico (UFC/mL)		Jugo duodenal (UFC/mL)		Estrés continuo (UFC/mL)	
	0 h	1 h	0 h	2 h	0 h	3 h
1	2,355	2,115	2,780	2,725	2,000	1,735
2	2,125	2,040	1,850	1,590	1,960	1,670
3	1,225	940	1,200	1,080	1,085	895
4	1,965	1,860	1,980	1,820	1,665	1,190
5	1,435	805	1,420	970	1,545	695
6	1,660	1,085	1,145	775	1,275	955