

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS LIPOLÍTICOS
DURANTE LAS ETAPAS DE ELABORACIÓN DE UN QUESO
ARTESANAL, MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES”.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS
PRESENTA:

Q.A. VERÓNICA GARCÍA SATURNINO

Tutora: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Ciudad Universitaria, Noviembre de 2011.



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

PRESIDENTE: Dra. Gloria Soberón Chávez.
VOCAL: Dr. José Adelfo Escalante Lozada.
SECRETARIO: Dra. Esperanza Martínez Romero.
1er. SUPLENTE: Dra. Herminia Loza Tavera.
2do. SUPLENTE: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

Sitio donde se desarrolló el proyecto: Laboratorio 312 del Conjunto E de la Facultad de Química. Ciudad Universitaria. Universidad Nacional Autónoma de México.

Apoyo del proyecto financiado por UNAM-DGAPA IN200705.
Agradecimiento al CONACYT por la beca otorgada.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por haberme dejado cumplir este sueño!

A las doctoras Esperanza Martínez, Gloria Soberón, Herminia Loza y María del Carmen Wachter, así como al Dr. Adelfo Escalante por su valioso apoyo en la revisión de este trabajo.

A mi asesora, consejera y amiga la Dra. Maricarmen Quirasco por la confianza que depositó en mí para la realización de otro proyecto más (el segundo juntas). Gracias por todo tu apoyo.

A Carolina Peña y a la Dra. Amelia Farrés por su amistad y convivencia en el laboratorio durante este periodo

A todos mi amigos que me apoyaron al lo largo de esta etapa, a los que ya tomaron otro rumbo y a los que siguen conmigo en esta máxima casa de estudios.

A Ricardo Ugalde por haber hecho que toda esta etapa fuera agradable y por apoyarme siempre en los buenos y malos momentos.

¡Gracias Bebiux por apoyarme en todo este último proceso, tu ayuda fue invaluable!

DEDICATORIAS:

Dedico este proyecto a mi familia especialmente a:

Mi madre querida quién siempre ha sido el pilar más importante en cada paso que doy y la persona que más se ha preocupado por mí. ¡Gracias por quererme tanto!

Mi padre por todo su apoyo cariño y sus consejos.

A mis dos hermanitas: Angeles y Alicia Rebeca porque sin su apoyo todo hubiera sido más difícil.

Los quiero a todos!

ÍNDICE

			PAG.
1	RESUMEN		7
2	INTRODUCCIÓN		9
3	ANTECEDENTES		12
	3.1	Definición de queso Cotija	12
	3.2	Proceso de elaboración de queso Cotija	12
	3.3	Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota	17
	3.3.1	Efecto del tratamiento térmico	17
	3.3.2	Procesos alternos para la conservación de leche cruda	17
	3.3.3	Efecto del salado	18
	3.3.3.1	Efecto de la sal en la composición del queso	19
	3.3.3.2	Efecto de la sal en la microbiología del queso	20
	3.3.3.3	Efecto de la sal en la calidad del queso	20
	3.3.4	Actividad acuosa	20
	3.3.5	Potencial redox	20
	3.3.6	Temperatura de maduración	21
	3.4	Microbiología de la leche cruda	21
	3.4.1	Fuentes de contaminación de la leche cruda	22
	3.5	Maduración del queso	26
	3.5.1	Microbiología de la maduración	27
	3.5.2	Otros microorganismos en la maduración de quesos	28
	3.6	Lipólisis	28
	3.6.1	Lipasas	29
	3.7	Identificación de poblaciones microbianas	31
	3.7.1	Detección de microorganismos en medios lipolíticos	32
	3.7.2	Estudio de microorganismos por métodos moleculares	32
	3.8	Estudio de la diversidad microbiana mediante la comparación de secuencias	33
	3.8.1	PCR-DGGE	33
4	JUSTIFICACIÓN		38
5	HIPÓTESIS		38

6	OBJETIVOS		39
7	DIAGRAMA EXPERIMENTAL		40
8	MATERIAL Y MÉTODOS		41
	8.1	Muestras	41
	8.2	Análisis microbiológico	42
	8.3	Actividad lipolítica	43
	8.4	Caracterización microscópica	43
	8.5	Extracción de ADN	43
	8.6	Cuantificación de ADN	45
	8.7	Reacción de PCR	46
	8.8	Análisis molecular: DGGE	47
	8.9	Purificación y secuenciación	48
9	RESULTADOS		49
	9.1	Análisis microbiológico	49
	9.2	Detección de actividad lipolítica	53
	9.3	Purificación de colonias lipolíticas	55
	9.4	Análisis microscópico	55
	9.5	Extracción de ADN	58
	9.6	PCR	60
	9.7	DGGE	62
		9.7.1 Dinámica de la población microbiana- Dominancia relativa	64
		9.7.2 Identificación de microorganismos lipolíticos y microheterogeneidad.	65
		9.7.3 Prueba de confiabilidad sobre la identidad de bandas mediante análisis filogenéticos.	76
10	CONCLUSIONES		82
11	ANEXOS		84
12	BIBLIOGRAFÍA		94

1. RESUMEN

El queso Cotija se elabora desde hace cientos de años en un área ubicada entre Jalisco y Michoacán. Tiene gran aceptación por la gente de esa región y su consumo va en aumento. Es un queso de gusto fuerte y uno de los pocos quesos maduros elaborados y consumidos en el país. Se pretende obtener la denominación de origen para este producto, así como, estandarizar el proceso de elaboración y mejorar las prácticas higiénicas del proceso para obtener un producto final de buena calidad. Lo anterior, enfocado a que pueda competir con otros quesos de fama internacional, ocupar un mayor mercado y resaltar sus propiedades.

En las etapas del proceso de elaboración de este producto, no se incluye algún tratamiento térmico que disminuya la microbiota contenida. Se han conseguido avances en cuanto al mejoramiento de buenas prácticas de higiene en su elaboración, y en el grupo de trabajo se han realizado estudios para caracterizar a la microbiota que participa en el proceso de manufactura y maduración. Dentro de este último aspecto, se considera a los microorganismos lipolíticos como posibles responsables de la formación de compuestos de sabor y olor en el queso. Se han establecido como posibles fuentes de inoculación de microorganismos, etapas como, la ordeña, el tiempo de reposo de la leche a temperatura ambiente, el amasado y salado manual, así como también los utensilios que se usan para su elaboración.

En este trabajo, se aislaron microorganismos lipolíticos que pudieron ser incorporados al proceso de elaboración del queso a partir de muestras tomadas en las etapas mencionadas. Se aplicaron métodos dependientes e independientes de cultivo para la descripción de la comunidad bacteriana y la dinámica de población, durante los primeros pasos de manufactura de un queso elaborado artesanalmente. Esta investigación se enfocó en la identificación de microorganismos lipolíticos, considerando la relevancia de esta actividad enzimática en el desarrollo del sabor del queso durante la maduración.

A través de la amplificación de la región V3 del gen ADNr 16S seguido de un análisis por DGGE, se encontró que la ordeña y, el amasado y salado manual fueron las etapas donde se observaron los principales cambios de la comunidad bacteriana. Se encontró que antes de la maduración, la microbiota está conformada principalmente por cocos y bacilos Gram positivo. Algunos se hallaron presentes desde la leche cruda, hasta la cuajada salada; estos últimos identificados por secuenciación de la región V1 del gen ADNr 16S, como *Staphylococcus sp.*, y *Lactococcus lactis*.

Otros fueron incorporados en el proceso durante el amasado y el salado como *Bacillus* sp., *Paenibacillus polymyxa*, *Staphylococcus* sp. y bacterias no cultivables de piel humana y plantas, las cuales se identificaron por la secuenciación directa de las bandas de DGGE. Se confirmó la presencia de *Marinilactibacillus* sp. en el proceso, aunque no es una bacteria lipolítica es indicativo de la contribución de la comunidad bacteriana de la sal de mar en la cuajada del queso antes de la maduración.

2. INTRODUCCIÓN

En México existen muchos alimentos elaborados de manera artesanal, varios de éstos tienen propiedades nutritivas y características sensoriales auténticas que no se encuentran en ningún otro producto. El queso Cotija es un producto lácteo artesanal de mucha tradición, elaborado desde hace 400 años en la Sierra de Jalmich, una región que comprende varios municipios que se encuentran entre los límites de los estados de Jalisco y Michoacán, México.

La topografía y la ubicación geográfica tienen una influencia en el clima de esta región particular. La que muestra una temperatura de 20-25 °C, precipitaciones de 900-1200 mm/año y una humedad relativa de 80%. Estos parámetros son importantes para la maduración del producto, porque dicho proceso se desarrolla en estas condiciones ambientales. El queso es elaborado con leche cruda obtenida de vacas de raza cebú y cruzas, alimentadas por libre pastoreo. La calidad de la leche para la producción del Cotija Región de Origen requiere de un mínimo de 3.7% de grasa y 3.0% de proteína (Álvarez *et al.*, 2005). Es elaborado en temporada de lluvias, por lo que la vegetación es muy abundante en ese tiempo y la producción de leche es más alta.

Durante el proceso de elaboración del Cotija, no se incluye algún tratamiento térmico que reduzca la carga microbiana presente, ni tampoco se adicionan cultivos iniciadores. El queso es madurado por lo menos tres meses, después llega a ser un queso de pasta dura, salado, desmenuzable, de olor fuerte y sabor característico bien conocido en México. No se conoce a fondo la microbiota que lo compone; sin embargo, hay puntos críticos durante el proceso que son posibles fuentes de inoculación de otros microorganismos como, la ordeña, el tiempo de reposo de la leche a temperatura ambiente, el amasado y salado manual y la maduración, así como, también el uso de utensilios que no están limpios o estériles.

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

La Asociación Regional de productores de Queso Cotija también publicó ese mismo año las “Reglas de uso” con las que se apoya al productor, se hace un esfuerzo por estandarizar el

proceso y se inicia su protección oficial. Sin embargo, es necesario conocer más información sobre la microbiota de este producto.

El desarrollo del sabor en la maduración del queso es un proceso complejo causado por diferentes reacciones bioquímicas, por ejemplo, proteólisis, metabolismo de lactosa y lipólisis de los triglicéridos de la leche. Estas últimas, tienen una gran importancia en la producción de compuestos volátiles. Según la variedad de queso, puede ocurrir una posterior liberación de ácidos grasos de cadena corta e intermedia, los cuales son sustratos de otras reacciones enzimáticas que producen compuestos con sabor y olor.

Microorganismos de las especies de *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.* y algunas levaduras como *Yarrowia lipolítica* y *Candida zeylanoides* se han aislado de queso Cotija con diferentes estados de maduración y se han caracterizado por su gran actividad lipolítica. Son parte de la microbiota responsable de la producción de compuestos volátiles (García, 2006).

Ahora bien, se sabe que los microorganismos lipolíticos están presentes en el queso durante su maduración y que su actividad es importante para darle las características que posee un queso auténtico, pero no se sabe de dónde provienen o en qué etapa del proceso se incorporan.

En el caso de productos artesanales, la identificación de la microbiota puede llegar a ser una tarea difícil por la complejidad y variabilidad del sistema. El estudio de tales comunidades, es usualmente relacionado con el uso de estudios polifásicos que involucran métodos dependientes e independientes de cultivo. Los métodos dependientes de cultivo consisten en aislar y cultivar a los microorganismos para posteriormente identificarlos por medio de características morfológicas, bioquímicas o genéticas. Este tipo de técnicas demandan de mucho tiempo y generalmente se detecta un bajo número de microorganismos comparados con la microbiota total. Otra desventaja es la inhabilidad para conocer los requerimientos del medio de cultivo para todas las especies presentes en la muestra. Por otra parte, los métodos independientes de cultivo se han usado muy frecuentemente para el estudio de comunidades complejas. Están basados en el análisis directo de ácidos nucleicos (ADN y ARN) sin ningún paso de cultivo previo. Frecuentemente, se realiza un análisis posterior con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de una región blanco del ADN. Teóricamente, a través de estos últimos métodos, se puede obtener una visión más completa de la comunidad microbiana de una muestra. También hay que considerar las limitaciones en la obtención del ADN de todos los microorganismos, la inhibición de la amplificación por PCR, así como la sensibilidad del método.

Una técnica subsecuente a la PCR es una electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (DGGE) para el análisis de fragmentos del mismo tamaño pero con diferente

secuencia, tales como los obtenidos de la amplificación del gen ADNr 16S. Esta metodología de PCR-DGGE se ha utilizado para el análisis de alimentos fermentados con comunidades microbianas complejas, entre ellos, quesos (Jany y Barbier, 2008). La identificación de la población presente en una muestra se puede realizar por la comparación del patrón de migración obtenido, contra el de microorganismos aislados y conocidos, una colección de especies o por secuenciación de bandas individuales. Tomando en cuenta que cada método tiene ventajas y desventajas para el estudio de comunidades complejas, el objetivo de este trabajo es aplicar los métodos dependientes e independientes de cultivo para identificar a los microorganismos lipolíticos presentes en la cuajada salada antes de la maduración del queso Cotija artesanal; así como determinar la prevalencia y dominancia de éstos, durante las primeras etapas del proceso de elaboración.

3. ANTECEDENTES

El queso Cotija se produce en una región ubicada en las inmediaciones serranas de los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra Jalmich), en la jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, Jalisco, sur de Tocuambo y de Cotija, Michoacán, principalmente. Además se extiende a territorio de los municipios vecinos: norte de Jilotlán de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupan, Jalisco; suroeste de Los Reyes, Peribán y Tancítaro, y norte de Buena Vista Tomatlán, Michoacán (Álvarez *et al.*, 2005).

3.1. DEFINICIÓN DE QUESO COTIJA

Aunque el Cotija se incluye en la clasificación de la NOM-121-SSA1-1994 para quesos, la definición no considera completamente a este tipo de queso, ya que sólo menciona a los elaborados con leche pasteurizada. El Cotija puede clasificarse como un queso de pasta dura, prensada, no cocida y madurada (el genuino debe ser madurado al menos tres meses), que se elabora con leche cruda entera de vaca. Posee una pasta desmoronable, ácida y con elevado porcentaje de sal. Cuando está madurado presenta un color blanco-amarillento. Es un queso seco y de gusto muy fuerte. Su peso oscila entre 20 y 30 Kg por pieza, sus dimensiones promedio son 40 cm de diámetro por 18 cm de altura. Actualmente, se encuentra publicado en el Diario Oficial un proyecto de norma que define al Queso Cotija. Este proyecto fue elaborado y aprobado por el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, A.C. (COFOCALEC) y se encuentra en consulta bajo la clave de PROY-NMX-735-COFOCALEC-2009.

3.2. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO COTIJA

La norma NOM-121-SSA1-1994, clasifica a los quesos con base en su proceso y los divide en:

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

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

De acuerdo a las costumbres de algunos productores (observadas durante una visita de campo) y a lo que se estipula en las Reglas de uso (Álvarez *et al.*, 2005), el proceso de elaboración del queso Cotija, Región de Origen, se describe a continuación y se ilustra en la Figura 1.

Ordeña

La leche que se utilice debe ser recién ordeñada del día. La ordeña de las vacas se realiza siempre temprano, entre las 7:00 y 9:00 a.m., según el clima. Si llueve, se retrasa la ordeña pero es preferible hacerlo temprano, para evitar que la leche se “amargue dentro de la vaca” (Audón Sánchez, Comunicación Personal).

La persona dedicada a ordeñar las vacas debe asegurarse de cumplir dos pasos previos a la ordeña: lavarse muy bien las manos y posteriormente, limpiar la ubre de las vacas con un trapo limpio. Para mantener la mayor higiene posible, el ordeñador no debe ser quién acarree el ganado o realice otras actividades que puedan ensuciar sus manos, por lo menos hasta el término de la ordeña.

La mayor parte del ganado utilizado es de raza Cebú, Suiza, Criollas y mezclas de ambas, aunque también cuentan con vacas Holstein, en menor cantidad. Estas últimas, no son recomendables pues de ellas se obtiene leche con menor proporción de grasa y proteína.

Reposo

La mezcla de toda la leche se pasa por cedazos limpios para separar cualquier materia extraña, antes de procesarla. La temperatura de la leche recién ordeñada es de 36-38 °C. Después de la ordeña, se lleva a cabo un reposo de la leche, denominado así porque mientras transcurre la ordeña de todas las vacas del hato, la leche se mantiene en recipientes de acero inoxidable con tapa (en la mayoría de los casos) durante tres o cuatro horas, a temperatura ambiente, antes del cuajado. En algunos ranchos, se utilizan recipientes de plástico y cazos grandes para contener la leche, como en el caso de un productor de La Tinaja, Michoacán.

Adición del cuajo

Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima para ser cuajada (alrededor de 34 °C, con un pH cercano a siete), se adiciona el cuajo (Cuamex, Cuajo estandarizado, enzimas coagulantes de leche bovina, CHR Hansen de México) y se mezcla rápidamente. Para esto, se utilizan tinas grandes de acero inoxidable o en su defecto, tinas grandes de plástico (como se observó con el productor de Jalisco) donde se lleva a cabo el cuajado de toda la leche obtenida de un día (aproximadamente 100 litros). Tiempo de coagulación: variable, de 30 a 40 minutos, hasta una hora. De acuerdo a las costumbres de cada productor.

Corte

La consistencia de la cuajada se determina cruzándola con una cuchara o cuchillo previamente lavado y esterilizado en agua hirviendo. Una vez alcanzado el punto deseado, se realiza el corte de la cuajada con los mismos utensilios hasta obtener grumos equivalentes en tamaño a

un grano de maíz. Durante la visita al rancho de La Tinaja, Michoacán, se observó que la cuajada la dividieron en cortes gruesos realizados con una cuchara de madera, mientras que en el de Santa María del Oro, Jalisco realizaron cortes pequeños con la ayuda de un cuchillo largo.

Desuerado

Después del corte, se deja decantar para obtener la separación del suero y la cuajada, hasta que esta última se asienta al fondo del recipiente. Para eliminar el suero, se drena o cuela con ayuda de un trapo de manta limpio, previamente hervido en agua. Al final, la cuajada se coloca en tinas de acero inoxidable para que siga desuerando. Previamente, las tinas se lavan con agua hirviendo. Algunos productores utilizan el mismo suero obtenido del proceso del día para realizar el lavado, como ocurrió en el rancho de Michoacán.

Desmenuzado

Cuando se pierde el exceso de suero, la cuajada se desmenuza o desmorona manualmente en su totalidad. Si es necesario, se deja escurrir en la misma tina de acero inoxidable o en una artesa de madera algunos minutos más, para quitar el exceso de suero en la cuajada.

Adición de sal

La cuajada desmoronada se sala y mezcla manualmente para que la sal quede bien distribuida. Se utiliza sal de mar en grano procedente del estado de Colima, la que no se encuentra yodada ni fluorada. La cantidad de sal agregada no está estandarizada, sólo agregan un número determinado de tazas de sal con respecto a la cantidad de leche que se va a cuajar. La cantidad aproximada que se agrega es de 138 g - 140 g por cada 20 litros de leche, lo que equivale en promedio a 0.05 g de sal por gramo de cuajada fresca. Esta cantidad varía en cada proceso según el gusto del productor. La cuajada salada adquiere una textura granulosa, característica de una pasta friable.

Moldeado y prensado

La masa salada se puede moldear si se obtiene la cantidad necesaria para una pieza; si se llega a obtener menos, se deja escurrir sobre una artesa a temperatura ambiente para que al día siguiente se incorpore en la cuajada salada del día, y así obtener la cantidad adecuada para llenar el aro (un cincho de diámetro específico), que está cubierto en su interior con dos bandas de ixtle (fibra de maguey), con las que se moldeará la masa. Así se obtiene la presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 Kg. La pasta moldeada se prensa de 18 a 24 horas (se colocan piedras de peso variable, de entre 50 y 90 Kg, de acuerdo al productor), se voltea sobre su propia cara, al concluir el periodo.

El prensado se lleva a cabo en moldes y se cubren los quesos con una malla limpia para evitar que entren los insectos y se coloca en un cuarto ventilado en condiciones ambientales. A partir de esta etapa se considera que inicia la vida de cada pieza de queso.

Desfajado, oreado y maduración

La pasta prensada se mantiene fajada para que no pierda la forma cilíndrica, se voltea sobre su cara diariamente y se ore a temperatura ambiente durante 15 días o hasta que adquiera la firmeza necesaria para que cada pieza pueda ser manipulada. Durante este tiempo, el queso se voltea y se limpia diariamente con un trapo limpio. Cuando el queso se seca empieza a formarse una costra, en ese momento se desfaja y empieza la maduración. El periodo de maduración es de tres meses como mínimo, para asegurar que el producto tenga una buena calidad microbiológica (Álvarez *et al.*, 2005).

La elaboración del queso con leche cruda de vaca cebú o criolla, la ausencia de algún tratamiento térmico durante el proceso, el salado y amasado manual, la variabilidad del prensado y el tiempo mínimo de tres meses de maduración antes de ser consumido son aspectos que diferencian al Cotija de los demás quesos.

Además, se observa que las etapas del proceso que pueden ser vehículos de inoculación de microorganismos son la ordeña, el tiempo que pasa la leche a temperatura ambiente antes de agregar el cuajo, el amasado, salado manual, la etapa de oreo y la maduración. Adicionalmente, a los utensilios como cuchillos o cucharas sin esterilizar (Figura 1).

En resumen, el queso Cotija debe cumplir con los siguientes puntos importantes marcados en las Reglas de uso:

- Producirse de manera natural, a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos de la leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo.
- Estar libre de cualquier microorganismo patógeno.
- Estar libre de compuestos químicos ajenos a su naturaleza, como pesticidas, fertilizantes, detergentes, etc.
- La composición básica del queso será la siguiente:
 - Humedad máxima 36%
 - Grasa mínima 23%
 - Proteína mínima 25%
- El cuajo utilizado deberá ser natural, elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, o a partir del cuajo comercial de origen natural, no microbiano,

es decir, que su composición corresponda a la mezcla enzimática, proveniente del extracto enzimático del estómago de rumiantes.

- La sal deberá ser de mar (en grano) libre de materia extraña y de compuestos químicos.
- El Cotija Región de Origen deberá tener un mínimo de tres meses de vida dentro del área geográfica que protege esta marca, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa.

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

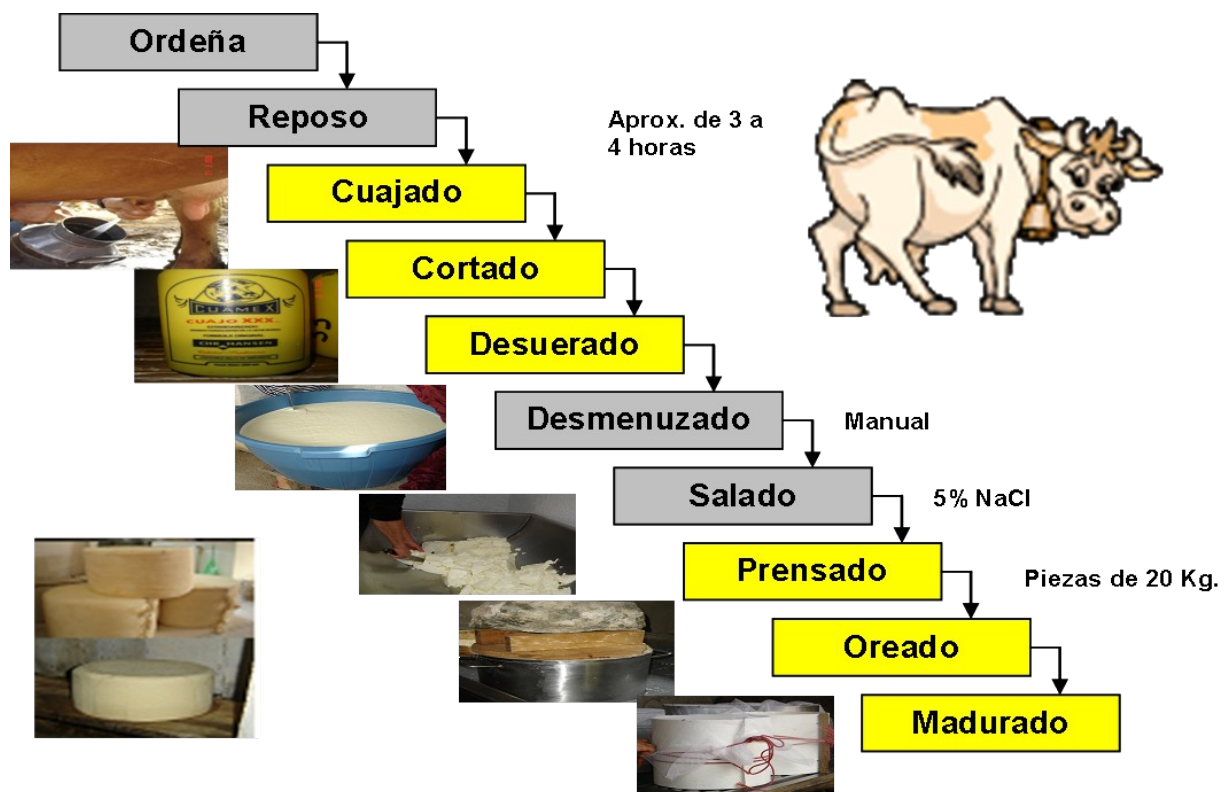


Figura 1. Proceso de elaboración del queso Cotija y posibles puntos de mayor inoculación (marcados en gris).

3.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA

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

3.3.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO

La literatura más reciente muestra que varios tipos de quesos hechos con leche cruda pueden ser considerados un posible vehículo para la contaminación con toxinas de *Escherichia coli*, *Aeromonas sp.*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes* (Albenzio *et al.*, 2005; Irlinger *et al.*, 2009). Quesos de pasta blanda como el Camembert y varios tipos de quesos mexicanos, parecen ser afectados por *Listeria*, en mayor frecuencia que otras variedades de quesos (Voigt *et al.*, 2010). No se descarta que también se pueda detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en este tipo de productos, ya que libera toxinas y es halotolerante. Además, está bien documentado que los patógenos crecen fácilmente en quesos con alta humedad, a pH cercano a la neutralidad y bajo contenido de sal, durante la elaboración y la maduración del producto (Albenzio *et al.*, 2005). El crecimiento de los patógenos depende fuertemente del tipo de tecnología que se aplique en el queso.

En la industria láctea, la pasteurización de la leche y otros tratamientos térmicos para la elaboración de queso, provocan la disminución de la cuenta microbiana y con esto, la eliminación de los patógenos en la leche. Además de lo anterior, causan activación-inactivación de enzimas, desnaturalización de proteínas del suero, modificación del cuajado de la leche y en la actividad de las bacterias ácido lácticas que se agregan posteriormente como cultivos iniciadores.

La pasteurización de la leche (calentamiento a 72-74 °C durante 15 s, o tratamientos equivalentes) destruye patógenos, pero no a todos los microorganismos de deterioro. Es importante aplicar un tratamiento térmico a la leche destinada a la elaboración de queso porque proporciona seguridad y calidad. Sin embargo, los componentes de la leche son factores importantes para desarrollar muchas de las características sensoriales de los quesos, y un tratamiento térmico provocaría alteraciones en la textura y en la maduración (que a menudo se retrasa), pérdida de nutrientes y modificaciones en el perfil sensorial (Trujillo *et al.*, 2002).

Por otro lado, siempre ha existido duda sobre la inocuidad de algunos productos artesanales, como es el caso de los quesos elaborados con leche cruda. En su proceso, no se lleva a cabo una pasteurización a la leche y esto permite obtener características únicas en cada queso. Por lo tanto, se necesita garantizar la inocuidad del producto.

3.3.2. PROCESOS ALTERNOS PARA LA CONSERVACIÓN DE LECHE CRUDA

El interés de incrementar la vida útil de estos productos nos ha llevado a probar nuevos procesos que tienden a utilizar tratamientos no térmicos de conservación. Ejemplo de éstos, son el uso de campos magnéticos o eléctricos, ionización, altas presiones hidrostáticas, ultrasonidos, y la aplicación de agentes químicos o biológicos, tales como, el dióxido de carbono, polímeros policatiónicos, bacteriocinas y enzimas líticas (Trujillo *et al.*, 2000).

En particular, el uso de altas presiones (HP) es una tecnología que mantiene la calidad de los alimentos. Los tratamientos térmicos inactivan los microorganismos, pero también provocan una pérdida de nutrientes y sabores. En contraste, el HP extiende la vida útil de los alimentos sin alterar la calidad nutricional (las vitaminas son mínimamente alteradas) y sensorial (Trujillo *et al.*, 2000).

Los efectos provocados en leche al aplicar las altas presiones son: destrucción microbiana, la disociación del fosfato de calcio coloidal y la desnaturalización de las proteínas del suero de la leche que puede cambiar y/o mejorar sus propiedades tecnológicas. Los efectos provocados en la estructura de las proteínas y el equilibrio mineral permiten diferentes aplicaciones en productos lácteos. Garantiza la estabilización microbiológica de la leche y de otros productos lácteos (crema, yogur y queso). Además, de la obtención de nuevas texturas para la producción de queso y yogur (Trujillo *et al.*, 2002).

En quesos, se ha observado que puede inducir una aceleración en la maduración y la inactivación o la reducción de microorganismos patógenos y/o de descomposición en el queso, lo que se traduce en un aumento en la seguridad del queso y su vida útil. Los cambios conseguidos con este proceso, modifican la propiedad tecnológica de la leche para elaborar queso, mejora la coagulación y el rendimiento del queso (Trujillo *et al.*, 2002).

También se ha evaluado su eficiencia en la eliminación de *Listeria monocytogenes* en algunos quesos, en un estudio donde se inoculó a la leche para la elaboración del Camembert, no se detectó la presencia de éste en el queso, utilizando un tratamiento a 500 MPa, 20 °C, por 10 minutos (Voigt *et al.*, 2010). Se le ha encontrado utilidad pero la falta de disponibilidad de equipo adecuado ha obstaculizado la aplicación del tratamiento a altas presiones, en la industria láctea.

Considerando todo lo anterior, en un queso maduro como el Cotija, que es salado, ácido y seco, se puede prevenir el crecimiento de patógenos, ya que, estos factores cumplen la labor de hacer al queso un medio selectivo e impedir el crecimiento de algunos microorganismos y la actividad de enzimas presentes. Al asegurar estas características, se puede asegurar la calidad microbiológica del producto elaborado con leche cruda.

Tratamientos no térmicos como el uso de altas presiones pueden ser una opción para quesos elaborados con leche bronca, donde la incorporación al proceso de un tratamiento térmico influiría negativamente en el desarrollo de sus características sensoriales y en la microbiota de la maduración.

3.3.3. EFECTO DEL SALADO

La sal (cloruro de sodio, NaCl) se ha utilizado históricamente para la conservación de los alimentos. Los tres métodos clásicos de conservación: fermentación, salado y deshidratación,

complementados con refrigeración son usados para preservar el queso y/o controlar su maduración. La concentración de sal varía del 1 al 5% aproximadamente, según el tipo de queso (Fox *et al.*, 2000).

Durante el proceso de elaboración de quesos uno de los pasos importantes, es el del salado, ya que se logra inhibición del crecimiento de la microbiota iniciadora, obteniendo así una disminución del a_w en el queso. La sal al ser soluble deja menos agua disponible para el crecimiento de algunos microorganismos, provocando que el queso se vuelva un medio selectivo (Beresford *et al.*, 2001). Actúa incrementando la presión osmótica de la fase acuosa del alimento, causando la deshidratación de células bacterianas y su muerte.

La concentración y distribución de sal son parámetros que se deben tomar en cuenta, ya que tienen influencia en varios aspectos de la calidad del queso.

Algunos de los principales efectos de la sal en quesos son:

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

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

La concentración de sal tiene una relación inversa con la a_w en el queso. Altas concentraciones de sal son asociadas con un producto con niveles de grasa y proteína elevados, ya que dejan menor cantidad de agua en el queso (Fox *et al.*, 2000).

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

3.3.3.2. Efecto de la sal en la microbiología del queso.

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

El crecimiento de cepas de *Lactococcus* usadas como iniciadores es estimulado por bajos niveles de sal, pero es fuertemente inhibido a niveles de alrededor del 5%. Cepas de *L. lactis* *sp. lactis* son más tolerantes que *L. lactis sp. cremoris* (Fox *et al.*, 2000).

3.3.3.3. Efecto de la sal en la calidad del queso.

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

Los defectos de sabor en quesos, que tienen concentraciones bajas de sal probablemente surgen de la excesiva o no balanceada actividad enzimática. Además, el NaCl tiene una contribución positiva y directa en el sabor del queso, aún más para los consumidores que aprecian el sabor salado en los alimentos.

3.3.4. ACTIVIDAD ACUOSA (a_w)

La a_w es un concepto termodinámico definido como el radio entre la presión de vapor del agua presente en un sistema (p) y la del agua pura (p_0), a la misma temperatura:

$$a_w = p / p_0, \quad 0 \leq a_w \leq 1 \quad (\text{Beresford } et al., 2001).$$

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

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

La evaporación de agua en la superficie del queso durante la maduración también contribuye a la reducción de la a_w en el éste, pero el factor principal que la afecta es la sal añadida (Fox *et al.*, 2000).

3.3.5. POTENCIAL REDOX (E_h)

El potencial redox o de óxido-reducción (E_h) es una medida de la habilidad de un sistema químico/bioquímico para oxidarse (perder electrones) o reducirse (ganar electrones). El E_h de la

leche es alrededor de +150 mV, mientras que en el queso, se encuentra alrededor de -250 mV (Fox *et al.*, 2000). Es probable que esto se deba a la producción de ácido láctico y a la reducción de pequeñas cantidades de O₂ que pasa de la leche al agua mientras ocurre la sinéresis (Beresford *et al.*, 2001). Como consecuencia, el interior del queso puede formar un sistema anaerobio o microaerofílico, donde se favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos u obligatorios.

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

3.3.6. TEMPERATURA DE MADURACIÓN

Los microorganismos involucrados en la elaboración y maduración del queso son mesofílicos o termofílicos, los cuales tienen una temperatura óptima de 30 °C y 42 °C, respectivamente. La temperatura a la que el queso se almacena tiene que promover las reacciones durante la maduración, así como controlar el crecimiento favorable de la microbiota secundaria y prevenir la propagación de microorganismos patógenos. Altas temperaturas promueven una maduración acelerada, pero los cambios en el cuerpo y sabor del queso pueden ser perjudiciales. Un ejemplo es la obtención de una lipólisis excesiva que puede generar sabores a rancio (Beresford *et al.*, 2001).

Todos los factores anteriormente mencionados influyen en la diversidad de la microbiota, la hacen selectiva. Por lo que, la carga microbiana inicial (en la leche cruda) no será la misma que se encuentre al final del proceso, ni durante la maduración. Todos estos parámetros que promueven cambios en la microbiota de un sistema ayudan a definir un producto.

3.4. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE CRUDA

La diversidad en la microbiota contribuye a generar grandes diferencias en las características organolépticas de quesos elaborados con leche cruda. Además que muchos de los atributos sensoriales que son deseados por los consumidores, no están presentes en quesos elaborados con leche pasteurizada.

La microbiota dominante en la leche generalmente incluye especies de bacterias ácido lácticas (BAL) (*Lactococcus sp.* y *Lactobacillus sp.*), *Pseudomonas sp.*, el grupo de los *Micrococcaceae* (*Micrococcus sp.* y *Staphylococcus sp.*) y levaduras. Otros grupos microbianos presentes en leches crudas son: *Leuconostoc sp.*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, Bacterias ácido lácticas, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Listeria sp.* y enterobacterias. Así también, se encuentran otras bacterias Gram negativas de los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y

Aeromonas; y especies Gram positivas como *Arthrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* y *Propionibacterium sp.* (Lafarge et al., 2004; Fox et al., 2000).

Muchos factores como la composición de la leche, la naturaleza de ésta y la abundancia microbiana que presenta influyen en el tipo de microorganismos contenidos. Las condiciones de producción de la leche cruda, en particular las prácticas higiénicas de los productores, la ordeña y la higiene de la ubre de las vacas determinan el contenido de microorganismos esporulados durante el proceso de elaboración del queso.

Un lavado intensivo del equipo para la ordeña y una buena preparación de la ubre de la vaca tiene como resultado una mejor calidad en leches crudas, con bajas cantidades de microorganismos esporulados, tales como coliformes y *Pseudomonas sp.* En contraste, una mínima higiene alrededor de la ubre preserva los microorganismos incluyendo microbiota halotolerante (*Micrococcus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Microbacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* y *Staphylococcus sp.*) y también las BAL.

3.4.1. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CRUDA

Las principales fuentes de contaminación de la leche cruda son:

El animal. Teóricamente la leche al salir de la ubre debería ser estéril, pero siempre contiene de 100 a 10,000 bacterias/ mL, una baja carga microbiana que puede no llegar a multiplicarse si la leche es manipulada adecuadamente (Valbuena, 2007). Los microorganismos pueden entrar por vía mamaria ascendente a través del esfínter del pezón, es por ello que cualquier lesión que afecte la integridad del mismo, facilitará un aumento en la contaminación. La ubre está en contacto con el suelo, heno, y cualquier superficie donde las vacas se echen, de allí que los pezones sean considerados como una fuente importante de esporas bacterianas.

Las enfermedades contagiosas son una amenaza para la salud de los animales y, por tanto, fuente de contaminación de la leche.

Mastitis. La mastitis o inflamación de la glándula mamaria, es la enfermedad más común y costosa del ganado lechero. La infección por bacterias invasoras, hongos y además por virus son las principales causas de mastitis.

Las infecciones comienzan cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican en la glándula mamaria. La invasión del pezón se presenta generalmente durante la ordeña. Los organismos del ambiente o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel en la punta del pezón, pueden invadir fácilmente y abrir el canal.

Los principales microorganismos que causan la mastitis son: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma sp.*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* y bacterias coliformes.

-*Streptococcus agalactiae*. Es la causa más común de infecciones subclínicas pero muy rara vez produce una severa enfermedad (mastitis aguda). Vive en la ubre de la vaca y sobrevive un corto período de tiempo por fuera de la glándula mamaria. Se disemina principalmente durante la ordeña por medio de la máquina de ordeño, las manos contaminadas del operador y materiales (tela) utilizados para lavar la ubre. El *S. agalactiae* puede ser erradicado del hato con un tratamiento apropiado combinado con buenas prácticas de manejo.

-*Staphylococcus aureus*. Vive dentro o fuera de la ubre, en la piel del pezón y puede causar tanto mastitis clínica como subclínica. Generalmente se disemina de la misma forma que el *S. agalactiae*. La infección tiende a producir cicatrices, que resultan en sacos de infección encerradas en la ubre que son difíciles de alcanzar por los antibióticos. Tales sacos pueden romperse y liberarse en otras partes de la glándula.

-*Mycoplasma sp.* Ha sido una de las principales causas de la mastitis clínica en las granjas lecheras. La infección a menudo es presentada por una vaca comprada. El diagnóstico de infecciones por *Mycoplasma* es más difícil y al ser organismos sin pared celular no pueden ser tratados por algunos antibióticos. Datos actuales sugieren que un número significativo de nuevos brotes se pueden transmitir por vía interna, de animal a animal o por portadores asintomáticos en el rebaño (Barkema *et al.*, 2005).

-*Streptococcus uberis* y *S. dysgalactiae*. Estos organismos se encuentran en nichos o camas (especialmente camas orgánicas: paja, aserrín, etc.), aguas estancadas y tierra. También pueden encontrarse en la piel de la vaca (pezón y abdomen) y en los órganos reproductores. Son generalmente transmitidos desde el medio ambiente al pezón durante la ordeña. Estos organismos no pueden ser eliminados del hato debido a que son parte normal del medio ambiente. El grado de infección de estas bacterias tiende a incrementarse cuando las condiciones favorecen su crecimiento, por ejemplo, durante los meses húmedos del año. Además, son responsables de la mayoría de las mastitis que se presentan al comienzo o al final del período de seca. Además de estas dos especies de bacterias, existen muchos otros estreptococos ambientales (*S. bovis* y *S. fecalis*) que pueden causar mastitis.

-Bacterias coliformes. Las bacterias coliformes son habitantes normales del suelo e intestino de las vacas. Se acumulan y multiplican en la materia fecal y en las camas. Pueden causar mastitis solamente si las partículas contaminadas del medio ambiente entran en contacto con la ubre. A diferencia de las bacterias descritas previamente, los coliformes no se adhieren a los conductos y al alvéolo de la ubre. Se multiplican rápidamente en la leche y producen toxinas

que son absorbidas dentro del torrente circulatorio. Como resultado, las infecciones por coliformes conducen a mastitis clínicas agudas.

Enfermedades contagiosas que no afectan directamente a la glándula mamaria pueden tener un efecto indirecto sobre la mastitis. Tal es el caso de enfermedades como la fiebre aftosa, virus de la diarrea viral bovina e infecciones con patógenos que no provienen de la mastitis como *Mycobacterium avium sp. paratuberculosis* (Barkema *et al.*, 2009).

La leche también puede contaminarse al salir, con pelos que se desprenden de los animales.

Aire. El aire representa uno de los medios más hostiles para la supervivencia de los microorganismos debido a la constante exposición al oxígeno, cambios de temperatura y humedad relativa, radiación solar, etc. Es por ello que sólo aquellos microorganismos resistentes podrán ser capaces de permanecer en el aire y llegar a contaminar los alimentos. Los microorganismos Gram negativos mueren rápidamente, mientras que los Gram positivos y aquellos esporulados pueden persistir por largo tiempo. En el aire se pueden encontrar *Micrococcus sp.*, esporas de *Streptomyces* y de mohos, como *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* Las levaduras raramente se encuentran en suspensiones aéreas.

Agua. El agua utilizada para la limpieza de los equipos y utensilios de ordeña, la higiene del animal y del personal, debe ser lo más limpia posible. El agua puede ser una fuente importante de microorganismos psicrófilos (*Pseudomonas sp.*) y si ésta estuviera contaminada, de bacterias coliformes.

Suelo. Es la principal fuente de microorganismos termodúricos y termófilos. La leche nunca entra en contacto con el suelo pero sí los animales, utensilios y personal, de manera que es a través de ellos que los microorganismos telúricos (*Clostridium sp.*) pueden alcanzar a contaminar la leche. También se encuentran microorganismos coliformes como *E. coli*.

El ordeñador puede llegar a jugar un papel importante en la contaminación de la leche, sobre todo cuando la ordeña es manual. En el medio rural es frecuente observar como el personal encargado de la ordeña no se lava las manos y, peor aún, se las humedece en la misma leche para lograr lubricación que facilite la ordeña. Se ha señalado al ordeñador como responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos (*S. aureus*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus sp.*, *Leptospiras sp.*, etc.). Las heridas infectadas en manos y brazos pueden ser fuentes de algunos de estos microorganismos.

Estiércol. Es la fuente principal de microorganismos coliformes. Éstos pueden alcanzar la leche a través del animal o del ordeñador, así como también por medio de los utensilios mal higienizados.

Utensilios y Transporte. El contacto de la leche con el material de ordeña y su permanencia en los tanques y transporte, puede multiplicar por un factor de 2 a 50 la microbiota presente (Valbuena, 2007). Por lo tanto, es importante considerar la limpieza de todo el material o utensilios que estén en contacto con la leche cruda.

Durante años, se han aplicado técnicas que han sido probadas para reducir o eliminar a los microorganismos en las superficies de contacto con los alimentos. Estas técnicas incluyen métodos físicos (por ejemplo, el lavado de manos, uso de aerosoles de alta presión) y los métodos químicos (por ejemplo, hipocloritos, yodóforos, sales cuaternarias de amonio). Ambas técnicas eliminan y desactivan microorganismos que pueden estar en la superficie del equipo o utensilios, que entran en contacto con los alimentos crudos y procesados (Hoot y Zootola, 1995). Esta limpieza es importante para el control de la adherencia de los microorganismos a las superficies de contacto con la leche.

Biopelículas. Algunos microorganismos útiles y bacterias patógenas, como *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Escherichia sp.*, *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Mycobacteria*, tienen la capacidad de adherirse y crecer en los alimentos y/o en las superficies que están en contacto con ellos, formando biopelículas (Navia *et al.*, 2010). La prevención y el control de éstos, es importante porque dificultan y perjudican las operaciones y los procesos.

La mayoría estos microorganismos se pueden adaptar porque se adhieren a superficies con presencia de sustratos, que generalmente están contenidos dentro de una matriz orgánica polimérica de origen microbiano. Una biopelícula se considera como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida. Esta última, pueden ser superficies minerales, tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales (Navia *et al.*, 2010).

Estas biopelículas son una fuente potencial de contaminación bacteriana. El desarrollo de medidas higiénicas para facilitar la prevención y control de la contaminación en la industria de alimentos, especialmente la industria láctea, permite mantener los sistemas libres de biopelículas, tanto a nivel industrial como en pequeños ranchos.

Varios casos de formación de biopelículas se han documentado, por ejemplo, la presencia de biopelículas formadas por *Listeria monocytogenes* en el equipo de ordeña como una fuente de contaminación de los tanques contenedores en un rancho lechero. *Listeria monocytogenes* tiene la capacidad de formar biopelículas en materiales como el acero inoxidable, el caucho y el plástico y estos materiales se encuentran con frecuencia en equipo para el manejo de la leche, líneas de leche y en contenedores de leche (Latorre *et al.*, 2010).

El almacenamiento de la leche cruda a bajas temperaturas puede favorecer el desarrollo de *Pseudomonas sp.* El 50% de los psicrótofos en la leche cruda refrigerada pertenecen al género *Pseudomonas*, con *Pseudomonas fluorescens* como especie dominante. Se sabe que *Pseudomonas fluorescens* es capaz de formar biopelículas. Existen trabajos donde se ha analizado la asociación de éste, con algunas cepas de *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, para la formación biopelículas en leche cruda refrigerada (Kives *et al.*, 2005).

Otros psicrótofos que también se han aislado de la leche cruda pertenecen a los géneros *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Listeria sp.* y *Arthrobacter sp.*, también de la familia *Enterobacteriaceae* tales como *Hafnia alveri*, *Citrobacter freundii* o *Serratia liquefaciens* (Lafarge *et al.*, 2004).

Hasta la fecha la comunidad bacteriana de la leche cruda ha sido descrita por métodos microbiológicos clásicos, los cuales son generalmente largos, tediosos y sólo caracterizan una parte de la microbiota. Nuevas técnicas moleculares basadas en el análisis directo del ADN (o ARN) se han desarrollado para describir la dinámica microbiana en ecosistemas complejos. La mayoría de los métodos desarrollados son el poliformismo conformacional de cadenas sencillas de ADN (SSCP), la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

3.5. MADURACIÓN DEL QUESO

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

Estos microorganismos pueden provenir de dos grandes grupos: los iniciadores (BAL) y la microbiota secundaria (microorganismos que actúan posteriormente a la etapa de cuajado y que pueden ser, o no, adicionados intencionalmente).

Los microorganismos iniciadores *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* son utilizados individualmente o combinados, dependiendo de la variedad o tipo de queso, su producción de ácido contribuye a la conservación del producto y la generación de características de textura. Los microorganismos secundarios no contribuyen apreciablemente en la producción de ácido, pero generalmente cumplen un rol importante durante la maduración por la formación de compuestos de olor, sabor y color, entre otros. Esta microbiota secundaria esta compuesta por mezclas complejas de bacterias, BAL no iniciadoras, levaduras y hongos que crecen interna o externamente en el queso y son diferentes según el tipo de producto (Beresford *et al.*, 2001). Los cultivos iniciadores, junto con la microbiota secundaria que crece, se incorporan a lo largo del proceso de elaboración del queso, promueven una serie de reacciones bioquímicas que son importantes para el desarrollo del sabor y la textura del producto.

En algunos quesos como el Cheddar se recomienda la adición de lactobacilos no iniciadores (como *L. paracasei sp. paracasei* y *L. plantarum*), ya que los lactobacilos heterofermentativos iniciadores se hayan en bajas concentraciones en la leche cruda y no son suficientes para obtener una buena formación de sabor y olor en el queso (Marilley *et al.*, 2004).

En cambio, en la elaboración del queso Cotija no se adicionan cultivos iniciadores, además, es requisito estipulado por las Reglas de uso del queso Cotija auténtico, no agregar ningún tipo de cultivo a la leche (Álvarez *et al.*, 2005).

3.5.1. MICROBIOLOGÍA DE LA MADURACIÓN

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

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

-Cuajo. El cuajo usualmente contribuye con quimosina u otras enzimas proteolíticas. Algunos quesos de variedades italianas se inoculan con una pasta de cuajo que contribuye con proteasas y lipasas.

-Leche. La leche contiene alrededor de 60 enzimas diferentes, pero muy pocas tienen importancia en la maduración; éstas incluyen proteinasas, especialmente plasmina, lipasas, fosfatasa ácida y xantina oxidasa. Varias de éstas son estables al calor, por lo que mantienen su actividad completa o parcialmente después de la pasteurización. Otras están asociadas con las micelas de la caseína, se presentan en la membrana de los glóbulos de grasa o se incorporan en el cuajo al queso. Las enzimas presentes en el suero se pierden casi completamente por lo que su importancia en la maduración es muy baja.

-Cultivos iniciadores. Los microorganismos iniciadores proveen de una diversidad de enzimas. Éstas, aunque en baja concentración, son la principal contribución a la maduración.

-Microbiota secundaria. Muchas variedades de queso contienen diversos microorganismos secundarios, cuya función no es la producción de ácido, sino el desarrollo de sabor. Los microorganismos involucrados son bacterias ácido propiónicas, bacterias corineformes, levaduras y hongos, así como, BAL no iniciadoras que se van desarrollando en la leche, por ejemplo, lactobacilos mesófilos y algunos pediococos.

Durante la maduración los factores que controlan el crecimiento de los microorganismos en el queso incluyen: la a_w , la concentración de sal, el potencial de óxido-reducción, el pH, NO_3^- , la temperatura de maduración y la presencia o ausencia de bacteriocinas producidas por los iniciadores (Beresford *et al.*, 2001).

3.5.2. OTROS MICROORGANISMOS EN LA MADURACIÓN DEL QUESO

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

1. Producción de enzimas.
2. El consumo de ácido para la alcalinización de la superficie del queso.

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

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

Algunos otros grupos secundarios que se han encontrado en quesos son: *Arthrobacter sp.*, *Brechybacterium sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Microbacterium sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Pediococcus sp.*, *Micrococcus sp.* y *Staphylococcus sp.* Levaduras como, *Kluyveromyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp.*, etc, y mohos como *Penicillium candidum*, *P. camemberti* y *P. roqueforti*.

3.6. LIPÓLISIS

El desarrollo del sabor y olor en los quesos proviene, en gran parte, de la modificación de la grasa de la leche, pues se ha demostrado que en leches descremadas la falta de la grasa ocasiona un desarrollo de sabor escaso en el queso (Marilley *et al.*, 2004). La grasa en la leche puede ser oxidada o hidrolizada. La oxidación es limitada por el bajo potencial redox presente en el queso. Sin embargo, la lipólisis de los triglicéridos de la leche aporta altas concentraciones de ácidos grasos de cadenas cortas, los cuales son sustratos para diferentes reacciones bioquímicas, que contribuyen a generar sabores.

Los lípidos contribuyen al sabor del queso por tres vías:

- Son fuente de ácidos grasos, especialmente ácidos de cadena corta, los cuales tienen fuertes características de sabor. Los ácidos grasos son producidos a través de la acción de las lipasas en un proceso llamado lipólisis. En muchas variedades de quesos los ácidos grasos son convertidos en compuestos aromáticos y de sabor, especialmente metil cetonas y lactonas.
- Los ácidos grasos, especialmente los poliinsaturados, forman varios aldehídos insaturados que son fuertemente saborizantes y generan notas de rancidez. La oxidación es muy limitada en el queso por su bajo potencial redox (-250 mV).

-
- Los lípidos funcionan como disolventes para compuestos aromáticos y de sabor provenientes de la degradación de proteínas y lactosa, no solo de lípidos. (Fox *et al.*, 2000).

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

3.6.1. LIPASAS

Las lipasas son éster hidrolasas carboxílicas que rompen los enlaces éster de los acilglicéridos mediante la adición de una molécula de agua, dando lugar a ácidos grasos libres y glicerol. Las enzimas lipolíticas pueden ser clasificadas como estererasas (EC 3.1.1.1) o lipasas “auténticas” (EC 3.1.1.3). Éstas pueden ser distinguidas por tres principales características: la longitud de las cadenas de acil éster que hidrolizan, la naturaleza fisicoquímica de los sustratos y la cinética enzimática. Las lipasas “auténticas” son específicas para acilgliceroles y otros ésteres con ácidos grasos de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia, mientras que las carboxilesterasas actúan específicamente sobre acilgliceroles de cadena corta (< 10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar. Las estererasas hidrolizan sustratos solubles en soluciones acuosas, mientras que las lipasas hidrolizan sustratos emulsificados (Collins *et al.*, 2003).

Lactococcus sp. y *Lactobacillus* sp. tienen niveles bajos de actividad lipolítica en comparación con otras bacterias y hongos. *Micrococcus* constituye parte de la microbiota no iniciadora del queso, especialmente de la superficie, donde produce lipasas que contribuyen a la maduración del queso. También *Pediococcus* sp., incluido en la microbiota no iniciadora, tiene actividad esterolítica y lipolítica. Pero la lipólisis extensiva ocurre en presencia de los hongos y levaduras (Marilley *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que los géneros bacterianos de *Pseudomonas*, *Alcaligenes* sp., *Moraxella* sp. y *Staphylococcus* sp., así como, hongos de los géneros *Rhizopus* sp., *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp. y *Penicillium* sp., y levaduras como *Candida* sp., *Rhodotorula* sp. y *Hansenula* sp. son especies lipolíticas, microorganismos que producen lipasas de forma natural (Marilley *et al.*, 2004).

Los compuestos volátiles son principalmente los que aportan el perfil de aroma del producto y son de naturaleza muy variada. Se han identificado cientos de ellos, algunos de éstos se presentan en la Tabla 1. Los ácidos grasos de cadena corta tienen un impacto considerable en el sabor al producir aromas deseables, pero la lipólisis intensiva y desmedida puede causar problemas de rancidez en muchos tipos de quesos. Los ácidos grasos son sustratos de reacciones enzimáticas que producen compuestos de sabor. Por ejemplo, por la β -oxidación y descarboxilación se obtienen metil-cetonas y alcoholes secundarios y por esterificación de

hidroxiácidos se producen lactonas. Adicionalmente, los ácidos grasos pueden reaccionar con grupos alcohol y formar ésteres, tales como etilbutanato, etilhexanato, metildecanoato. Estas reacciones se resumen en la Figura 2.

El gusto y el aroma de quesos azules son dominados por la saturación de n-metil-cetonas. La concentración de estas metil-cetonas es relacionada a la lipólisis. Las lactonas son ésteres cíclicos resultado de la esterificación intramolecular de un hidroxiácido a bajas concentraciones de agua para formar una estructura de anillo (Collins *et al.*, 2003).

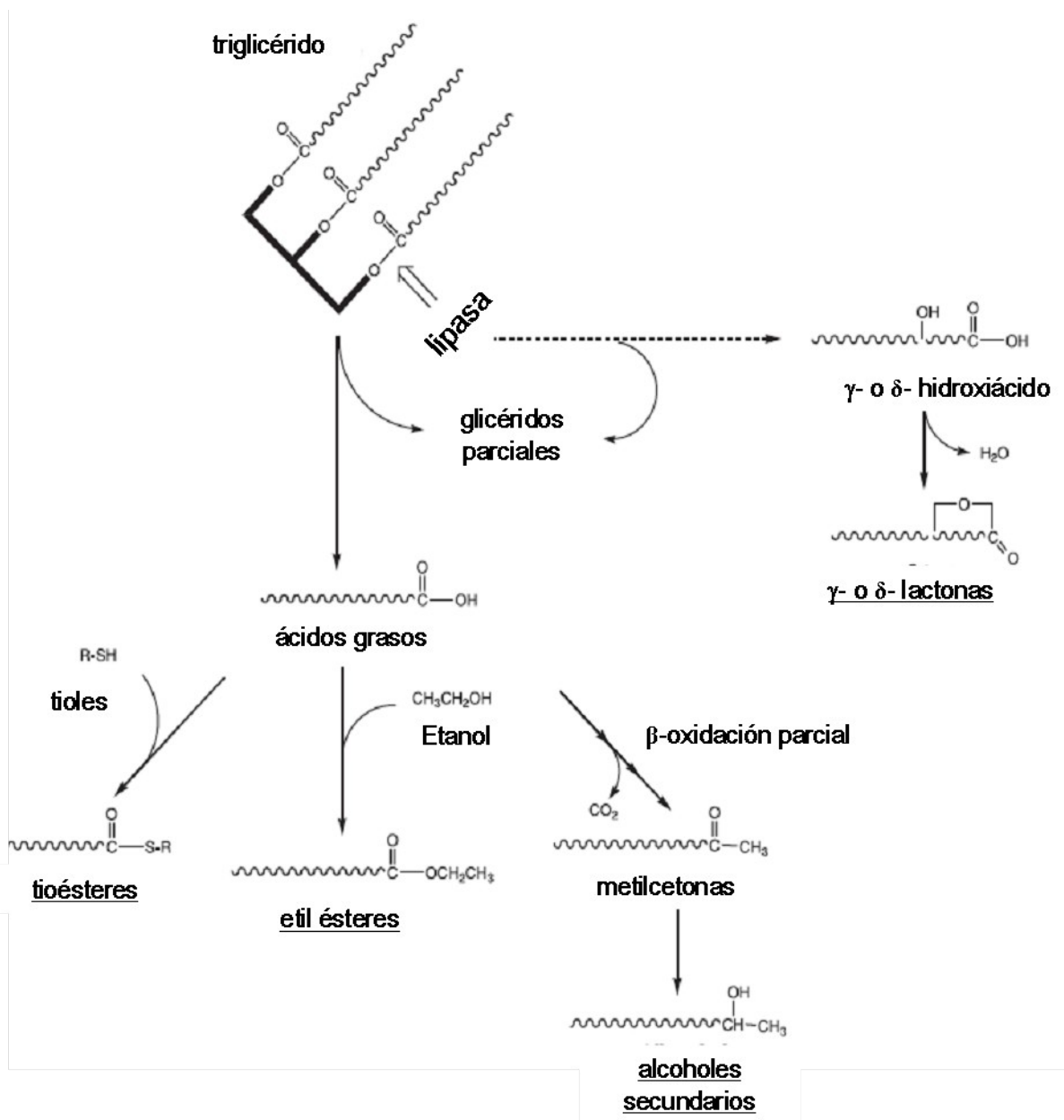


Figura 2. Principales reacciones bioquímicas que se presentan por la modificación de lípidos durante el proceso de maduración en quesos (Collins *et al.*, 2003).

Tabla 1. Compuestos de aroma aislados de varios quesos (Marilley *et al.*, 2004).

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

3.7. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS

La producción de alimentos en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la microbiota presente. Para productos tradicionales en los que no se añaden inóculos y que están constituidos por una microbiota compleja, como es el caso del queso Cotija, es difícil llegar a describirla mediante métodos convencionales. Existen diferentes alternativas para determinar la estructura microbiana de estos alimentos por métodos moleculares. Una de ellas es el empleo de metodologías que consisten en aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el análisis del ADN.

Por otro lado, se ha visto la necesidad de tomar en cuenta el ecosistema completo. Sabemos que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales. No es posible obtener cultivos puros de ciertos microorganismos porque dependen de las actividades de otros, o porque no se conocen las condiciones para su cultivo. En otros casos los microorganismos pierden la capacidad de

reproducirse, pero retienen su actividad metabólica. Otra hipótesis sugiere que las células se programan genéticamente para adaptarse a las condiciones adversas (como agotamiento de nutrientes, temperatura baja u otros tipos de estrés) y generan formas latentes (Díaz y Wachter, 2003). Por lo tanto, ha sido necesario incluir la detección de microorganismos no cultivables con métodos en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento y a partir de éstos se determina la diversidad microbiana.

Una de las técnicas eficientes y más utilizadas es la construcción de bibliotecas de clonas del gen ADNr 16S, la obtención de “huellas digitales” mediante DGGE o TGGE, técnicas con las que podemos analizar microorganismos cultivables y no cultivables.

3.7.1. DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN MEDIOS LIPOLÍTICOS

El aislamiento de microorganismos lipolíticos se basa en la actividad que tienen las lipasas, que puede ser determinada a través de la utilización de un medio de cultivo sólido que contenga el sustrato de la lipasa, que puede ser tributirina o trioleína incorporada en su formulación. La actividad de la lipasa es indicada por una aclaración (formación de halos alrededor de las colonias) del triglicérido opaco. El área o la zona de aclaramiento es proporcional a la actividad de la lipasa, aunque también influye la preparación del agar (Vanderzant y Splittstoesser, 1992). Para obtener un buen medio de crecimiento es importante que haya una buena emulsificación de la grasa añadida con los demás componentes.

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

La incubación de los medios de cultivo lipolíticos se hace desde los 20 °C hasta los 37 °C (según el grupo de microorganismos que se deseen aislar) por tres días, si el medio tiene tributirina como sustrato; y de 4 a 7 días, si se utilizaron otras grasas (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

3.7.2. ESTUDIO DE MICROORGANISMOS POR MÉTODOS MOLECULARES

Muchos de los métodos moleculares para la clasificación e identificación de cepas cultivables están basados en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación de un fragmento de ADN específico, tal como regiones variables del gen del ADNr, seguido de un análisis de restricción (ARDRA) son muy utilizados para obtener información para la clasificación dentro de los niveles de especie y subespecie de determinado microorganismo.

Aislamiento del ADN

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

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

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

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

3.8. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA MEDIANTE LA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS

Las relaciones evolutivas entre los organismos y la identificación de grupos microbianos podrían ser establecidas idealmente comparando las secuencias nucleotídicas de sus genomas; sin embargo, en análisis a esta escala sería impráctico, pero pueden ser inferidas mediante la comparación de secuencias de genes individuales. Se utilizan entonces ciertas moléculas que funcionan como cronómetros evolutivos (indicadores de cambios evolutivos).

Esta molécula debe estar distribuida universalmente en el grupo que se desea estudiar y debe ser funcionalmente homóloga en cada organismo. Los genes que codifican para el ARN ribosomal son los más utilizados. Esto se debe a que estas moléculas son funcionalmente constantes, tienen una baja tasa de mutación, se encuentran distribuidas universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos. En el caso de los procariontes, el ADNr 16S (que contiene aproximadamente 1500 nucleótidos) es el más utilizado y el ADNr 26S o ADNr 18S para eucariontes (Díaz y Wachter, 2003).

3.8.1. PCR-DGGE

Para el análisis de la diversidad microbiana de un queso maduro artesanal, el cual es un sistema microbiológico complejo, un método cultivo-independiente podría dar una visión más amplia de su composición, debido al hecho de que no todos los microorganismos son capaces de crecer bajo las condiciones experimentales. La amplificación de una secuencia conservada, en una región variable del ADN, permitiría realizar la identificación de las especies. El gen

ribosomal 16S bacteriano es el marcador filogenético mayormente utilizado para la diferenciación de especies de comunidades complejas. Tiene la característica de ser altamente conservado, pero a la vez contiene regiones hipervariables. El tamaño del gen es aproximadamente de 1500 pb. Su tamaño limita su uso en la aplicación de algunas técnicas moleculares como el DGGE. La opción es amplificar las regiones hipervariables de este gen, como la V3 y V1, y en algunos casos la región V6, V8 y V9, que ofrecen una buena diferenciación para fines taxonómicos. La región V3 del gen ADNr 16S bacteriano es la más hipervariable y la que ha demostrado mayor diferenciación entre especies (Zogahan y Morris, 2004). Luego de la amplificación de dicha región a partir del ADN extraído de una comunidad microbiana, con un análisis de DGGE de estos amplicones podemos obtener información de la diversidad de la población microbiana. La técnica de electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (DGGE), ha sido una herramienta comúnmente utilizada (Ercolini, 2004).

La PCR-DGGE es empleada para conocer la estructura de comunidades en muestras complejas y para determinar la dinámica de comunidades, en respuesta a variaciones que ocurren en éstas. Es capaz de proporcionar huellas de una comunidad bacteriana en una muestra después de la extracción directa de ADN (Ercolini, 2004). Esta mezcla de ADN es usada como molde para la amplificación por PCR de regiones variables particulares de interés taxonómico, donde se obtienen productos de amplificación que son una mezcla de amplicones de las especies presentes en la muestra inicial. Todos los amplicones tienen el mismo tamaño pero diferentes secuencias y pueden ser separados por DGGE (Muzyer, 1993; 1999).

Varios pares de cebadores, denominados universales han sido empleados para amplificar regiones variables como la ADNr 16S para bacterias y la ADNr 26S o ADNr 18S para eucariontes. Diferentes grupos de trabajo que analizaron muestras de salsas fermentadas, productos lácteos, agua mineral, whisky, vino y leche, han utilizado cebadores para la amplificación de diferentes regiones del gen 16S, preferentemente la región V3 (Ercolini, 2004).

PCR

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

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a zonas específicas de la región que se quiere amplificar. Generalmente, se eligen cronómetros evolutivos que están conformados por regiones altamente conservadas, por lo que son un blanco fácil para llevar a cabo la reacción de PCR. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la

síntesis *in vitro* del ADN, la cual está habitualmente catalizada por una DNA polimerasa termoestable (Entrala, 2000).

DGGE

La electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (DGGE) es un método electroforético para detectar mutaciones que pueden ser de algunas bases de un segmento de ADN. Es un método capaz de detectar diferencias entre fragmentos del mismo tamaño pero con diferentes secuencias (Muzyer, 1999; Kirk *et al.*, 2004). Es un método independiente de cultivo que permite separar fragmentos de ADN, previamente amplificados por PCR, de la misma longitud sin llegar a ser mayor a 500 pb, ya que dificultaría la separación de éstos en los geles de acrilamida. Esta técnica de electroforesis fue descrita primeramente por Fischer y Lerman (Ercolini, 2004). En un gel de acrilamida con gradiente desnaturizante, las cadenas dobles del ADN son sometidas a un incremento de concentración de desnaturizante y forman segmentos discretos llamados “dominios de fusión”. La temperatura de fusión (T_m) de esos dominios es secuencia-específica.

Cuando la T_m ha alcanzado un valor más bajo que el del dominio de fusión, las hebras del ADN se abren parcialmente, creando moléculas ramificadas. La fusión parcial del ADN reduce su movilidad en un gel de poliacrilamida. La presencia de una mutación podrá alterar el perfil de fusión del ADN comparado con la cepa silvestre. Si los fragmentos están completamente desnaturizados, entonces la migración llega a ser una función del tamaño.

En el DGGE, el ambiente desnaturizante es creado por una combinación de temperatura uniforme, comúnmente entre 50 y 65 °C y un gradiente lineal desnaturizante generado con urea y formamida. Una solución al 100% de desnaturizante químico consiste de urea 7 M y formamida al 40%. Se preparan soluciones de bajas y altas concentraciones de desnaturizante, se mezclan con la solución de acrilamida y son vertidos en el gel de forma que se genere un gradiente desnaturizante lineal. El gradiente desnaturizante puede ser formado en dirección perpendicular o paralela a la electroforesis.

En un gel con gradiente perpendicular a la corriente eléctrica, comúnmente se usa un rango de gradiente desnaturizante de entre 0-100% o 20-70%. En los geles de gradientes perpendiculares, sólo puede ser cargada una muestra o una mezcla de amplicones y se usa para elegir el gradiente óptimo que se utilizará en los geles paralelos (Figura 3).

En un DGGE paralelo, el gradiente desnaturizante es paralelo al campo eléctrico y los rangos de desnaturizante son cortos, permitiendo una mejor separación. Los geles paralelos son los más comúnmente utilizados porque permiten cargar varias muestras en el mismo gel. El tiempo óptimo de electroforesis para una buena separación de los fragmentos puede ser

determinado experimentalmente cuando se cargan las diferentes muestras en un gel paralelo a intervalos constantes de tiempo

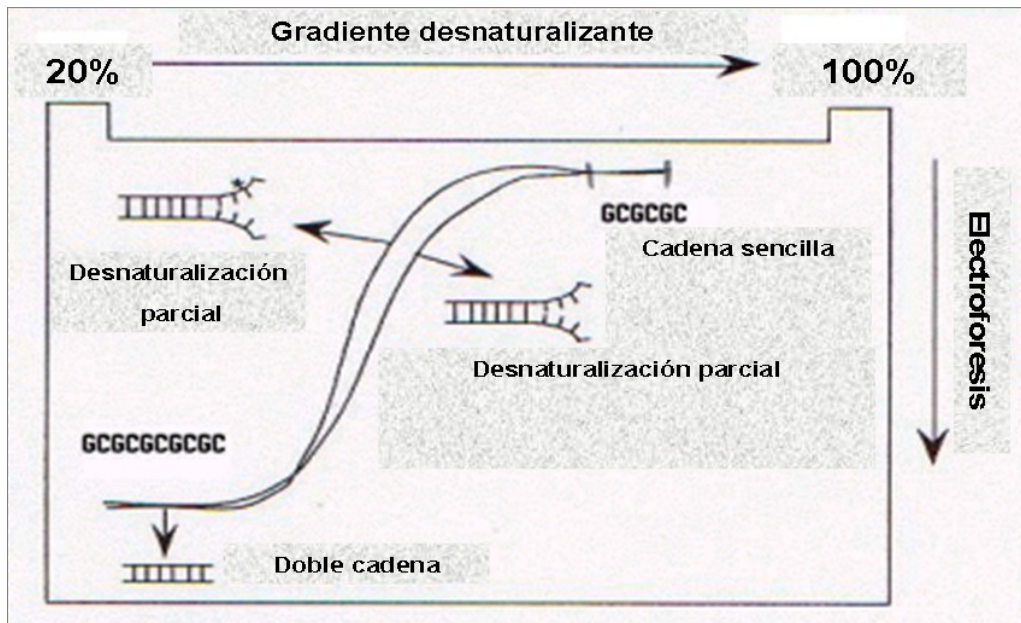


Figura 3. Esquema que ejemplifica lo que sucede en un Gel perpendicular de DGGE.

Los fragmentos que pueden ser cargados en geles de DGGE son usualmente productos de PCR. La adición de una grapa (CG) de 30 a 40 pb en uno de los cebadores, asegura que los fragmentos de ADN permanezcan parcialmente desnaturalizados. Lo que favorece una resolución óptima y evita que se salgan del gel (Kirk *et al.*, 2004).

El uso de cebadores y grapas GC pueden ser optimizados según el análisis de perfiles de fusión para cada tipo de muestra. Las bandas en el DGGE pueden ser reveladas por una solución de bromuro de etidio o una solución de plata. También se puede usar SYBR Green I, como un método alternativo para la visualización de las bandas en los geles de DGGE.

INTERPRETACIÓN DE PATRONES DEL DGGE.

Se ha observado que la formación de heterodúplex (asociación de cadenas sencillas de moléculas diferentes de ADN) durante la amplificación, dificulta la interpretación de patrones del DGGE o TGGE. Éstos pueden ser reducidos utilizando en la reacción de PCR menor fuerza iónica, concentraciones de cebadores menores, mayores temperaturas de asociación y disminuyendo el número de ciclos de amplificación.

Es posible que ocurra una co-migración de fragmentos de ADN (dos amplicones de diferentes microorganismos corren a la misma posición en un gel de DGGE), que provocaría la subestimación de la diversidad microbiana y la dificultad para extraer secuencias para su identificación. También se puede presentar el fenómeno de microheterogeneidad en las

secuencias de algunos genes (la visualización en un gel de DGGE de más de una banda que pertenece a un solo microorganismo), que llevaría a la sobreestimación de la diversidad presente en la muestra (Díaz y Wacher, 2003).

Por otro lado, se requiere tener una combinación de información fenotípica y genómica cuando se desea una correcta descripción y clasificación de alguna comunidad bacteriana. Aunado a lo anterior un análisis filogenético permitirá un estudio con mayor confiabilidad. En el caso del DGGE, el análisis de los patrones obtenidos puede aportar información sobre la distribución de los individuos en una comunidad compleja. La amplificación de bandas individuales de DGGE permite conocer la identidad de los microorganismos y la realización de análisis filogenéticos que nos permitan obtener información evolutiva sobre la microbiota de estudio (Pontes *et al.*, 2007).

El creciente almacenamiento de secuencias moleculares en bases de datos electrónicas permite que se puedan realizar numerosos análisis filogenéticos. Se pueden utilizar programas para analizar secuencias que hayan sido comparadas en una base de datos como lo es el BLAST. Además de software que permitan el alineamiento y las construcción de árboles filogenéticos con las secuencias obtenidas, que aumentan la confiabilidad de la identificación.

4. JUSTIFICACIÓN

Se pretende conocer a los microorganismos lipolíticos presentes durante etapas críticas y sus posibles puntos de inoculación durante el proceso de elaboración del queso Cotija, para responder preguntas como:

- ¿De dónde provienen?
- ¿Cuándo se incorporan?
- ¿Cuáles se mantienen?
- ¿Cuáles se pierden?

El objetivo de contestar estas preguntas será conocer el origen e identificar algunos de los microorganismos responsables de la formación de compuestos de olor y sabor del queso durante la maduración. Esto nos dará un panorama más detallado sobre la microbiota responsable de las características de este queso artesanal mexicano.

5. HIPÓTESIS

-Al no haber adición intencional de cultivos iniciadores, la incorporación de la microbiota lipolítica que participa en la maduración del producto, será en etapas como la ordeña y el salado.

-Si los quesos de dos regiones productoras distintas (Jalisco y Michoacán) tienen características sensoriales muy semejantes, entonces la microbiota contenida en los quesos será semejante e independiente de la región.

6. OBJETIVO GENERAL

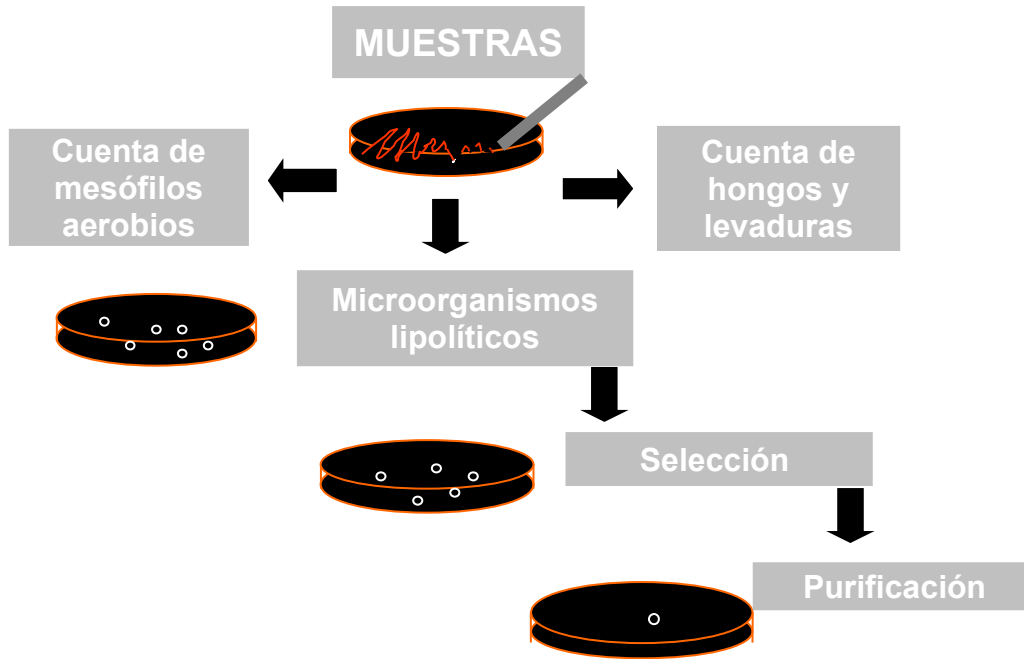
Analizar la microbiota lipolítica presente en diferentes etapas de elaboración del queso Cotija e identificar a los que están presentes en las primeras etapas de maduración del producto.

OBJETIVOS PARTICULARES

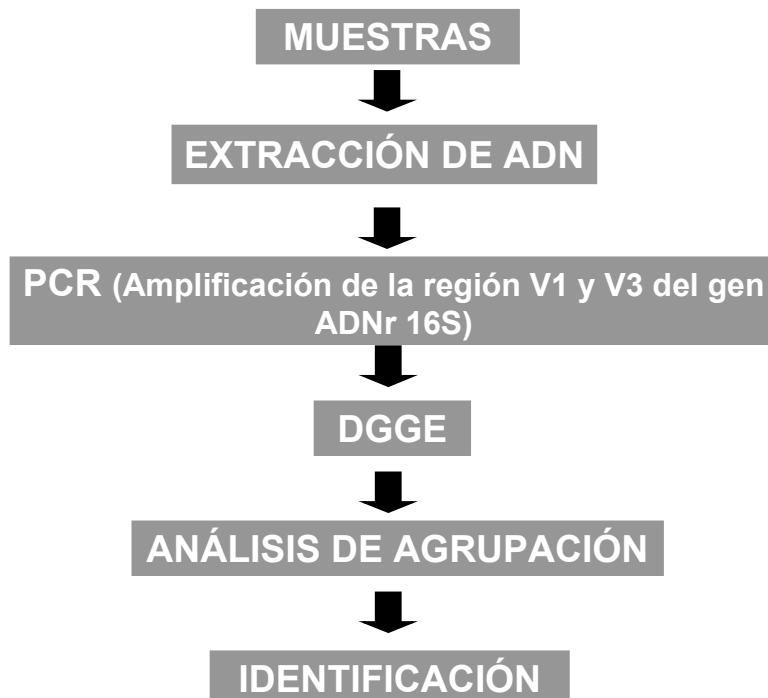
- Analizar a los microorganismos indicadores en muestras de dos regiones productoras de queso Cotija auténtico, en Michoacán y Jalisco.
- Aislar, purificar y seleccionar colonias de microorganismos con actividad lipolítica, de cada etapa crítica del proceso de elaboración.
- Identificar por secuenciación de bandas obtenidas por la técnica de DGGE:
 - Microorganismos lipolíticos cultivados (ADN aislado de cultivos puros).
 - Microorganismos del ADN aislado directamente del alimento.
- Describir los cambios de poblaciones entre cada etapa y determinar qué tipo de población con actividad lipolítica estaría presente durante la maduración del queso.
- Comparar la población de microorganismos lipolíticos entre ambas regiones.

7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL

Primera parte: Microbiología.



Segunda parte: Métodos moleculares.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de dos regiones productoras del queso Cotija auténtico Región de Origen, de los estados de Jalisco y Michoacán.

Los dos ranchos visitados fueron:

1. Santa María del Oro, Jalisco (**J**). De los productores Audón Sánchez y Cruz Chávez.
2. La Tinaja, Michoacán (**M**). Del productor José Vargas.

Durante una visita de campo, se observó todo el proceso de elaboración del Cotija en cada rancho. Iniciando con la ordeña y hasta el prensado del queso (Figura 1). Las muestras recolectadas de cada rancho fueron las siguientes:

- Superficie del pezón de vaca (U). Se obtuvieron muestras de la superficie de un pezón de la vaca, en un momento previo a la ordeña. La muestra se tomó con ayuda de tres hisopos estériles humedecidos con agua peptonada estéril al 0.1%. Las vacas muestreadas fueron de raza Cebú.
- Leche Bronca (LB). Una vez terminada la ordeña, la leche obtenida de todas las vacas se junto en tinas grandes y se mezcló. Las muestras de leche bronca se tomaron justo antes de la adición del cuajo. El tiempo transcurrido entre la ordeña y la adición del cuajo fue de aproximadamente tres a cuatro horas.
- Tina o mesa de amasado (A). Se realizó el muestreo de superficies de las tinas de amasado (utilizadas para desmoronar y salar la cuajada). Se eligieron áreas de 10 cm x 10 cm, y con ayuda de un hisopo estéril se recabaron las muestras, segundos antes de ser utilizadas (mientras se encontraban limpias).
- Sal de grano marina (S). Se recolectaron 50 g de sal de grano del mar de Colima en bolsas estériles de los ranchos en estudio. Se utilizó sal de grano a granel.
- Cuajada sin sal (C). En bolsas estériles, se colectaron las muestras de cuajada fresca, antes de ser desmoronada y salada.
- Cuajada salada (CS). Las muestras se obtuvieron después de que la cuajada se desmoronó y salió manualmente, también en bolsa estériles.

Se obtuvieron las seis muestras descritas anteriormente, para cada rancho visitado. La mezcla de la leche fue obtenida de vacas de las razas cebú y suizas (o europeas) en su mayoría, pero también había algunas vacas Simental y Holstein de doble propósito (para la producción de leche y carne).

Todas las muestras fueron inmediatamente almacenadas a 4 °C. Se transportaron de igual forma desde Michoacán hasta el Distrito Federal. Después fueron almacenadas a -20 °C.

8.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las cuentas microbiológicas de bacterias mesófilas, hongos y levaduras se realizaron conforme a las Normas Oficiales Mexicanas para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en todas las muestras, con excepción de las muestras de sal. Todas las diluciones se realizaron de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994, utilizando agua peptonada al 0.1% (p/v).

El análisis microbiológico de las muestras de leche bronca, superficie del pezón de la vaca y superficie de la mesa se llevó a cabo el mismo día en que se obtuvieron las muestras.

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

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

La dilución primaria (10^{-1}) se realizó tomando 10 g de queso en 90 mL de agua peptonada al 0.1% (p/v), de ésta se realizaron diluciones decimales con agua peptonada al 0.1% (p/v). Las diluciones se prepararon por duplicado. La inoculación de las cajas se realizó por extensión de superficie en el medio agar cuenta en placa por triplicado, adicionando un volumen de 150 μ L de cada dilución (10^{-1} - 10^{-6}). Las cajas se incubaron a 37 ± 1 °C por 48 horas.

Se obtuvo el número de UFC/g de muestra. Para la expresión de los resultados se tomaron en cuenta cajas con colonias aisladas de entre 25 y 250 colonias.

Hongos y levaduras. Técnica basada en la NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

El método se basa en inocular una cantidad conocida de la muestra prueba, en un medio selectivo, acidificado a pH 3.5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1 °C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

La dilución primaria (10^{-1}) se realizó tomando 10 g de queso en 90 mL de agua peptonada al 0.1% (p/v), de ésta se realizaron diluciones decimales con agua peptonada al 0.1% (p/v). Las diluciones se prepararon por duplicado. La inoculación de las cajas se realizó por superficie en el medio Agar papa dextrosa acidificado por triplicado, adicionando un volumen de 150 μ L de cada dilución (10^{-1} - 10^{-6}). Las cajas se incubaron a 25 ± 1 °C por 5 días.

Se obtuvo el número de UFC/g de muestra. Para la expresión de los resultados se tomaron en cuenta cajas con colonias de entre 10 y 150 colonias para hongos.

En todos los casos se utilizaron medios de cultivo de la marca Oxoid, de Ontario, Canadá.

8.3. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Las colonias lipolíticas fueron detectadas por la hidrólisis de tributirina en medios sólidos de agar, como se describe a continuación:

Se partió de las mismas diluciones realizadas para el análisis microbiológico y se inocularon medios selectivos para la detección de actividad lipolítica. El medio de cultivo utilizado fue *agar tributirina* estandarizado en el laboratorio (García, 2006). Los microorganismos con actividad forman un halo claro alrededor de la colonia, indicativo de la hidrólisis de tributirina. Una vez detectadas las colonias con actividad, se aislaron y purificaron en el mismo medio. La siembra se realizó por agotamiento hasta la obtención de colonias aisladas.

Para el análisis de la sal marina, se realizó un pre-enriquecimiento de 7 y 15 g de sal en 100 ml caldo nutritivo (Oxoid, Ontario, Canada), a 37 °C por 12 horas con agitación. Después del término del tiempo de incubación, se realizaron diluciones decimales con agua peptonada al 0.1% (10^{-2} - 10^{-4}) de donde se obtuvo el inóculo para la detección de lipolíticos.

Las colonias de interés para el estudio se conservaron en chaquiras como se describe en el Anexo 4, posteriormente fueron almacenadas a -80 °C.

8.4. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Todas las colonias aisladas se caracterizaron microscópicamente, utilizando una tinción de Gram para clasificar a las colonias bacterianas. Se utilizó un microscopio marca Olympus CX31 con interfase a la computadora (Olympus U-CMAD3).

La tinción se realizó en cultivos jóvenes de 20-24 horas de crecimiento.

8.5. EXTRACCIÓN DE ADN

Durante el estudio se probaron tres métodos de extracción de ADN de colonias lipolíticas puras. Las metodologías se describen a continuación:

Método A (Smit *et al.*, 2001).

1. Cultivar por 12 horas o hasta que crezca, procurando que sea a saturación.
2. Centrifugar en micro centrífuga a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante.
3. Agregar 150 μ L de solución SET (sacarosa 8% (p/v), EDTA 0.05 M, Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0). Mezclar en vórtex hasta resuspender el paquete celular.
4. Añadir 150 μ L de solución de lisis (NaOH 0.4 N y SDS 2%, 1:1), agitar por inversión.
5. Incubar 15 minutos a ebullición (baño María).

6. Centrifugar 15 minutos en centrifuga eppendorf a temperatura ambiente. Colectar el sobrenadante.

7. Finalmente, agregar 100 μ L de agua destilada estéril.

Método B. Extracción de ADN con fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (García, 2006).

- *Para bacterias.* Las colonias puras crecidas en medio sólido de agar tributirina para la extracción se tomaron como se indica abajo:

Colocar en un tubo eppendorf de 1.5 mL (limpio y estéril), una cantidad de colonias igual en tamaño a un grano de arroz y seguir el procedimiento de extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), descrito en el Anexo 1.

Método C. Kit de extracción de ADN, FAST ID (Genetic-ID, IA, U.S.A.).

La extracción del ADN de las colonias puras se realizó de la siguiente manera:

Brevemente, las células fueron mezcladas con el buffer de lisis (Fast-Lyse) y proteinasa K y se incubó en un tubo de 15 mL por 30 minutos a 37 °C. Se agregó cloroformo, se mezcló en un vórtex y después se centrifugó por 15 minutos. Una alícuota de 0.9 ml de la fase superior fue tomada y mezclada con 0.9 ml del buffer de unión (Fast-Bind). La mezcla fue centrifugada por 7 minutos y el sobrenadante obtenido se pasó a través de una columna con membrana de sílica con afinidad al ADN. La columna fue lavada con un buffer de lavado (Fast-Wash) y después con una solución de etanol al 75% (v/v). El exceso de etanol fue eliminado por centrifugación y el ADN fue suspendido en buffer TE.

El protocolo detallado se muestra en el Anexo 2, descrito de acuerdo al fabricante.

La extracción y concentración del pellet de células obtenido directamente de las muestras de alimento, como leche cruda y cuajadas, se realizó solo con el kit de extracción FAST ID. Para ello, se realizaron los siguientes tratamientos previos:

- Para cuajadas:

Se pesaron 7 g de cuajada y adicionaron 25 mL de citrato de sodio al 2% p/v (ajustado a un pH de 7.8). La mezcla se homogeneizó en un Stomacher (Stomacher 400 circulator, Seward, NY, U.S.A.). La solución se pasó a un tubo Falcon de 50 mL (estéril) y se agitó. Después, se adicionaron 250 μ L de una solución de Neutrasas (Neutrased, Novo Nordisk, D.F., México), la mezcla se incubó a 45 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó por 5 minutos a 3,600 rpm (centrífuga con rotor JA-20, marca BECKMAN). Al término, se transfirió el sobrenadante a un tubo para centrifuga de 50 mL estéril (sin grasa) y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. El pellet obtenido se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se

resuspendió con 500 μL de una solución salina al 0.85% (p/v) para lavarlo. Finalmente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el pellet en un tubo eppendorf estéril.

Para leche cruda:

En un tubo para centrífuga de 50 mL (estéril), se agregaron 40 ml de leche cruda y 300 μL de una solución de Neutrasas. La mezcla se agitó y posteriormente se incubó a 45 °C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos a 2,000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio (en este momento se realizó la separación de la grasa y proteínas), después se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. El pellet recuperado se transfirió a un tubo eppendorf estéril. Para el análisis se utilizó una centrífuga con rotor JA-20, marca BECKMAN.

Las muestras de ADN extraído por los tres diferentes métodos fueron visualizadas mediante una electroforesis en gel horizontal de agarosa al 1.5% (p/v), en buffer 1x Tris-Acetato-EDTA (TAE), teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y visualizados en un transiluminador UV, marca ColePalmer. En cada pozo se cargaron: 2 μL de buffer de carga y 8 μL del ADN extraído, utilizando un marcador de peso molecular O'RangeRuler 50 pb (Fermentas).

8.6. CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación del ADN extraído se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm, usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV160U UV/visible) y celdas de cuarzo de 50 μL . Para ello, se realizaron diluciones con agua destilada estéril. La concentración del ADN obtenido se estimó considerando que el valor de $A_{260} = 1.0$ corresponde a 50 ng/ μL de doble cadena de ADN.

Ejemplo:

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

$$0.45 A_{260 \text{ nm}} * \frac{50 \mu\text{g} / \text{mL}}{1 A_{260 \text{ nm}}} * \frac{100}{1} = 2,250 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ de ADN} = 2,250 \text{ ng}/\mu\text{L} \text{ de ADN}$$

Con la relación 260 nm/280 nm se relacionó la cantidad de ADN en comparación a la de proteína presente, como un indicativo de la calidad de las muestras, esperando una relación por arriba de 1.8 para ADN puro.

También se midió la absorbancia a 230 nm para verificar la ausencia de contaminantes orgánicos como fenol, otros compuestos aromáticos o algún reactivo utilizado en la extracción de ADN que pudiera absorber a esas longitudes.

Se obtuvo la relación 260 nm/230 nm con la que se relacionó la cantidad de ácido nucleicos respecto a la cantidad de compuestos orgánicos que pudieran estar presentes en las muestras de ADN total extraído. Es recomendable que esta relación sea mayor a 1.8 para asegurar resultados óptimos y obtener muestras libres de contaminantes que pudieran ser inhibidores de la PCR.

8.7. REACCIÓN DE PCR

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando 200 ng de ADN por reacción en el caso de microorganismos puros y 250 ng de ADN en muestras de alimento, con 1.25 U de la ADN polimerasa *Pfu* (Fermentas Inc., MA, U.S.A.) por reacción.

Se realizó la amplificación de las regiones V1 y V3 del gen ADNr 16S para las bacterias lipolíticas aisladas.

- Para la amplificación de la región V3, se utilizaron los cebadores universales 338f con una grapa de GC (marcada en negritas) y 518r, con las siguientes características:

PRIMER	SECUENCIA	POSICIÓN	REGIÓN	APLICACIONES EN ALIMENTOS
338f clamp	5' C GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC 3'	338-357	V3 del gen ribosomal 16S	Utilizado en productos lácteos, agua mineral y productos fermentados (pozol).
518r	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	518-534		

(Ampe *et al.*, 1999; Ercolini, 2004)

Las condiciones y los componentes de la reacción se encuentran detallados en el Anexo 3. Al final de la reacción se obtuvieron amplicones de aproximadamente 220 pb.

- Para la amplificación de la región V1, se utilizaron los cebadores gamma (γ) y pA con las siguientes características:

PRIMER	SECUENCIA	POSICIÓN	REGIÓN	APLICACIONES EN ALIMENTOS
pA	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	9-28	V1 del gen ribosomal 16S	Utilizado en productos lácteos.
gamma	5'ACT GCT GCC TCC CGT AGG AG 3'	558-339		

(Pascual, 1999)

Las condiciones y los componentes de la reacción se encuentran detallados en el Anexo 3. Al final de la reacción se obtienen amplicones de aproximadamente 350 pb para bacterias.

Todas las reacciones se corrieron en un Techne PCR machine (TC-312, Techne, Cambridge, England). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v) comparados frente a un marcador de peso molecular O'RangeRuler 50 bp (Fermentas). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y visualizados bajo luz UV.

Los fragmentos obtenidos de la amplificación de la región V3 del gen ADNr 16S de colonias puras y de ADN extraído directamente del alimento fueron utilizados para el análisis molecular de DGGE. Mientras que los fragmentos que resultaron de la amplificación de la región V1 de colonias puras fueron destinadas para secuenciación.

8.8. ANALISIS MOLECULAR: DGGE

El análisis de DGGE de los amplicones de PCR fue realizado en el Dcode™ Universal Mutation equipment (BIORAD, CA, U.S.A.). Las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 37:5:1) al 8% (p/v) en buffer TAE 0.5X. La resolución óptima de los amplicones fue con un gradiente desnaturante de 30-70% urea-formamida, incrementado en dirección de la electroforesis. Un 100% de agente desnaturante corresponde a 7M de urea y 40% (v/v) de formamida. La electroforesis se corrió a 85 V y a una temperatura de 60 °C durante 16 horas.

Optimización del gradiente desnaturante

En trabajos anteriores se realizó la optimización del gradiente, por medio de un gel con gradiente desnaturante perpendicular al campo eléctrico, que permitió establecer el intervalo de desnaturación óptimo para la región V3 del gen que codifica a la molécula 16S del ADN ribosomal de las bacterias extraídas del queso Cotija. Se observó una óptima separación de bandas en un gradiente de 30-70% de solución desnaturante, compuesta por urea y formamida (Zúñiga, 2009).

Separación de bandas en geles paralelos

Los productos de PCR de las muestras de alimento y colonias puras, se corrieron en geles de poliacrilamida al 8% y el incremento del gradiente desnaturizante se realizó en dirección a la electroforesis (en geles paralelos). La electroforesis se llevó a cabo con las siguientes condiciones: temperatura de 60 °C, 85 volts por 16 horas.

En cada pozo se cargaron 10 µL del producto de PCR (del ADN extraído de alimentos o colonias puras) + 10 µL del buffer de carga para DGGE. La concentración de ADN cargado en cada pozo fue de aproximadamente 1 µg/ µL.

Las bandas fueron teñidas y visualizadas con el Plus One DNA Silver Staining Kit (Pharma Biotech, GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, U.K.) (Anexo 5). La digitalización de los geles se realizó con el software QUANTITY ONE y el análisis se realizó con el Diversity Data Base, ambos de BIORAD, para determinar la dominancia relativa y el análisis de agrupamiento.

Recuperación del ADN obtenido en bandas individuales

Se seleccionaron bandas y se cortaron del gel con ayuda de agujas estériles. Éstas se resuspendieron en 50 µL de agua estéril grado biología molecular (pH 8.0). El ADN fue eluido del gel después de incubar una hora a 37 °C y después toda una noche a 4 °C. El ADN se recuperó en el sobrenadante y se centrifugó a 6,000 rpm durante 3 minutos, después se concentró dos veces por centrifugación a vacío. Se obtuvo un volumen final de entre 15-20 µL. El ADN recuperado fue reamplificado con los cebadores 338f y 518r, como se describió anteriormente (Anexo 3), para su posterior secuenciación.

8.9. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Los productos de PCR reamplificados se purificaron usando el High Pure PCR Product Purification kit (ROCHE Applied Science, IN, U.S.A.), al final se resuspendieron en agua grado biología molecular.

La pureza de los productos de PCR se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v). Se cargaron 5 µL de producto de PCR + 2 µL de buffer de carga. Se comparó el tamaño del amplicón utilizando un marcador de peso molecular "Mass Ruler DNA ladder Mix.", Fermentas (103 ng/µL).

Las bandas fueron secuenciadas en MACROGEN Co., Seoul, Korea. Se utilizaron como cebadores para la secuenciación el 338f, 518r, gamma y pA en una concentración de 5 µM.

Las secuencias parciales ADN_r 16S se analizaron con el BLAST para determinar su identidad. La herramienta de alineación está disponible en el National Center for Biotechnology Information, en su página web: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se mencionan algunas diferencias observadas en los procesos de elaboración del Cotija, durante una visita realizada a los ranchos queseros estudiados y su comparación con lo establecido en la Norma Mexicana sobre prácticas de higiene recomendadas para la obtención de leche y con lo establecido en las Reglas de uso.

9.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Al realizar el conteo de microorganismos mesófilos y lipolíticos se observó la aparición de colonias bacterianas con crecimiento extendido, lo que dificultó el conteo de las colonias en algunos medios.

En la Tabla 1, se muestran los resultados de las cuentas microbiológicas de mesófilos aerobios hallados en cada una de las muestras analizadas de las regiones de Jalisco y Michoacán. Los microorganismos aerobios mostraron una mayor población en la leche bronca (**LB**) proveniente de la región de Michoacán (**M**), en comparación a la de Jalisco (**J**), con cuentas de 10^7 y 10^4 UFC/mL, respectivamente. Con lo anterior, se pudo evidenciar la calidad de la leche de cada rancho, ya que el tiempo de reposo que pasa la leche antes del cuajado es favorable para el crecimiento de estos microorganismos. Se observó que a pesar de que la leche del rancho **J**, pasó más tiempo en condiciones ambientales antes de cuajar, tuvo una menor cuenta de mesófilos. Por lo que la mayor cuenta obtenida en muestras provenientes de **M**, se debe a las prácticas de higiene deficientes durante la ordeña y al almacenaje de la leche durante la etapa de reposo.

En las cuentas microbiológicas de mesófilos aerobios de los pezones de las vacas (**U**) y tinas de amasado (**A**), también se observó diferencia entre las muestras de Jalisco (**J**) y Michoacán (**M**). Las cuentas fueron mayores en las muestras de (**M**), para ambos casos. Lo anterior, debido a las prácticas higiénicas que se manejaron durante cada proceso.

Para el caso de las muestras de la superficie del pezón (**U**), las diferencias en las cuentas obtenidas corresponden a lo observado principalmente en la limpieza de los pezones de las vacas y en la higiene de las manos del ordeñador. En el rancho **J**, la persona a cargo realizó la limpieza de los pezones con un trapo limpio y se lavó las manos, antes del iniciar la ordeña. Mientras que en **M**, no hubo suficiente limpieza en estos dos aspectos (como se explica en la Tabla 1). Esto se reflejó en una cuenta mayoritaria de mesófilos aerobios y con la presencia de levaduras halladas sólo en muestras del rancho **M**.

Tabla 2. Observaciones de las visitas a los Ranchos queseros.

Etapas de proceso	Rancho de Jalisco (J)	Rancho de Michoacán (M)	NMX-F-730-COFOCALEC-2008. / Reglas de uso.
ORDEÑA	Limpieza de los pezones de la vaca con un trapo limpio, previa a la ordeña	Limpieza deficiente de los pezones de vaca que presentaban suciedad	Lavado de la ubre antes de la ordeña
	Se observaron manos limpias del ordeñador	No se observó un lavado de manos previo a la ordeña	Lavado de manos con agua y jabón
	La persona que ordeña es diferente a la que guía las vacas	La persona que ordeña es diferente a la que guía las vacas	La persona que ordeña es diferente a la que guía las vacas
REPOSO	Recepción de la leche en botes de acero inoxidable con tapa	Recepción de la leche en cubetas de plástico.	Recipientes de acero inoxidable con tapa para almacenar la leche
	El tiempo de reposo fue de aprox. 4 horas	El tiempo de reposo fue de aprox. 3 horas	Menor tiempo posible entre ordeña y cuajado
CUAJADO	En tinas de plástico	En cazos de cobre	Tinas de acero inoxidable
CORTADO	Utensilio: cuchillo limpio y esterilizado en agua hirviendo	Utensilio: cuchara de madera limpia	Utensilio: liras de acero inox. o utensilios limpios
	Cortes pequeños y uniformes	Cortes gruesos y heterogéneos	Cortes pequeños del tamaño de un grano de maíz.
DE-SUERADO	Uso de cedazos limpios esterilizados en agua hirviendo.	Uso de coladera de plástico	Uso de cedazos limpios ó drenar o sacar el suero con un recipiente limpio.
	La cuajada termina de desuerar sobre una tina de amasado de acero inox.	La cuajada termina de desuerar sobre una tina de amasado de acero inox.	La cuajada termina de desuerar en una artesa de madera o tina de acero inoxidable.
	El lavado de la tina se realizó con jabón y luego se enjuagó con agua hirviendo	El lavado de la tina se realizó con el suero obtenido del mismo proceso	Etapas de limpieza y posterior desinfección del equipo.
DES-MENUZADO	Manual	Manual	Manual
	Lavado de manos	No se observó un lavado.	Lavado higiénico de las manos del operario.
SALADO	Sal en grano a granel	Sal de grano de Colima	Sal de grano de Colima

En Jalisco, la superficie de la tina de amasado (A) arrojó una cuenta de 10^3 UFC/cm², mientras que en la de Michoacán se obtuvieron 10^4 UFC/cm² de mesófilos aerobios. Esto se debe al tipo de lavado previo de las tinas de amasado. Se realizó con agua hirviendo en el caso del rancho **J** y con suero lácteo, obtenido del mismo proceso, para el caso del rancho **M**.

Con lo que respecta a las muestras de cuajada fresca (**C**), se obtuvieron cuentas de 10^7 y 10^8 UFC/g de mesófilos, para los ranchos **J** y **M**, respectivamente. Las cuentas aumentan en comparación a las obtenidas en leche bronca (LB) debido a la concentración de sólidos para la obtención de la cuajada fresca. A pesar de eso, las muestras de Michoacán siguen manteniendo una mayor cuenta comparada con la de Jalisco, así como, la presencia de levaduras. Cabe resaltar que los utensilios usados en las etapas de corte y desuerado fueron esterilizados caseramente en agua hirviendo, únicamente en el proceso del rancho **J**.

Las muestras de cuajada salada (**CS**) fueron obtenidas justo después de la etapa de salado manual, en algunos casos las muestras de cuajada seguían desuerando, por lo que, para el análisis microbiológico se utilizó únicamente el sólido lácteo sin contemplar el suero presente.

La cuajada salada reúne toda la microbiota incorporada durante las etapas de la ordeña, reposo, amasado y salado, incluyendo la que proviene de la manipulación del operario, de la sal y de los utensilios usados.

Las cuentas de mesófilos aerobios fueron de 10^7 UFC/g, en muestras de cuajada salada de ambas regiones. Hubo una reducción de casi un orden de magnitud de estos microorganismos indicadores en la muestra de **CS** con respecto a las cuentas obtenidas en la cuajada sin salar (**C**).

Las levaduras estuvieron ausentes en todas las muestras de **J**, mientras que en las de **M**, fueron halladas cuentas de 10^3 y 10^4 UFC/g en **C** y **CS**, respectivamente. También se halló crecimiento de levaduras en el análisis microbiológico de los pezones de la vaca y tina de amasado de la misma región (Tabla 3). Por lo tanto, la incorporación de levaduras a la cuajada salada puede ocurrir durante el cuajado y/o durante el salado y amasado de la cuajada.

No hubo crecimiento de hongos en ninguna de las muestras de ambas regiones, a excepción de las muestras tomadas del pezón de la vaca procedentes del rancho **M**, donde se observó una cuenta de 3,900 UFC/pezón. Al final del proceso, se obtuvieron muestras de cuajada salada que no presentan crecimiento de hongos, una característica de este tipo de queso. Además, de que el contenido de sal puede llegar a inhibir el crecimiento de hongos.

TABLA 3. CUENTAS MICROBIOLÓGICAS

MESÓFILOS AEROBIOS			LEVADURAS	
Muestra	Jalisco (J)	Michoacán (M)	Jalisco (J)	Michoacán (M)
LB UFC/mL	6.8X10 ⁴	*1.5X10 ⁷	-	-
C UFC/g	2.8x10 ⁷	2.4x10 ⁸	-	4.6x10 ³
CS UFC/g	2.0x10 ⁷	4.3x10 ⁷	-	1.3x10 ⁴
U UFC/pezón	*N.D.	1.9X10 ⁵	-	3x10 ³
A UFC/cm ²	*1.3X10 ³	3.4X10 ⁴	-	185

* Presencia de colonias con crecimiento extendido.

- No hubo crecimiento de colonias.

N.D. No se pudo determinar la cuenta exacta. **L.B:** leche bronca, **C:** cuajada, **CS:** cuajada salada, **U:** superficie del pezón, **A:** superficie de la tina de amasado.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que el lavado eficiente de los pezones de la vaca, de todos los utensilios y del equipo utilizado para la elaboración del queso artesanal, reduce considerablemente la carga microbiana incorporada al producto, donde probablemente se encuentra la microbiota no deseada. Sin embargo, en estas etapas también se encuentran los que participarán en la maduración. Por lo tanto es importante saber que parte de microbiota no patógena participa en la maduración y establecer las prácticas higiénicas adecuadas que deben respetar los productores en este proceso artesanal.

La NOM-121-SSA1-1994 para quesos frescos, madurados y procesados, considera que las cuentas de hongos y levaduras deben ser menores de 500 UFC/g. Esta norma mexicana aplica para quesos elaborados con leche pasteurizada, por lo que se espera contar con una mayor cuenta microbiana en un producto que no ha llevado algún tratamiento térmico durante su proceso.

Finalmente, de este análisis podemos decir que la cuajada salada y desmoronada llega a la etapa de moldeado sin la presencia de hongos, pero aún con una elevada cuenta de bacterias

mesófilas y algunas levaduras que se irán modificando por la pérdida de humedad y la concentración de sólidos que ocurre durante la maduración.

9.2. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

En todas las muestras analizadas se encontró crecimiento de colonias bacterianas con actividad lipolítica en agar tributirina (Figura 4). La presencia de colonias con crecimiento extendido halladas en algunas cajas, dificultó el conteo de las colonias de la misma forma en que ocurrió con los mesófilos aerobios. En la Tabla 4, se observan las cuentas de microorganismos lipolíticos o en su defecto, la dilución máxima en la que se observaron colonias que presentaban actividad.

TABLA 4. CUENTA DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Muestra	Jalisco (J)	Michoacán (M)
LB UFC/mL	$^{*}10^3$	9.7×10^6
C UFC/g	$^{*}10^3$	$^{*}10^3$
CS UFC/g	$^{*}10^4$	$^{*}10^4$
U UFC/pezón	$^{*}10^2$	1.3×10^3
A UFC/cm ²	6.6×10^2	2.0×10^3

*Presencia de colonias con crecimiento extendido.

^Dilución máxima en la que se observan colonias aisladas con actividad lipolítica.

L. B: leche bronca, **C:** cuajada, **CS:** cuajada salada, **U:** superficie del pezón,

A: superficie de la tina de amasado.

Se observó una mayor cuenta de microorganismos lipolíticos en las muestras de leche bronca (**LB**) provenientes del rancho de Michoacán (**M**) con 9.7×10^6 UFC/mL. No se logró obtener la cuenta exacta de las colonias lipolíticas halladas en las muestra de **LB** para la región de Jalisco (**J**), pero se observó la aparición de colonias con actividad en cajas inoculadas hasta la dilución correspondiente a 10^3 . En muestras de **CS** provenientes de ambos ranchos, se observó la aparición de colonias lipolíticas en cajas inoculadas hasta la dilución de 10^4 .

Los resultados muestran la presencia de microorganismos lipolíticos en todas las etapas analizadas y la dificultad hallada durante el conteo. Lo que indica que la determinación de la etapa de incorporación de los lipolíticos al proceso puede ser complicada.

En trabajos previos se analizaron muestras de queso Cotija con diferentes estados de maduración y se lograron aislar levaduras con una alta actividad lipolítica (García, 2006; Martínez, 2009). Por ese antecedente, se esperaba encontrar levaduras lipolíticas en alguna de las diferentes etapas del proceso de los dos ranchos analizados. En los resultados no se detectaron levaduras en ninguna de las muestras del rancho J, mientras que en las del rancho M, se observó crecimiento de levaduras pero ninguna con actividad lipolítica. lo que lleva a pensar que posiblemente las levaduras lipolíticas que participan en la maduración del Cotija se incorporan en etapas tardías de la maduración, cuando el queso tiene una mayor acidez y hay menor competencia por los nutrientes.



Figura 4. Halos de actividad de colonias lipolíticas en Agar tributirina.

Por otra parte, se analizaron muestras de la sal de grano usada en la etapa del salado de la cuajada. El análisis tenía como fin comprobar si la sal es una fuente de inoculación de microorganismos lipolíticos. Para esto, se elaboraron dos medios con caldo nutritivo a dos diferentes concentraciones de sal marina (7% y 15%). La primera es la concentración máxima aproximada a la que pueden llegar los quesos, después de un largo tiempo de maduración y la segunda, es una concentración a la que crecen microorganismos halófilos moderados. (Inmaculada Meseguer, 2004). Los medios fueron incubados a 37 °C por 12 horas con agitación para crecer la microbiota viable. De estos cultivos se realizaron diluciones decimales y se inocularon en medios selectivos de Agar con tributirina. El experimento se realizó en las

muestras de sal obtenida de ambos ranchos. Al término del análisis, se observó el crecimiento de bacterias lipolíticas a partir de las diferentes concentraciones de sal. Las cuentas de lipolíticos viables en la muestra de sal del rancho **J**, fueron de 1.3×10^3 y 1.2×10^7 UFC/g, en medios con 7% y 15 % de sal, respectivamente. Mientras que en la sal del rancho **M**, se obtuvieron 1×10^6 y 1.8×10^6 UFC/g, a las mismas concentraciones.

En la muestra de Jalisco, las cuentas de lipolíticos fueron mayores cuando el medio tenía el 15% sal. Este hecho es relevante, ya que se esperaba una reducción en la microbiota lipolítica a esta concentración, debido a que una mayor concentración de sal en el producto incrementa la presión osmótica del medio impidiendo el crecimiento de algunos microorganismos y la inactivación de enzimas (como algunas lipasas). Para el caso de las procedentes del rancho **M**, se obtuvieron cuentas del mismo orden logarítmico, a las dos concentraciones de estudio. Estos resultados confirman la presencia de microbiota halófila moderada con actividad lipolítica. Por lo tanto, la adición de sal de grano a la cuajada puede contribuir a la incorporación de microorganismos lipolíticos viables, así como a la inhibición en el crecimiento de otros. Por lo citado anteriormente, se espera un cambio en la microbiota lipolítica presente en la cuajada fresca y la salada.

9.3. PURIFICACIÓN DE COLONIAS LIPOLÍTICAS

A partir de todas las muestras analizadas, se aislaron aproximadamente 120 colonias con actividad lipolítica. Se purificaron por agotamiento hasta obtener colonias aisladas en el medio sólido de Agar tributirina. En muchos casos fue difícil obtener colonias puras, pues a pesar de observar una sola colonia, al realizar la tinción de Gram se encontraban varias morfologías. Debido a eso, se realizaron varias resiembras hasta que se obtuvieron puras. Durante este periodo, se observó que el tiempo de crecimiento de algunos microorganismos incrementaba conforme se realizaba un mayor número de resiembras. La mayoría de los microorganismos lipolíticos aislados presentaron actividad, aún almacenados a temperaturas de refrigeración (4 °C).

9.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Las 120 colonias aisladas fueron elegidas por tener entre sí, diferente morfología colonial y diferente tamaño en los halos de actividad obtenidos, en los medios sólidos de Agar con tributirina. Se eligieron 10 colonias por muestra. Con la identificación de la morfología microscópica, solo 60 colonias fueron elegidas para el análisis molecular. En la Tabla 5, se describen las morfologías observadas con la tinción de Gram realizada a cada colonia lipolítica.

Los microorganismos aislados de las muestras de leche bronca (**LB**) de ambos ranchos, fueron bacterias con diversidad en su morfología y Gram. En muestras de **U** y **A**, se hallaron cocos Gram positivos y algunos bacilos cortos Gram negativos; sin embargo, en la cuajada salada

(CS) se observó el predominio de microbiota Gram positiva. La mayoría con una morfología de cocos agrupados. En las muestras de sal no se obtuvo crecimiento de levaduras. Se aislaron microorganismos Gram positivos (bacilos largos y bacilos cortos) y una colonia Gram negativa.

De los microorganismos lipolíticos aislados de C y CS de ambos ranchos, se observó que la mayor parte de la microbiota fue Gram positiva, con la presencia de algunos bacilos Gram negativos y sin crecimiento de levaduras. Por esta razón, el resto del trabajo se enfoca exclusivamente al análisis de la población bacteriana lipolítica.

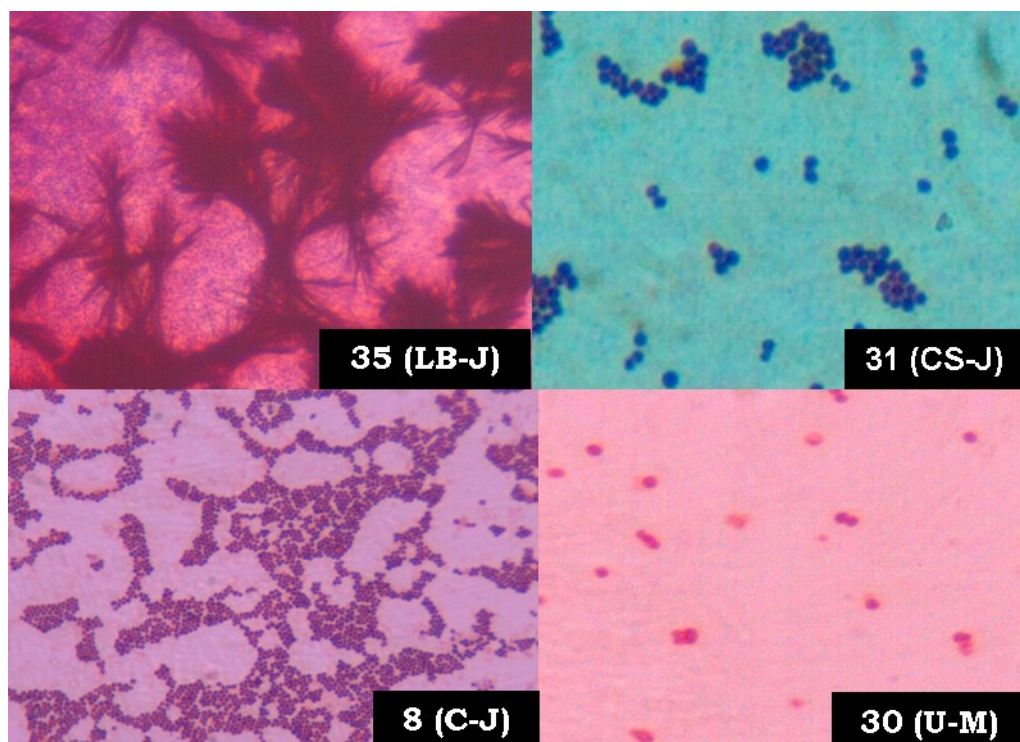


Figura 5. Morfología microscópica de algunos microorganismos lipolíticos aislados.

TABLA 5. MORFOLOGÍA Y GRAM DE COLONIAS LIPOLÍTICAS AISLADAS

Col.	Morfología	GRAM	MUESTRA-RANCHO	Col.	Morfología	GRAM	MUESTRA-RANCHO
1	Bacilos	+	LB-M	33	Cocos agrupados	+	CS-J
2	Bacilos cortos	+	LB-M	34	Cocos agrupados	+	CS-J
3	Cocos	+	U-M	35	Estructuras ramificadas	ND	LB-J
4	Cocos agrupados	+	U-M	36	Cocos agrupados	+	C-M
5	Cocos agrupados	+	U-M	37	Bacilos	+	A-J
6	Cocos agrupados	+	LB-M	38	Diplococos	+	CS-J
7	Bacilos	+	A-J	39	Bacilos	+	LB-M
8	Cocos agrupados	+	C-J	40	Bacilos cortos	+	A-J
9	Cocos agrupados	+	C-M	41	Bacilos largos	+	S-M
10	Diplococos	+	CS-M	42	Bacilos largos	-	S-J
11	Cocos agrupados	+	LB-J	43	Bacilos largos	+	S-M
12	Diplococos	+	U-M	44	Bacilos largos	+	S-J
13	Diplococos	+	A-J	45	Bacilos	+	S-J
14	Diplococos	+	C-M	46	Bacilos largos	+	S-M
15	Diplococos	+	C-M	47	Bacilos largos	+	S-M
16	Cocos agrupados	+	U-J	48	Bacilos cortos	+	S-J
17	Cocos agrupados	+	LB-M	49	Bacilos	+	S-M
18	Diplococos	+	U-M	50	Bacilos largos	+	S-M
19	Cocos agrupados	+	U-J	51	Bacilos cortos	+	S-M
20	Cocos agrupados	+	CS-M	52	Diplococos	+	C-M
21	Cocos agrupados	+	LB-J	53	Bacilos cortos	+	C-J
22	Cocos agrupados	+	A-M	54	Bacilos cortos	+	CS-M
23	Cocos agrupados	+	A-M	55	Cocos agrupados	+	C-J
24	Cocos agrupados	+	A-M	56	Diplococos	+	CS-M
25	Bacilos cortos	-	A-M	57	Diplococos	+	CS-M
26	Cocos agrupados	+	A-J	58	Bacilos cortos	+	CS-J
27	Bacilos	+	A-M	59	Cocos	+	A-M
28	Cocos	+	A-J	60	Cocos agrupados	+	LB-J
29	Cocos agrupados	+	LB-J	61	Diplococos	+	U-M
30	Cocos	-	CS-J	62	Cocos	+	A-M
31	Cocos agrupados	+	CS-J	63	Cocos	+	A-J
32	Cocos agrupados	+	U-M				

ND. No determinado.

Nota: Algunos microorganismos lipolíticos aislados y purificados fueron conservados en perlas de vidrio a -60°C , como se indica en el anexo 4.

9.5. EXTRACCIÓN DE ADN

Se evaluaron tres métodos para la extracción de ADN en cantidad y con la calidad necesaria para el análisis molecular, éstos se describen en la sección de Material y Métodos.

El método A, se descartó al no obtener bandas de alto peso molecular de ADN total extraído. Sólo se observaron bandas de bajo peso molecular (por debajo de 50 pb), visualizadas por electroforesis en geles de agarosa. Seguramente ADN degradado, atribuible al tratamiento con NaOH proveniente del buffer de extracción y al tiempo en que las muestras son sometidas a ebullición.

Con el método de fenol-cloroformo-isoamílico (método B), se logró obtener una buena cantidad y calidad en el ADN genómico extraído de los microorganismos lipolíticos. En la Figura 6, se observan bandas de alto peso molecular sin presencia de algún barrido indicativo de contaminación por proteína.

El método de fenol-cloroformo resultó ser adecuado pero demasiado largo para el análisis. Por lo anterior, se probó el kit de extracción de ADN, FAST ID. Con éste se obtuvo ADN genómico de buena calidad teniendo como ventaja la posibilidad de manipulación de un mayor número de muestras en menor tiempo. Además, resultó ser adecuado para obtener ADN total de muestras de leche y cuajada, las cuales se consideran complejas por el contenido de grasa presente.

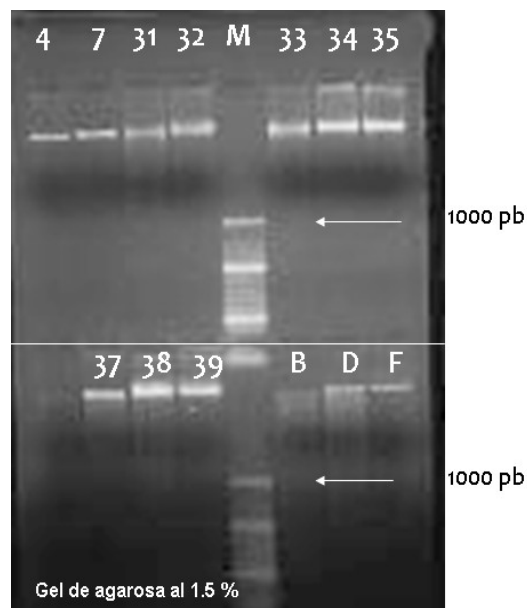


Figura 6. ADN extraído de cepas puras por el método de fenol-cloroformo: carriles 4 y 7.
Extracción con el kit FAST ID: carriles del 31 al 39.

En la Tabla 6, se presentan algunos resultados de la comparación en la cuantificación de ADN total extraído de colonias puras por el método B y C. Al calcular la relación 260/280 se obtuvieron valores arriba de 1.8 en todas las muestras de ADN extraído con el método de fenol cloroformo, mientras que las obtenidas con el kit Fast ID, en la mayoría de los casos se encontraban con valores por debajo del 1.8. Sin embargo, al visualizar las bandas en los geles de agarosa, se observó bandas limpias y de con buena cantidad (Figura 6).

Tabla 6. Comparación de ADN genómico extraído con los Métodos B y C.

Colonia/ muestra	A 230	A 260	A 280	260/280	260/230	[ADN ng/μl]
22 (A – M)	0.471	0.756	0.398	1.90	1.60	188.87
22 (A - M)	0.239	0.196	0.104	1.89	0.82	49.62
23 (A – M)	0.281	0.422	0.147	1.97	1.50	105.6
23 (A – M)	0.397	0.279	0.179	1.78	0.71	69.9
28 (A – J)	0.278	0.289	0.215	1.83	1.04	72.3
28 (A – J)	0.349	0.269	0.157	1.50	0.77	67.3

Datos sombreados: Método de fenol: cloroformo (Método B)

Datos sin sombreado: Kit Fast ID (Método C).

A-M = muestras de la superficie de la tina de amasado en Michoacán.

A-J = muestras de la superficie de la tina de amasado en Jalisco.

Los valores obtenidos al calcular la relación 260/280 para el ADN extraído con el kit Fast ID (colonias 23 y 28, Tabla 6), se deben a la presencia de un componente en uno de los reactivos del kit, que absorbe a longitudes cercanas a las de estudio (dato proporcionado por proveedor).

Lo anterior, se comprobó calculando la relación 260/230. Esta relación debe resultar mayor a 1.8 para descartar presencia de contaminantes orgánicos que pudieran ser inhibidores de la PCR. Todas las muestras obtenidas están por debajo del 1.8 recomendado. Los valores obtenidos con el kit fueron los más bajos, indicativo de una mayor presencia de estos contaminantes.

Los moldes de ADN obtenidos con el kit de extracción se probaron amplificándolos por PCR. No se presentó ningún tipo de inhibición de la reacción y se obtuvieron amplicones con los tamaños esperados.

9.6. PCR

Se estandarizaron las condiciones para la reacción de PCR y se amplificó la región V3 del ADN ribosomal para las colonias bacterianas seleccionadas. En la Figura 7, se muestran los amplicones obtenidos de la PCR provenientes de ADN obtenido de bacterias aisladas, muestras de leche y cuajadas.

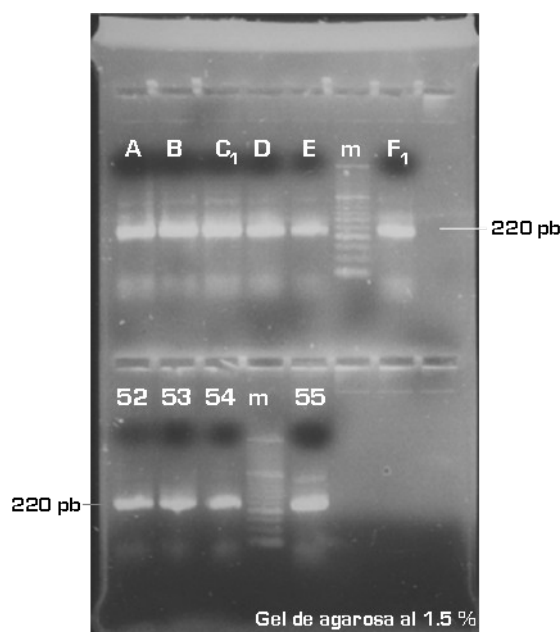


Figura 7. Productos de PCR obtenidos de la amplificación de la región V3 en muestras de leche y cuajadas (A, B, C, D, E y F), y de microorganismos lipolíticos aislados de diferentes muestras (marcados con números). Las flechas indican el tamaño de los amplicones.

En todos los casos se observaron bandas de aproximadamente 220 pb, como se esperaba. También aparecieron bandas con un peso molecular por debajo de 50 pb que correspondían a los cebadores que no reaccionaron posiblemente por una dimerización entre ambos.

Para minimizar ese efecto, se llevó a cabo un tratamiento previo para los cebadores antes de ser agregados a la mezcla de reacción: calentar a 70 °C por 10 minutos y enseguida enfriar. Con esto se eliminaron las bandas observadas por debajo de 50 pb.

Por otra parte, se estandarizaron las condiciones de la PCR para obtener los amplicones de la región V1 del gen ribosomal 16S de las colonias lipolíticas aisladas y seleccionadas para secuenciación. En la Figura 8, se observan las bandas obtenidas y visualizadas en geles de

agarosa al 1.5%. El tamaño de las bandas fue de aproximadamente de 350 pb, como se esperaba al utilizar los cebadores pA y gamma.

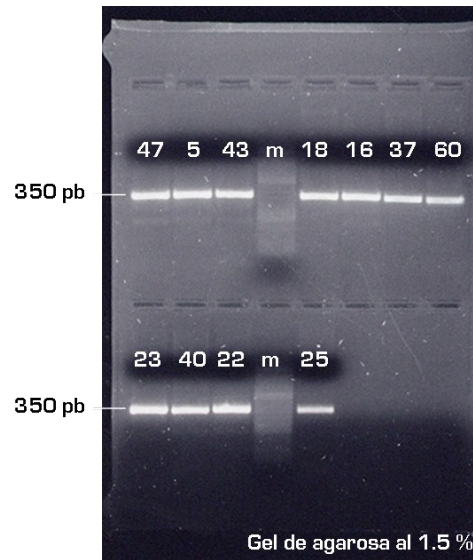


Figura 8. Productos de PCR obtenidos de la amplificación de la región V1 de microorganismos lipolíticos aislados de las diferentes muestras (marcados con números).

Los amplicones obtenidos de la región V3 se utilizaron para todo el análisis molecular de DGGE y algunas bandas obtenidas fueron seleccionadas para su secuenciación como se menciona más adelante.

Por otra parte, la amplificación de la región V1 solo se realizó al ADN extraído de las colonias lipolíticas aisladas de las muestras de cuajada salada (**CS**), con el fin de obtener su identidad por secuenciación y compararla con la obtenida de las bandas de DGGE (región V3). Estas dos son regiones hipervariables del gen ribosomal 16S, que nos proporcionarán mayor información taxonómica y una mayor región secuenciada, ver Figura 9.

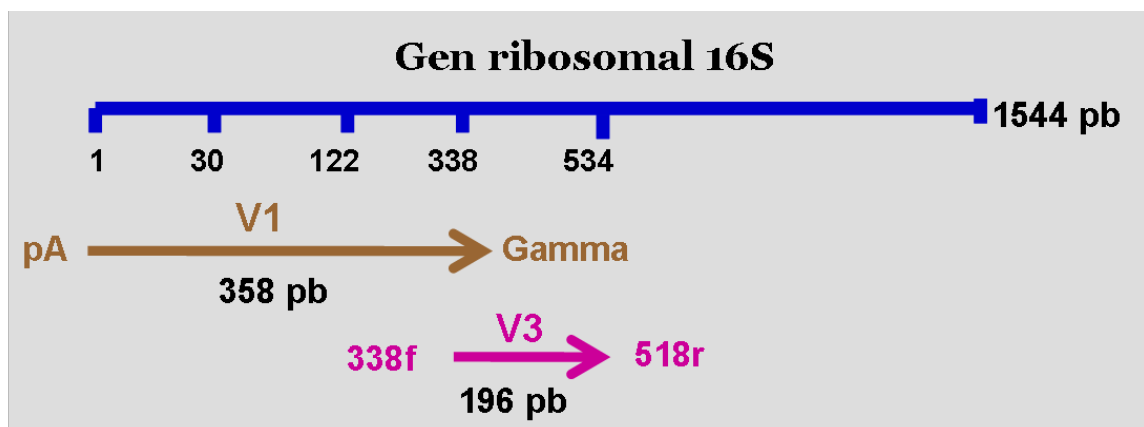


Figura 9. Regiones V1 y V3 del gen ribosomal 16S amplificadas con los cebadores (pA-gamma) y (338f-518r) respectivamente.

9.7. DGGE

El análisis de PCR-DGGE se realizó para las muestras de alimento **LB**, **C** y **CS** de ambas regiones productoras, **J** y **M**. Todos los geles de acrilamida se corrieron utilizando un gradiente desnaturalizante de 30-70%, concentración que permitió la separación y visualización de las bandas. Los patrones de DGGE se observan en la Figura 10.

El número de bandas obtenidas revela una comunidad bacteriana compleja. El análisis digital del gel es mostrado en la Figura 11a. Para **J**, el número de bandas observadas en **LB**, **C** y **CS** son 23, 23 y 13, respectivamente. En el caso de **M**, el número de bandas fue 21, 21 y 15. Estos resultados indican mayor diversidad en la leche cruda y en la cuajada fresca, en comparación con la cuajada salada, considerando que cada banda representa un sólo microorganismo.

Por lo tanto, entre la obtención de la muestra **C** y la **CS** se lleva a cabo un paso importante durante el proceso de elaboración del queso, que provoca una reducción del número de individuos presentes en la muestra salada. Además, aparecen nuevas bandas, es decir, los microorganismos cambian (Figura 10).

Para realizar el análisis de similitud de los patrones de DGGE obtenidos, se realizó un análisis de agrupamiento por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) como se observa en la Figura 8b. El resultado del análisis mostró que el patrón y la cantidad de bandas de **LB** son similares a las de **C**, en ambos casos, para las muestras de **J** y **M**. Esto indicaría que los microorganismos presentes en la leche podrían estar presentes en la cuajada fresca. En cambio, en el caso de las cuajadas saladas, **CS-M** y **CS-J**, se observa que se sitúan en clusters diferentes con respecto al de las cuajadas frescas correspondientes, indicando que el patrón de bandeo es diferente. Estos resultados muestran que los pasos de amasado y salado manual son relevantes para cambiar el ambiente microbiano en el producto.

Muchos grupos de investigadores, han utilizado la PCR-DGGE como una metodología para el análisis de comunidades microbianas en quesos artesanales (Randazzo *et al.*, 2002 y 2006). Los resultados que obtuvimos, concuerdan con los suyos, en términos de la similitud que hay entre leche bronca y la cuajada. Sin embargo, en sus estudios no observan una gran diferencia en la comunidad microbiana después del salado. En el proceso de elaboración de los productos que estudiaron, el salado de los quesos es hecho por inmersión en una salmuera concentrada, mientras que en el queso Cotija, el salado es realizado manualmente con sal marina de grano. En consecuencia, puede haber incorporación de microorganismos en este paso.

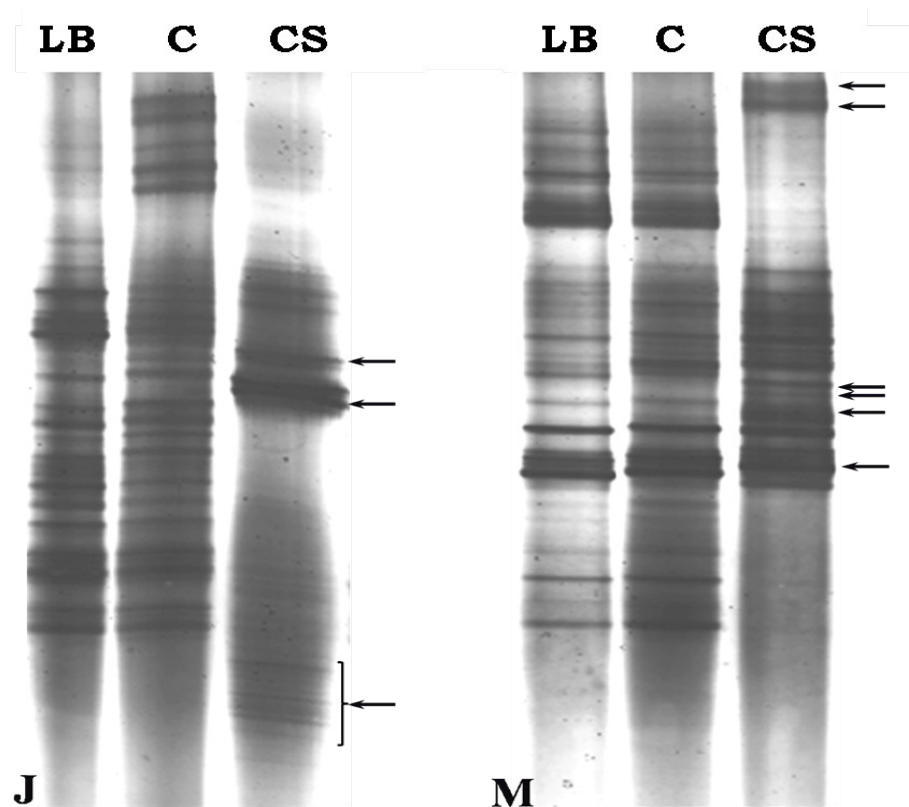


Figura 10. Gel con gradiente desnaturalizante (30-70%). Las muestras analizadas proceden de dos ranchos productores: Jalisco (**J**) y Michoacán (**M**). Carriles: **LB**, Leche bronca; **C**, Cuajada fresca; **CS**, Cuajada salada. Las flechas indican las bandas que aparecen después del salado.

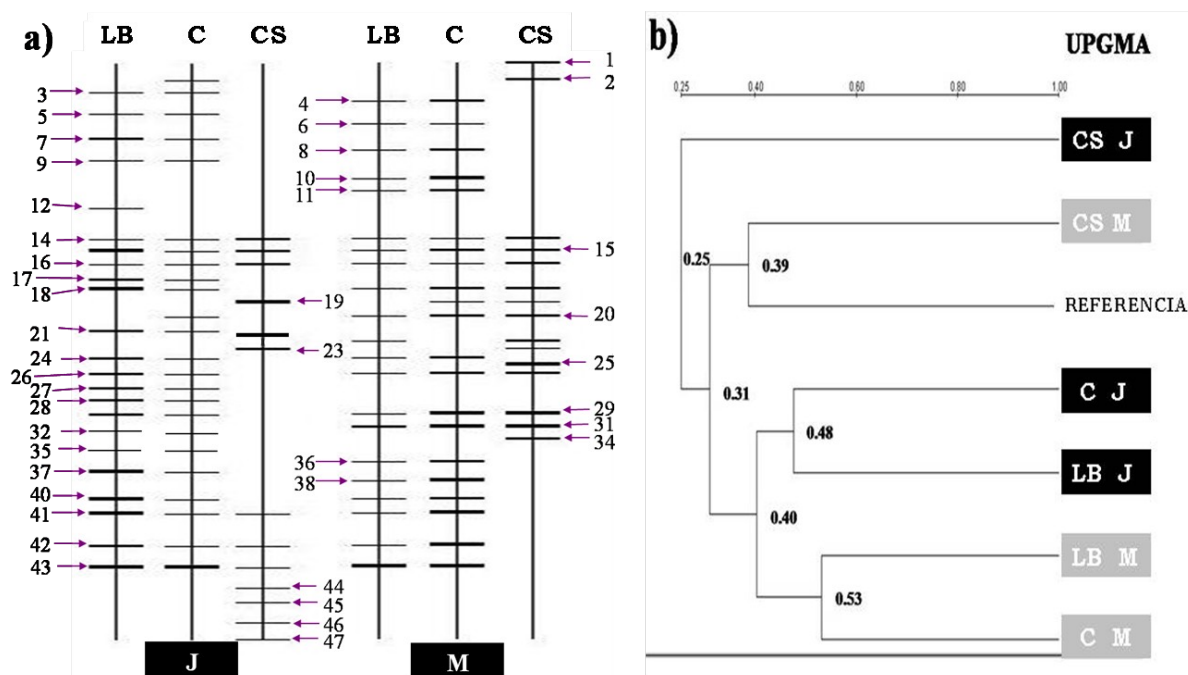


Figura 11. a) Bandas digitalizadas y enumeradas del gel mostrado en la Figura 10. b) Dendrograma de los patrones de DGGE obtenidos por UPGMA, del mismo gel.

En la Figura 10, se indican con flechas negras algunas bandas que aparecen en la cuajada después del salado manual, también se observan otras que desaparecen. Posiblemente algunos microorganismos son separados de la cuajada durante la etapa de desuerado. Ejemplos de estos resultados son las bandas 5 y 9 en el patrón de DGGE (Figura 8a). En los casos anteriormente mencionados de otros grupos de estudio con quesos, se observó el uso de cultivos iniciadores y se realizaron tratamientos térmicos durante el proceso. En el queso Pecorino se llevan a cabo dos tratamientos térmicos, a 60 y 80 °C y para el Ragusano, hay un proceso de cocción y una etapa de calentamiento a 49 °C. Por lo tanto, se observa una menor diversidad microbiana en estos quesos (Randazzo *et al.*, 2006).

9.7.1. Dinámica de la población microbiana- Dominancia relativa.

La intensidad de las bandas en el análisis de DGGE de los amplicones, puede ser relacionada a la cantidad de ADN, por lo tanto, sería proporcional a la dominancia relativa de cada individuo presente en la muestra, lo que permite el estudio de los cambios de población de las comunidades microbianas (Muzyer *et al.*, 1995; Van Hannen *et al.*, 1999). El dominio relativo (DR) es calculado como la suma de la intensidad relativa promedio (IRp) de cada banda (dado por el algoritmo Diversity Data Base), dividida entre el número de individuos que conforman la comunidad bacteriana de cada muestra. Este parámetro permite clasificar a los individuos de cada muestra como **dominantes** ($IRp \geq DR$) o **no dominantes** ($IRp \leq DR$).

En la Tablas 7 y 8, se muestran los valores de DR para las bandas del patrón de DGGE de las muestras **J** y **M**. Las casillas sombreadas indican individuos dominantes.

Para **J**, se observó que las bandas 16, 41 y 42 mostradas en la Tabla 7, son dominantes en todas las muestras, indicando que estos individuos fueron incorporados al sistema por la leche. Las bandas 19, 23, 44, 45 y 46 son dominantes en la cuajada salada, pero se encuentran ausentes en la leche y en la cuajada fresca, lo que indica que probablemente fueron introducidos por la sal o por el tratamiento manual a la cuajada. Estas cinco bandas representan 40% de la población presente en la cuajada salada. Estos resultados indican que el amasado y salado en seco son pasos críticos para la adición de los microorganismos que estarán presentes en las primeras etapas del proceso de maduración del queso. También se observó que varios individuos dominantes correspondientes a las bandas 17, 18, 26, 28, 29, 32 y 40, no son detectados en la cuajada salada. Lo que podría deberse a que estos microorganismos disminuyeron después del salado.

Tabla 7. Intensidad relativa de las bandas de DGGE obtenidas de las muestras de J.

Banda (posición)	LB	C	CS	IRp
2		0.40		0.40
3	0.25	0.51		0.38 ± 0.18
5	0.27	0.45		0.36 ± 0.13
7	0.25	0.48		0.37 ± 0.16
9	0.19	0.44		0.32 ± 0.18
12	0.27			0.27
14	0.34	0.38	0.44	0.39 ± 0.05
15	0.40	0.48	0.55	0.48 ± 0.08
16	0.55	0.57	0.58	0.57 ± 0.02
17	0.62	0.63		0.63 ± 0.007
18	0.56	0.61		0.59 ± 0.04
19			0.64	0.64
20		0.56		0.56
21	0.45	0.56	0.74	0.58 ± 0.15
23			0.76	0.76
24	0.47	0.60		0.54 ± 0.09
26	0.55	0.63		0.59 ± 0.06
27	0.43	0.60		0.52 ± 0.12
28	0.56	0.61		0.59 ± 0.04
29	0.62	0.59		0.61 ± 0.02
32	0.62	0.58		0.60 ± 0.03
35	0.50	0.51		0.51 ± 0.007
37	0.58	0.51		0.55 ± 0.05
40	0.66	0.66		0.66
41	0.68	0.67	0.53	0.63 ± 0.08
42	0.60	0.61	0.56	0.59 ± 0.03
43	0.56	0.44	0.57	0.53 ± 0.07
44			0.59	0.59
45			0.56	0.56
46			0.55	0.55
47			0.50	0.50
DOMINANCIA RELATIVA				0.53 ± 0.11

Casillas sombreadas indican individuos dominantes

Tabla 8. Intensidad relativa de las bandas de DGGE obtenidas de las muestras de M.

Banda (posición)	LB	C	CS	IRp
1			0.45	0.45
2			0.45	0.45
4	0.39	0.42		0.41 ± 0.02
6	0.43	0.48		0.46 ± 0.04
8	0.46	0.51		0.49 ± 0.04
10	0.52	0.53		0.53 ± 0.007
11	0.45	0.54		0.50 ± 0.06
14	0.26	0.38	0.38	0.34 ± 0.07
15	0.38	0.51	0.54	0.48 ± 0.09
16	0.37	0.52	0.69	0.53 ± 0.16
18	0.38	0.60	0.73	0.57 ± 0.18
19		0.56	0.69	0.63 ± 0.09
20	0.33	0.66	0.66	0.55 ± 0.19
22	0.33		0.60	0.47 ± 0.19
23			0.59	0.59
24	0.26	0.45		0.36 ± 0.13
25			0.69	0.69
26	0.39	0.62	0.71	0.57 ± 0.17
29	0.49	0.69	0.70	0.63 ± 0.12
31	0.47	0.66	0.73	0.62 ± 0.13
34			0.52	0.52
36	0.22	0.52		0.37 ± 0.21
38	0.23	0.54		0.39 ± 0.22
40	0.29	0.63		0.46 ± 0.24
41	0.37	0.67		0.52 ± 0.21
42	0.35	0.69		0.52 ± 0.24
43	0.26	0.68		0.47 ± 0.30
DOMINANCIA RELATIVA				0.50 ± 0.09

Casillas sombreadas indican individuos dominantes.

Para las muestras del productor de **M**, se observa una distribución diferente de la dominancia relativa (Tabla 8). Por ejemplo, justo dos bandas dominantes (la número 29 y 31) fueron incorporadas por la leche y el 33% de la población presente en la cuajada salada fue

incorporada después del amasado y salado manual (bandas 1, 2, 23, 25 y 34). Por otra parte, no se detectaron varias bandas en el patrón electroforético de la cuajada después de salar, como la 10, 36, 38, 40, 41, 42, y 43. A pesar de que éstas tenían dominancia en la etapa anterior (cuajada fresca) del proceso.

9.7.2. Identificación de microorganismos lipolíticos y micro-heterogeneidad.

Considerando que un gran porcentaje de la comunidad microbiana en la cuajada fue incorporada en la etapa de salado, se realizó un análisis de PCR-DGGE de algunas colonias puras lipolíticas aisladas de la sal marina. Todas las colonias halladas fueron bacilos largos y cortos Gram positivos.

Es importante señalar que la pureza de las colonias fue evaluada por diferentes métodos, tinción de Gram, por crecimiento en placa y dilución exhaustiva en medios líquidos.

En la Figura 12a, se muestra el patrón electroforético obtenido. Se puede observar que las colonias aisladas presentan varios amplicones de la región V3 del gen ADNr 16S, en lugar de uno. Se secuenciaron varias bandas del mismo carril y los resultados del BLAST demostraron tener la misma identidad. Este fenómeno (micro-heterogeneidad) ha sido observado por varios grupos de investigación. Se ha propuesto que la presencia de varias copias mutadas del gen ARNr 16S podría ser causada por la necesidad de los microorganismos de adaptarse a ambientes no favorables (Casamayor *et al.*, 2002; Cocolin *et al.*, 2007). Se puede considerar que los ambientes marinos podrían causar, en bacterias de dicho hábitat, una expresión diferencial de genes que codifican para el gen ARNr 16S como es descrito por Nübel *et al.*, (1996).

Además, se ha reportado que el número de copias del operón de ARNr en un genoma bacteriano puede variar de 1 hasta 15. Existen reportes que indican que un mayor número de copias de este operón, se encuentran presentes en bacterias formadoras de esporas aisladas de suelo; como *Bacillus subtilis* y *Clostridium paradoxum*, que poseen 10 y 15 copias, respectivamente. Organismos procariontes requieren múltiples copias del operón ARNr para alcanzar altas tasas de crecimiento. Sin embargo, la capacidad de crecimiento rápido no es el único factor determinante, también puede deberse a la capacidad de responder rápidamente a las fluctuantes condiciones de crecimiento lo que explica la variación en la multiplicidad del operón ARNr (Klappenbach *et al.*, 2000).

En diversos trabajos donde se emplea la técnica de DGGE se ha observado el problema de la microheterogeneidad en diversas especies (Ercolini, 2004), es bien conocido que existen copias heterogéneas de operones del ADNr para algunas bacterias (Von Winntzingerode *et al.*, 1997). En el estudio a un queso español, Cabrales, encontraron más de una banda en el DGGE para las cepas identificadas como *Lactobacillus plantarum* y *Geotrichium candidum*

(Flores y Mayo, 2006). Múltiples bandas en geles de DGGE de la región V1 del gen ADNr 16S fueron halladas para algunas especies de *Lactobacillus* y *Staphylococcus* aislados de alimentos (Cocolin *et al.*, 2001). También, se obtuvieron múltiples copias de la región V3 en especies de *Staphylococcus* (Cocolin *et al.*, 2001; Blaiotta *et al.*, 2003.) En el monitoreo de una salsa argentina se obtuvo más de una banda en los patrones del DGGE para *Enterococcus faecalis*, amplificando la región V3 (Fontana *et al.*, 2005). Por último, en la optimización de métodos independientes de cultivo, un grupo de investigadores probó diferentes pares de cebadores que amplifican diferentes regiones del gen 16S, observaron que con todos los pares analizados se obtenía un múltiple bandeo en los distintos amplicones de microorganismos aislados de quesos y salsas fermentadas. Por ejemplo, *Serratia marcescens* presenta un perfil de seis bandas cuando se amplifica la región V3 con las primers 338f y 518r. En el caso de *Staphylococcus xylosus* y *Lactobacillus sakei*, se obtuvieron tres bandas para cada uno, amplificando la misma región, aunque concluyen que a pesar del múltiple bandeo se pudo diferenciar entre microorganismos (Cocolin *et al.*, 2007). Por lo tanto, debido a la microheterogeneidad observada en el patrón de bandeo obtenido de los microorganismos aislados de la sal, se dificultó la identificación de los individuos presentes en **C** y **CS**. Aunque el múltiple bandeo no impidió diferenciar microorganismos aislados con el mismo perfil.

En la Figura 12b, el análisis de agrupamiento muestra una relación más cercana entre el patrón de bandeo de *Paenibacillus polymyxa* y el de la cuajada salada del productor de Michoacán; pero la comparación puede no ser exacta. En consecuencia, no se podría asegurar que los microorganismos lipolíticos presentes en la sal están presentes en la cuajada salada.

Sin embargo, el análisis de UPGMA fue una herramienta útil en la selección de bandas para la secuenciación. Al final de los anexos se muestran todas las secuencias obtenidas para este estudio, las cuales se compararon con la base de datos de NCBI, mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para la identificación de la microbiota.

Las colonias lipolíticas 44, 50 y 49 fueron identificadas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. y *Paenibacillus polymyxa*, con valores de identidad de 100, 100 y 97 %, respectivamente. El género de *Bacillus* ha sido uno de los primeros en ser estudiados por su producción de lipasas para la industria. En el caso *P. polymyxa*, se encontró que se han evaluado y caracterizado carboxilesterasas para determinar su potencial de aplicación en procesos biotecnológicos. (Prim *et al.*, 2000).

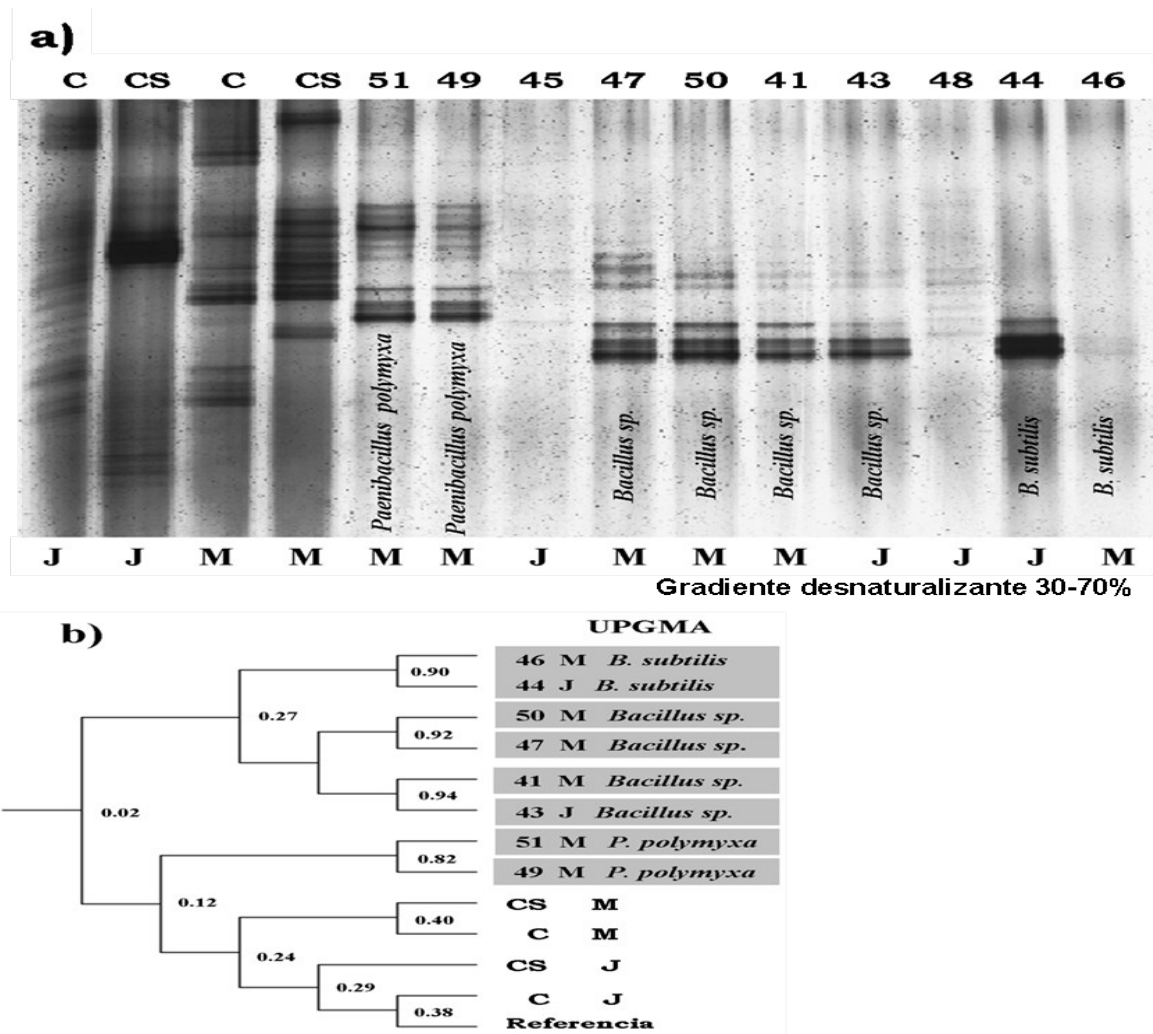


Figura 12. a) DGGE. Amplicones de la región V3 de las muestras analizadas de Jalisco (J) y Michoacán (M). Carriles: C, cuajada fresca; CS, cuajada salada; 51, 49, 45, 47, 50, 41, 43, 48, 44 y 46, colonias lipolíticas aisladas de la sal (S). **b)** Dendrograma de los patrones mostrados en la Figura 12a obtenidos por UPGMA.

También se realizó el análisis de PCR-DGGE de los microorganismos aislados de muestras de la cuajada salada (CS). Estos fueron en su mayoría, bacilos y cocos agrupados Gram positivos. El patrón múltiple de bandeo también fue analizado, pero el análisis de UPGMA no fue de mucha ayuda porque la microheterogeneidad de los amplicones obtenidos de colonias puras, no permitió un buen agrupamiento de los patrones obtenidos. Por lo tanto, se decidió tomar una o dos bandas de cada carril. Los resultados se muestran en la Figura 13. El porcentaje de identidad se encuentra por arriba del 97% en todos los casos, por comparación con el BLAST de las regiones V1 y V3 del gen ADN_r 16S. █

De los carriles 56 y 10, dos bandas fueron seleccionadas por carril (A, J, E₁ y G), el patrón de bandeo del carril 57, fue semejante a estos dos y se consideró como el mismo microorganismo.

Sus secuencias fueron idénticas a las reportadas para bacterias no cultivables encontradas en un análisis de genoma de la microbiota de plantas y de piel humana. También se identificó a especies de *Bacillus sp.* en los carriles 54 y 58.

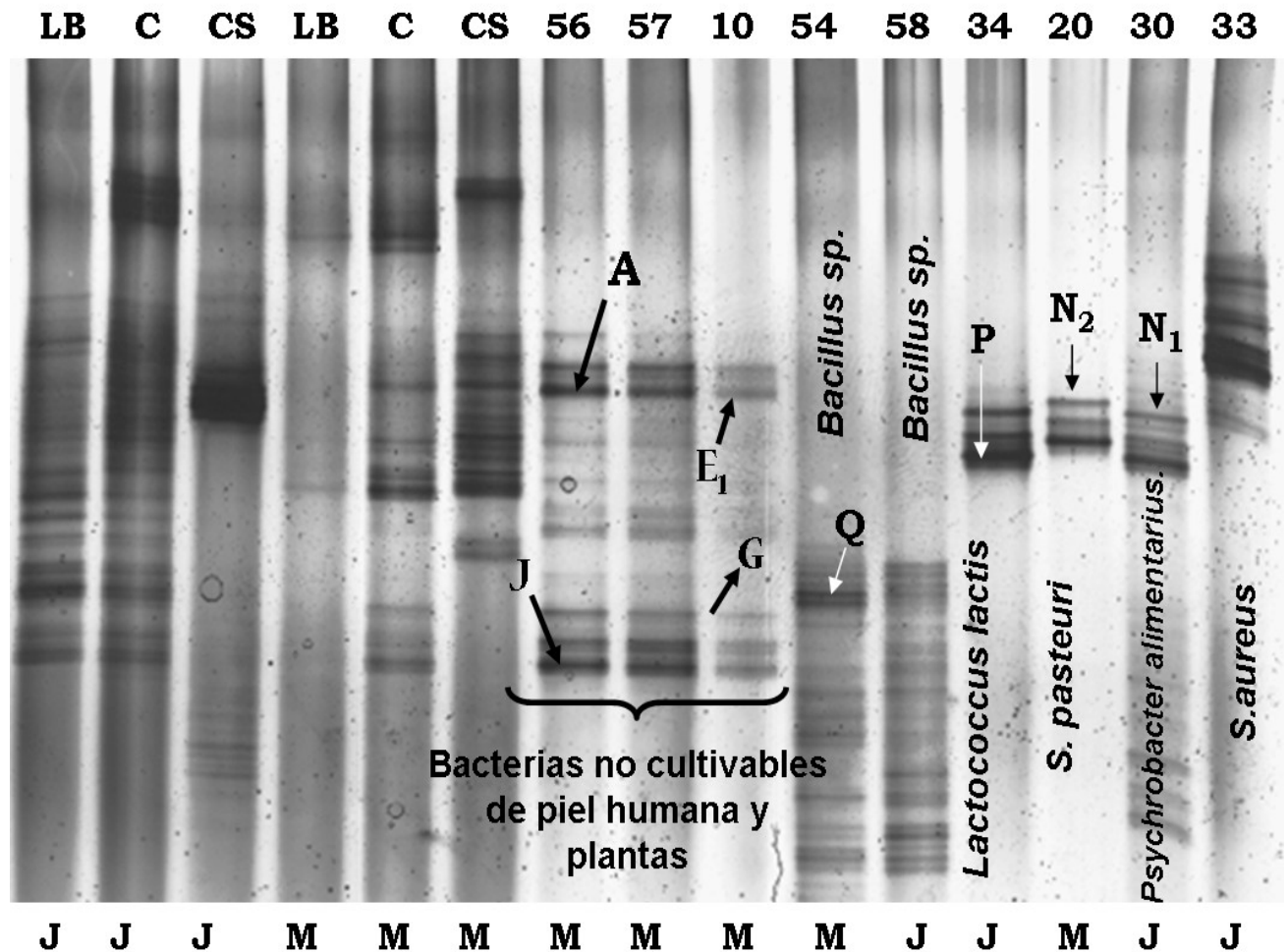


Figura 13. DGGE. Amplicones de la región V3. Muestras analizadas de los ranchos Jalisco (J) y Michoacán (M). Carriles: LB, leche bronca; C, cuajada fresca; CS, cuajada salada; 56, 57, 10, 54, 58, 34, 20, 30 y 33, colonias lipolíticas aisladas de la cuajada salada. A, E₁, J, G, Q, P, N₁, N₂, bandas secuenciadas.

En cuanto a *Lactococcus lactis* (carril 34) es una bacteria que pertenece a la microbiota normal de la leche y que se caracteriza principalmente por su gran producción de ácido láctico. Además de lo anterior, también se ha analizado y reportado su actividad lipolítica, la cual se discute más adelante. El carril número 30 corresponde a una bacteria marina, específicamente del género *Psychrobacter sp.*, con 99% de identidad.

S. pasteurii, y *S. aureus* (carriles 20 y 33, respectivamente) fueron hallados con identidades de 99% y 100%, respectivamente. *Staphylococcus* es un género caracterizado por la producción

de lipasas, y varias especies además de *S. pasteurii* fueron halladas en previas investigaciones del producto madurado, tales como, *S. piscifermentans*, *S. xylosus* y *S. saprophyticus* (García, 2006). La presencia de otras especies de *Staphylococcus* ha sido reportada en varios alimentos fermentados artesanales, por ejemplo, productos cárnicos y de pescado, salsas y quesos (Rea *et al.*, 2007); reportándose que los procedimientos de manipulación son las principales fuentes de inoculación.

Se logró secuenciar algunas bandas de las muestras **LB**, provenientes de Michoacán, donde se halló a *S. pasteurii* (carriles 6 y 17, Figura 14). Esta bacteria también fue hallada en las muestras de **CS** de la misma región, lo que indica que este microorganismo se incorpora al proceso desde la leche y se mantiene hasta la obtención de la cuajada salada.

Por otra parte, en muestras recolectadas de las tinas de amasado (**A**), de la región de Jalisco (J), se encontró a *B. subtilis*, microorganismo que también fue identificado en muestras de sal de grano. Por lo tanto, se espera su presencia en la cuajada salada, ya que se encuentra formando parte del ambiente de la región y de las materias primas utilizadas para la fabricación del queso Cotija. A pesar de la micro-heterogeneidad obtenida de este microorganismo, el patrón de bandeo de las colonias 7, 37, 44 y 46 (Figuras 12 y 14) resultó ser el mismo y se pudieron relacionar secuenciando algunas bandas.

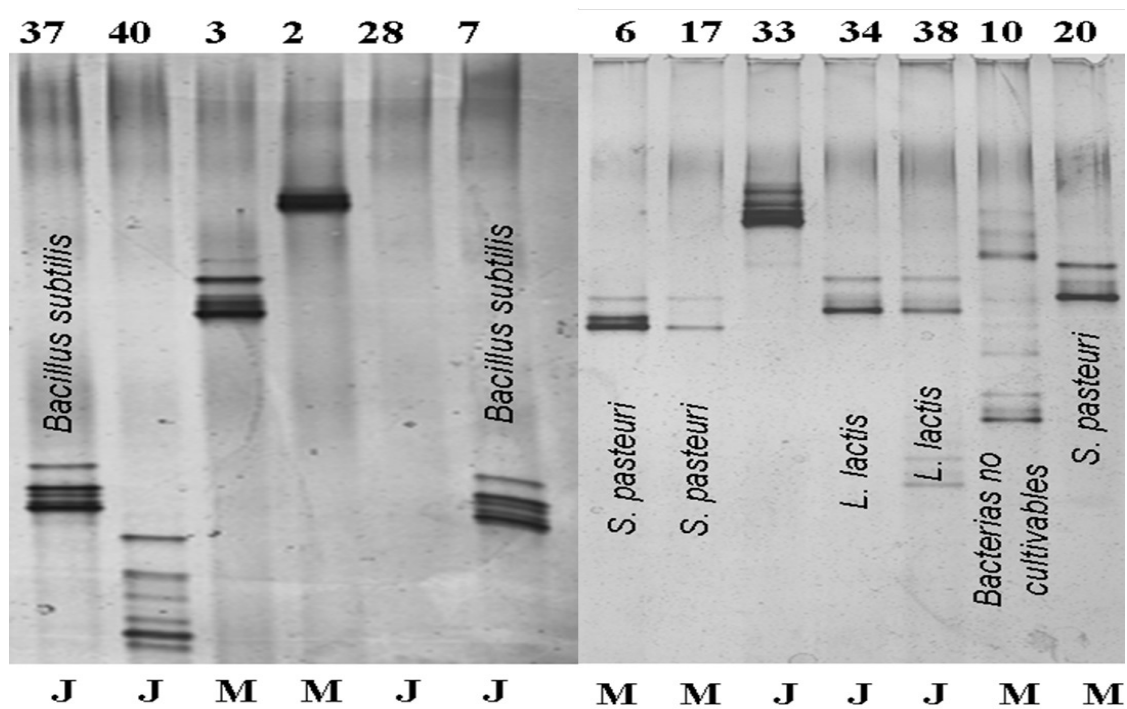


Figura 14. Gel con gradiente desnaturizante (30-70%). Muestras analizadas de Jalisco (J) y Michoacán (M). Colonias provenientes de A (7, 37 y 40); LB (6 y 17); CS (34, 38, 10 y 20).

En la Tabla 9, se resumen los resultados de identidad de todos los microorganismos lipolíticos de las muestras de **C** y **CS**, seleccionados para este estudio. Las secuencias obtenidas provienen de algunas bandas seleccionadas de DGGE (región V3) y de la secuenciación de la región V1 del ADN de algunas colonias aisladas. Ahí se reporta una parte de la microbiota lipolítica cultivable presente en la cuajada salada, al inicio de la maduración.

En las muestras obtenidas de **C** provenientes del rancho de Jalisco (**J**), se identificó a *Enterococcus gallinarum*, *B. pumilus* y *S. aureus*; mientras que en las muestras de **CS** (después del salado manual), se halló nuevamente a *S. aureus*, además de las especies de *Bacillus sp.*, *Psychrobacter sp.* y *Lactococcus lactis*.

Por otro lado, en las mismas muestras pero de la región de Michoacán (**M**) se identificaron especies de *Bacillus sp.* o bacterias no cultivables de piel humana o plantas y *Lactococcus garviae*, en **C**; mientras que en **CS**, se hallaron a *S. pasteurii* y especies de *Bacillus sp.* y bacterias no cultivables de piel humana o plantas.

De manera general, en las muestras de los dos ranchos se observó que la mayoría de las especies lipolíticas halladas en este estudio, pertenecen a tres géneros: *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Lactococcus sp.* Sumado a los anteriores, también se hallaron microorganismos del género *Enterococcus*, en muestras del rancho **J**, donde se encontró mayor diversidad de lipolíticos.

De estos últimos, se encontró a *Bacillus pumilus* en la cuajada fresca (Tabla 9). Otros estudios de nuestro grupo, realizados en queso Cotija con un año de maduración mostraron la presencia de *Bacillus pumilus* (100% de identidad en la región V3 del gen 16S) (García, 2006). Se trata de un microorganismo lipolítico, que según nuestros resultados, su origen podría ser de la sal de mar o del medio ambiente agrícola. También se halló en el Cotija, la presencia de especies de *Enterococcus* clasificadas como bacterias ácido lácticas (Zúñiga, 2009). La colonia identificada como *E. gallinarum*, forma parte de un grupo de *Enterococcus* que se han aislado de diversos quesos elaborados con leche cruda o pasteurizada. Son responsables del aroma de los quesos, ya que contribuyen con su actividad lipolítica y proteolítica al producto final (Jurkovic *et al.*, 2006; Zuñiga, 2009).

Ya hemos comentado a lo largo de este estudio las diferencias obtenidas en las cuentas de microorganismos indicadores y de la diversidad microscópica de la microbiota presente en muestras de ambos ranchos. Por lo tanto, se puede observar claramente que en las muestras provenientes del rancho de Michoacán (**M**), se aisló la mayoría de las colonias identificadas como bacterias no cultivables de piel humana o plantas. Éstas evidencian la manipulación que se lleva a cabo por el quesero durante el salado y pone de manifiesto la importancia de las prácticas higiénicas durante la elaboración del Cotija. Específicamente, en algunas etapas del

proceso, como: la ordeña, la manipulación durante el amasado y la pobre limpieza del equipo y utensilios necesarios para el proceso, en esta región.

Tabla 9. Identidad de las bacterias lipolíticas aisladas de C y CS, de los ranchos queseros J y M

JALISCO (J)					MICHOACÁN (M)				
Col.	Microorganismo	Región amplificada	% ID	Muestra	Col.	Microorganismo	Región amplificada	% ID	Muestra
58	<i>Bacillus sp.</i>	V1	100	CS	10	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas.	V1	100	CS
33	<i>S. aureus</i>	V1	100	CS	56	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas.	V1	98	CS
38	<i>Lactococcus lactis</i>	V1	100	CS	54	<i>Bacillus sp.</i>	V1	100	CS
30	<i>Psychrobacter sp.</i>	V3 Banda (N ₁)	100	CS	20	<i>S. pasteurii</i>	V1	100	CS
34	<i>Lactococcus lactis</i>	V3 Banda (P)	98	CS	10	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V3 Banda (E ₁)	97	CS
55	<i>S. aureus</i>	V1	100	C	10	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V3 Banda (G)	99	CS
8	<i>Enterococcus gallinarum</i>	V1	100	C	56	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V3 Banda (J)	94	CS
53	<i>Bacillus pumilus</i>	V1	100	C	54	<i>Bacillus sp.</i>	V3 Banda (Q)	100	CS
					20	<i>S. pasteurii</i>	V3 Banda (N ₂)	99	CS
					9	<i>Lactococcus garviae</i>	V1	100	C
					52	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V1	100	C
					15	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V1	100	C

ID: Identidad, Col: colonia, CS: Cuajada salada, C: Cuajada fresca.	14	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V1	100	C
--	-----------	---	-----------	-----	----------

La presencia de *Lactococcus garviae* en muestras de Michoacán, indica la falta de cuidado en la manipulación de la leche. Este microorganismo raramente se encuentra en la microbiota normal de la leche. Forma parte de la piel de animales y de las plantas. Aunque las infecciones humanas causadas por lactococos rara vez se reportan, *Lactococcus garviae* puede estar implicado en enfermedades de los peces o encontrarse en ambientes marinos (Casalta y Montel, 2008).

En el rancho de Jalisco (**J**), se observaron mejores prácticas de higiene durante el proceso que se ven reflejadas en las cuentas microbiológicas de microorganismos indicadores obtenidos de las diferentes muestras. La mayoría de lipolíticos pertenecen a la microbiota comúnmente hallada en quesos tradicionales. A pesar de eso, la detección de *S. aureus* plantea la cuestión de la seguridad del producto, ya que es considerado un patógeno e indicador de calidad en productos lácteos. Su presencia se puede explicar principalmente por dos causas: presencia de mastitis en vacas y/o malas prácticas de higiene del productor.

En la legislación vigente para quesos no se exige la ausencia de éste, pero la cantidad máxima está regulada (100 UFC/g) para no causar daño a la salud.

Por último, algunos bandas de los geles con gradiente desnaturizante fueron seleccionadas aleatoriamente para ser secuenciadas y sus identidades se muestran en la Tabla 10. En la Figura 15, se visualiza la posición de las bandas dentro del patrón de DGGE obtenido para estos grupos.

La banda número 21 del perfil de DGGE de Jalisco, corresponde a *Lactococcus lactis*. Éste se encontró presente en la leche bronca y llegó a ser predominante en **C** y **CS** (Tabla 7). Estos resultados sugieren que la cepa lipolítica aislada (Figura 13, carril 34) fue incorporada al proceso por la leche bronca y prevalece hasta las primeras etapas de maduración. Ahora bien, no es común que se caracterice a *L. lactis* por la producción de lipasas. Sin embargo, se ha demostrado la presencia, tanto de lipasas como de esterases en varias colonias de *L. lactis*, *subsp. lactis* y de *L. lactis subsp cremoris*, teniendo como resultado que la actividad lipasa es mayor, comparada con la esterasa, en este microorganismo (Fernández *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2003).

Las bandas D y E (Figura 15) tuvieron la misma identidad, la de una bacteria no cultivable de la piel y plantas. Además, las bandas C y F corresponden a *Psychrobacter* y *Marinilactibacillus*, con identidades de 99% y 100%, respectivamente. Estas últimas son bacterias marinas, lo que sugiere que entraron al proceso por medio de la sal de mar. Se logró aislar a *Psychrobacter sp.*

por siembra, pero no a *Marinilactobacillus*, posiblemente debido al hecho de que no se logró satisfacer los requerimientos necesarios para que creciera con las condiciones experimentales utilizadas. *Psychrobacter* es un bacilo Gram-negativo que ha sido hallado en algunos quesos madurados europeos y del que se ha tenido un gran interés en el estudio de la gran capacidad aromatizante que le provee a quesos franceses (Deetae *et al.*, 2007). *Marinilactibacillus* es una bacteria ácido-láctica marina que fue hallada en el queso Cotija en una previa investigación de nuestro grupo de trabajo (Zúñiga, 2009). La especie *Marinilactibacillus psychrotolerans* hallada en esta investigación, se ha reportado presente en ambientes marinos de donde se ha aislado y caracterizado (Ishikawa *et al.*, 2003). Además, es considerada parte de la microbiota de diversos quesos tradicionales, aunque no presenta actividad lipolítica, se confirma la presencia de este microorganismo en el queso Cotija (Irlinger y Mounier, 2009).

Tabla 10. Identidad de bandas provenientes de los patrones de DGGE en muestras de alimento.

JALISCO (J)				MICHOACÁN (M)			
Microorganismo	Región amplificada	% ID	Muestra	Microorganismo	Región amplificada	% ID	Muestra
Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V3 Banda (E)	100	C	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	V3 Banda (F)	100	CS
<i>Rahnella sp.</i>	V3 Banda (H)	98	C	<i>Psychrobacter piscidermidis</i>	V3 Banda (C)	99	CS
<i>Lactococcus lactis</i>	V3 Banda (a)	100	C	Bacterias no cultivables de piel humana o plantas	V3 Banda (D))	93	C
				<i>Klebsiella sp.</i>	V3 Banda (K)	98	C

ID: Identidad, **Col:** colonia, **CS:** Cuajada salada, **C:** Cuajada fresca.

Por último, se identificó la presencia de dos enterobacterias al secuenciar las bandas H y K, *Rahnella sp.* y *Klebsiella sp.*, respectivamente. En la Figura 15, se observa que están presentes en la leche cruda y tienen dominancia en la cuajada fresca, pero se pierden después

del desuerado y salado, ya que en la cuajada salada no se logran identificar sus bandas (desaparecen del patrón de bandeo).

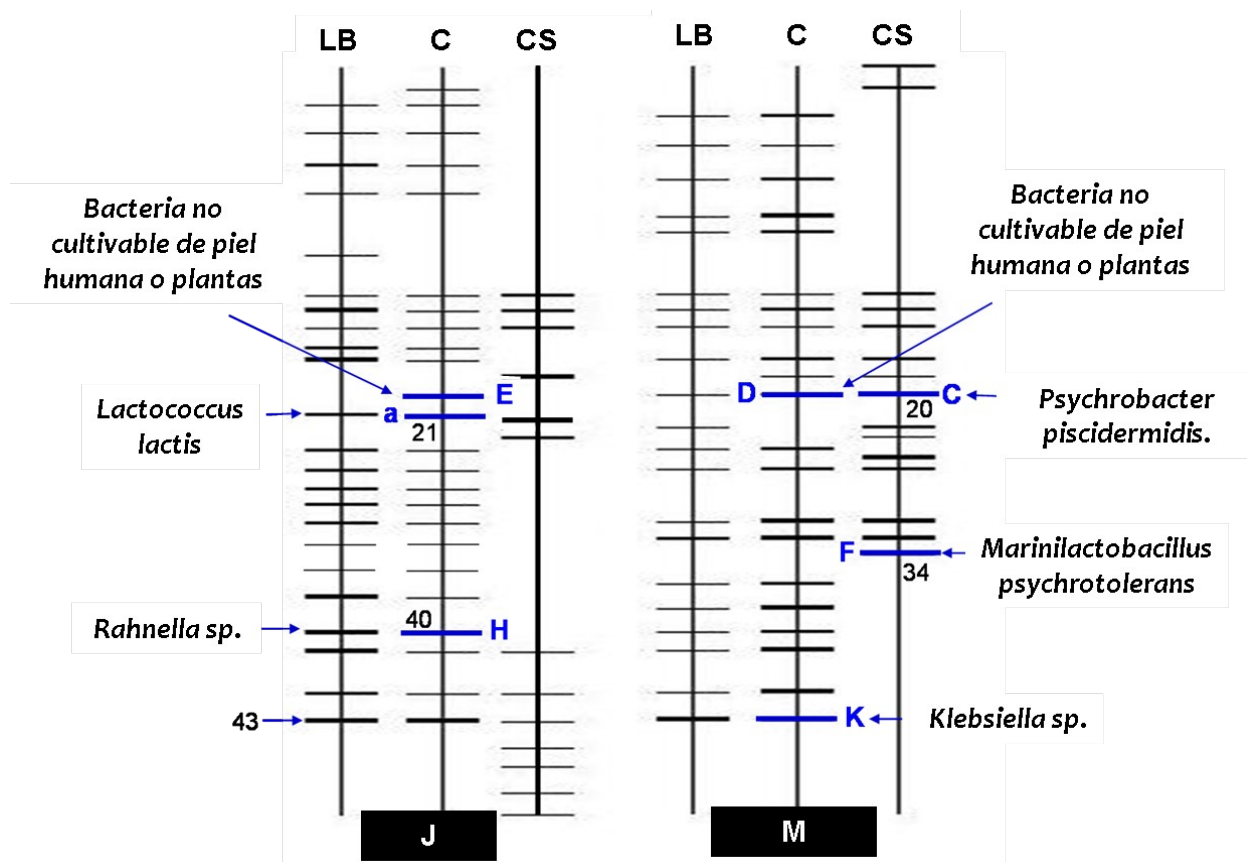


Figura 15. Identificación de algunos individuos del patrón de DGGE.

Otros autores que analizaron un queso semiduro portugués, demostraron en su trabajo que las pobres condiciones de manejo de la leche durante la ordeña, incrementan la cuenta de enterobacterias en leche y que en algunos casos sobrepasan las cantidades impuestas por normas vigentes. Por lo tanto, estarán presentes en los quesos elaborados. Sin embargo, indican que la concentración de sal, el decremento de pH y la pérdida de humedad después de cuatro meses de maduración, influyeron negativamente en el crecimiento de enterobacterias y *S. aureus*, obteniendo cuentas bajas en quesos bien madurados (Kongo *et al.*, 2008). Lo mismo podía ocurrir con el Cotija, ya que en estudios anteriores con quesos madurados de 3 a 12 meses, no se encontró presencia de estas enterobacterias dentro de los microorganismos aislados (García, 2006; Bravo, 2008; Zúñiga, 2009).

9.7.3. Prueba de confiabilidad sobre la identidad de bandas mediante análisis filogenéticos.

Se realizó un análisis de agrupamiento para la obtención de un árbol consenso inferido por el método de Neighbor-Joining, con las secuencias amplificadas de la región V3 provenientes de las bandas amplificadas de colonias puras aisladas de las muestras de cuajada (C) y cuajada salada (CS) utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 4.0. Un total de 27 fragmentos fueron analizados: 5 secuencias de bandas y 22 secuencias obtenidas del GenBank pertenecientes a diferentes géneros de bacterias elegidas por ser especies previamente halladas en el grupo de trabajo sobre el queso Cotija (García, 2006; Zúñiga, 2009), además de la inclusión de algunas enterobacterias. La inferencia filogenética de las secuencias de las bandas Q, N₁, N₂, P y de una banda de la colonia 33 se realizó por un análisis de Bootstrap con 10,000 remuestreos (Figura 16). Dicho análisis coloca a la banda P (identificada como *L. lactis*), dentro del género de *L. lactis* muy cercana a *L. lactis subsp. lactis* y *L. lactis subsp. cremoris*, con lo que se obtuvo una identificación de dicha banda a nivel de especie. Lo mismo pasó con las bandas N₂ (identificada como *S. pasteurii*) y N₁ (identificada como *Psychrobacter alimentarius*), las cuales se agruparon muy cercanas a otras secuencias de la misma especie. La colonia 33 fue agrupada con *S. aureus* y diferenciada de las demás especies de *Staphylococcus*. La banda Q (identificada como *Bacillus sp.*) en un grupo junto a *Bacillus sp.* y muy cercana a *Enterobacter sp.* a pesar de ser microorganismos con diferente Gram. Este análisis indica una buena inferencia sobre de la identidad de las diferentes bandas a nivel de especie, excepto en el caso del *Bacillus* que queda agrupado con *Enterobacter*.

El mismo análisis se realizó para las bandas restantes provenientes de la amplificación de la región V3, pero en este caso de aquellas amplificadas directamente del patrón electroforético de las muestras de C y CS (Tabla 10). Se analizaron un total de 31 secuencias: 5 provenientes de bandas y 26 obtenidas del GenBank, de las cuales 14 son de enterobacterias y las restantes de bacterias ácido lácticas. La inferencia filogenética de las secuencias de las bandas a, C, K, F y H se realizó por un análisis de Bootstrap con 1,000 remuestreos (Figura 17). En este árbol consenso se coloca a las bandas a, F y C, dentro de los grupos de *Lactococcus lactis*, *Marinilactibacillus psychrotolerans* y *Psychrobacter piscidermidis*, respectivamente, mostrando también una buena identidad a nivel de especie. Por otra parte, a las bandas H y K, las coloca dentro del clado de *Ranhello sp.* y *Klebsiella sp.*, respectivamente. La agrupación de estas bandas en el árbol obtenido reafirma la identidad indicada en la Tabla 10. También se logra observar dos grandes ramas, una en donde se encuentran agrupadas las secuencias correspondientes a las enterobacterias de los géneros *Psychrobacter*, *Klebsiella* y *Ranhello*, y otra donde se coloca a las bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus* y *Marinilactibacillus*. En esta agrupación se hace evidente la diferencia entre Gram negativas y Gram positivas.

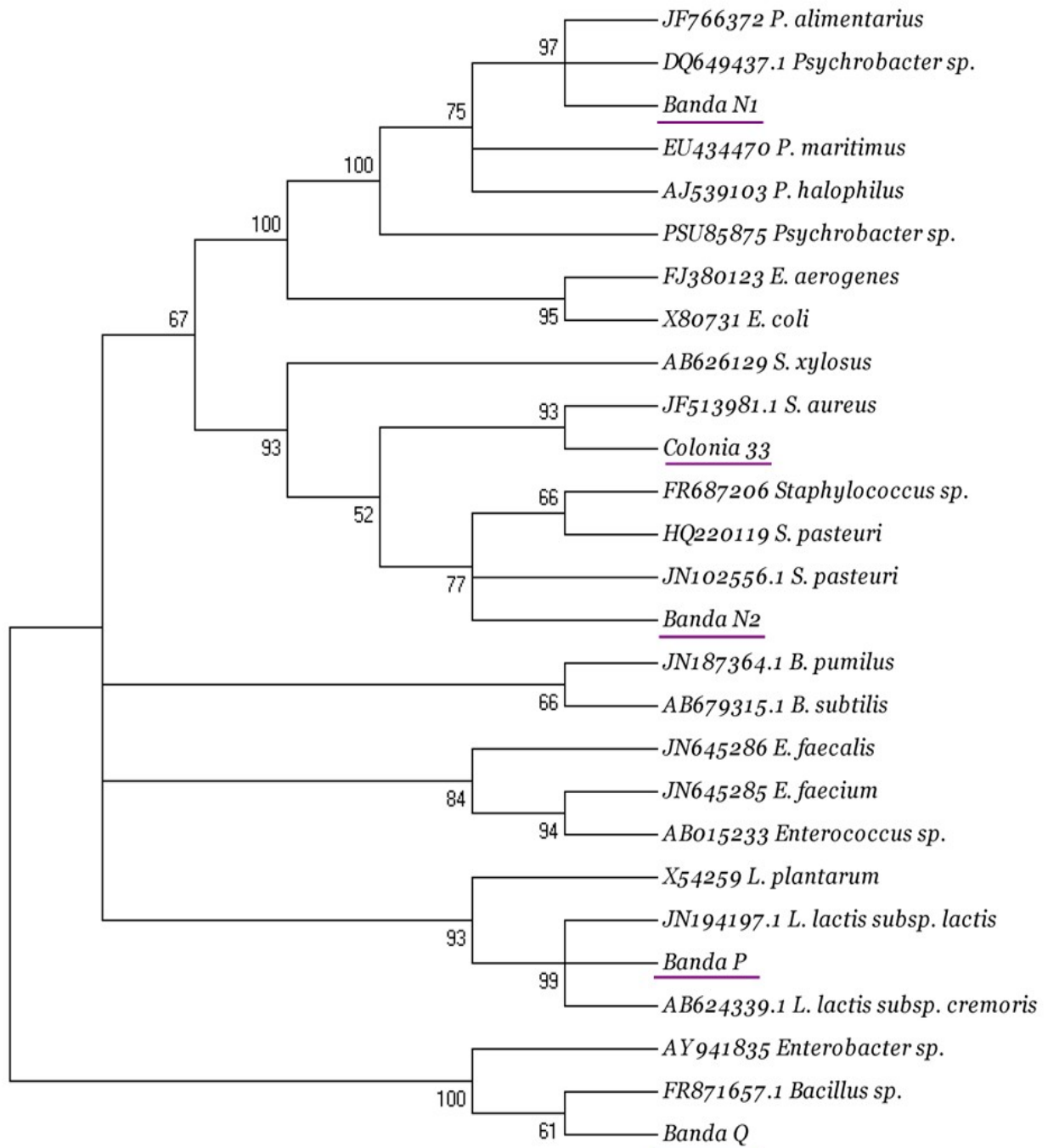


Figura 16. Relación filogenética de las bacterias identificadas por la secuenciación de bandas de la región V3 del gen ADNr 16S en el estudio del Queso Cotija. La relación filogenética fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou N y Nei, 1987). El árbol consenso inferido de entre 10,000 remuestreos representa la relación entre las 27 secuencias analizadas (Felsenstein, 1985). El valor que se muestra junto al nodo, de donde se derivan las ramas del árbol corresponde al porcentaje en el que fueron asociadas las secuencias durante el análisis por bootstrap con 10,000 remuestreos (Felsenstein, 1985). La distancia de la relación fue calculada usando el método de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del grupo de secuencias analizadas. El análisis fue realizado empleando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

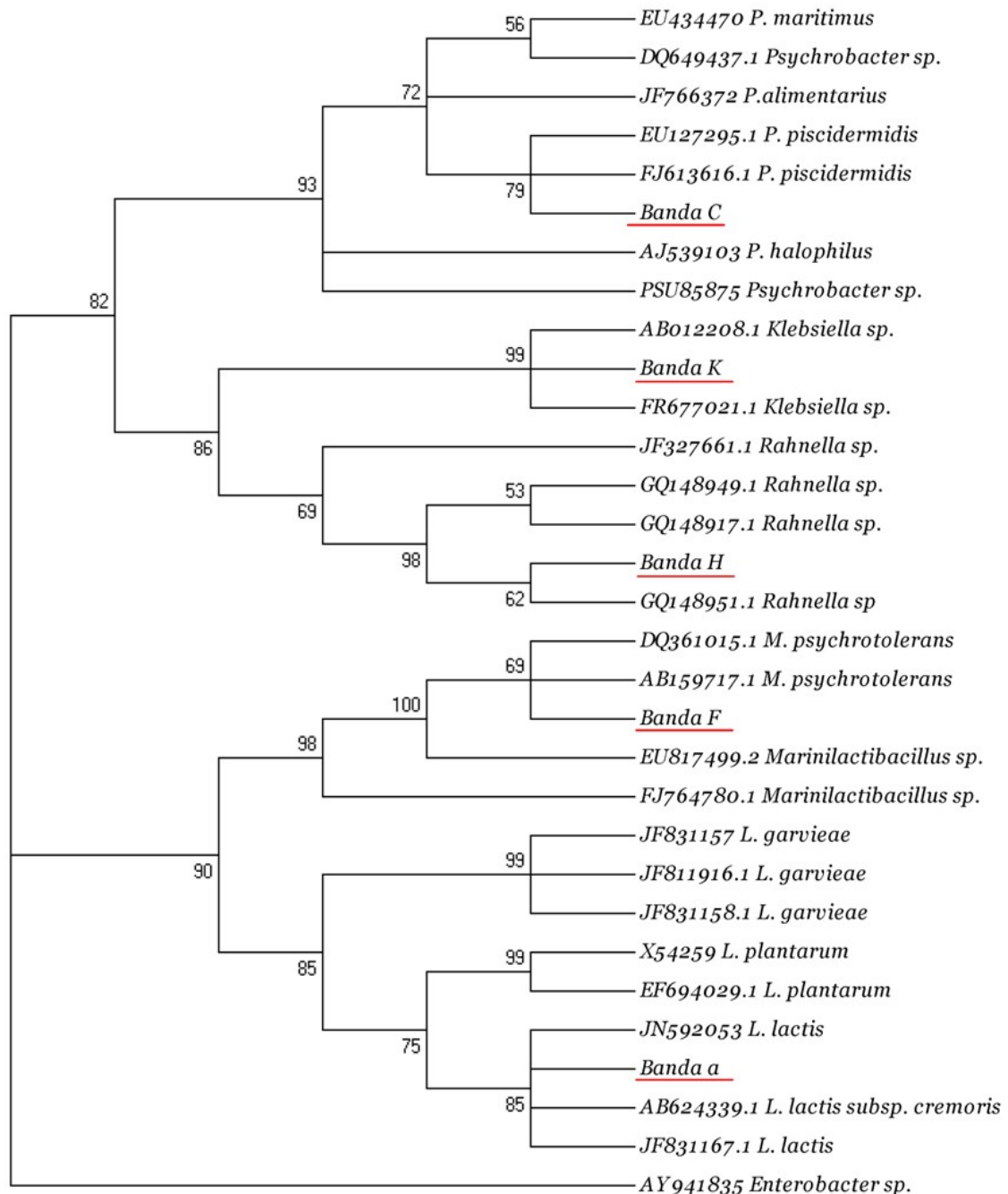


Figura 17. Relación filogenética de las bacterias identificadas por la secuenciación de bandas de la región V3 del gen ADNr 16S en el estudio del Queso Cotija. La relación filogenética fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou N y Nei, 1987). El árbol consenso inferido de entre 1,000 remuestros representa la relación entre las 31 secuencias analizadas (Felsenstein, 1985). El valor que se muestra junto al nodo, de donde se derivan las ramas del árbol corresponde al porcentaje en el que fueron asociadas las secuencias durante el análisis por bootstrap con 1,000 remuestros (Felsenstein, 1985). La distancia de la relación fue calculada usando el método de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del grupo de secuencias analizadas. Cada una de las secuencias analizadas tenía 176 posiciones. El análisis fue realizado empleando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

También se realizó un análisis filogenético para las bandas amplificadas de la región V1. En la Figura 18, se muestra el árbol consenso inferido por el método de Neighbor-Joining. Se analizaron 37 fragmentos de 143 posiciones, 5 secuencias de bandas (8, 9, 38, 53 y 55) y 32 secuencias obtenidas del GenBank pertenecientes a los géneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Staphylococcus*, además de una secuencia de *E. coli* incluida como grupo externo. El análisis de Bootstrap se realizó con 1,000 remuestreos. El árbol inferido coloca a la banda 8 (identificada como *E. gallinarum*) en un grupo dentro del género de *E. gallinarum* diferenciándola de las especies de *E. faecium* y *E. faecalis* halladas en otro grupo. De la misma manera, a la banda 9 (identificada como *L. garviae*) la agrupa muy cercana a las especies de *L. garviae* y a la banda 38 (identificada como *L. lactis*) la coloca en un grupo diferente junto a las especies de *L. lactis*, por lo que se logra una buena identificación a nivel de especie, a pesar de que estas dos últimas pertenecen al mismo género de *Lactococcus*.

En ese mismo árbol se coloca a la banda 53 identificada como *B. pumilus* dentro de un grupo donde se encuentran secuencias que pertenecen a microorganismos de esta misma especie, diferenciándola de *B. subtilis*. Y por último, en el caso de la banda 55 identificada como *S. aureus*, se observa que también queda agrupada junto a las secuencias correspondientes a esta misma especie, dejando en otros grupos a las demás especies de *Staphylococcus*. Por lo tanto, la confiabilidad sobre la identidad obtenida de las secuencias de la Tabla 9, es mayor.

La utilización de las regiones V1 y V3 para la identificación de la microbiota de estudio fue de mucha utilidad, ya que junto con la aplicación de métodos de inferencia filogenética, se puede llegar a obtener una identidad de forma más precisa.

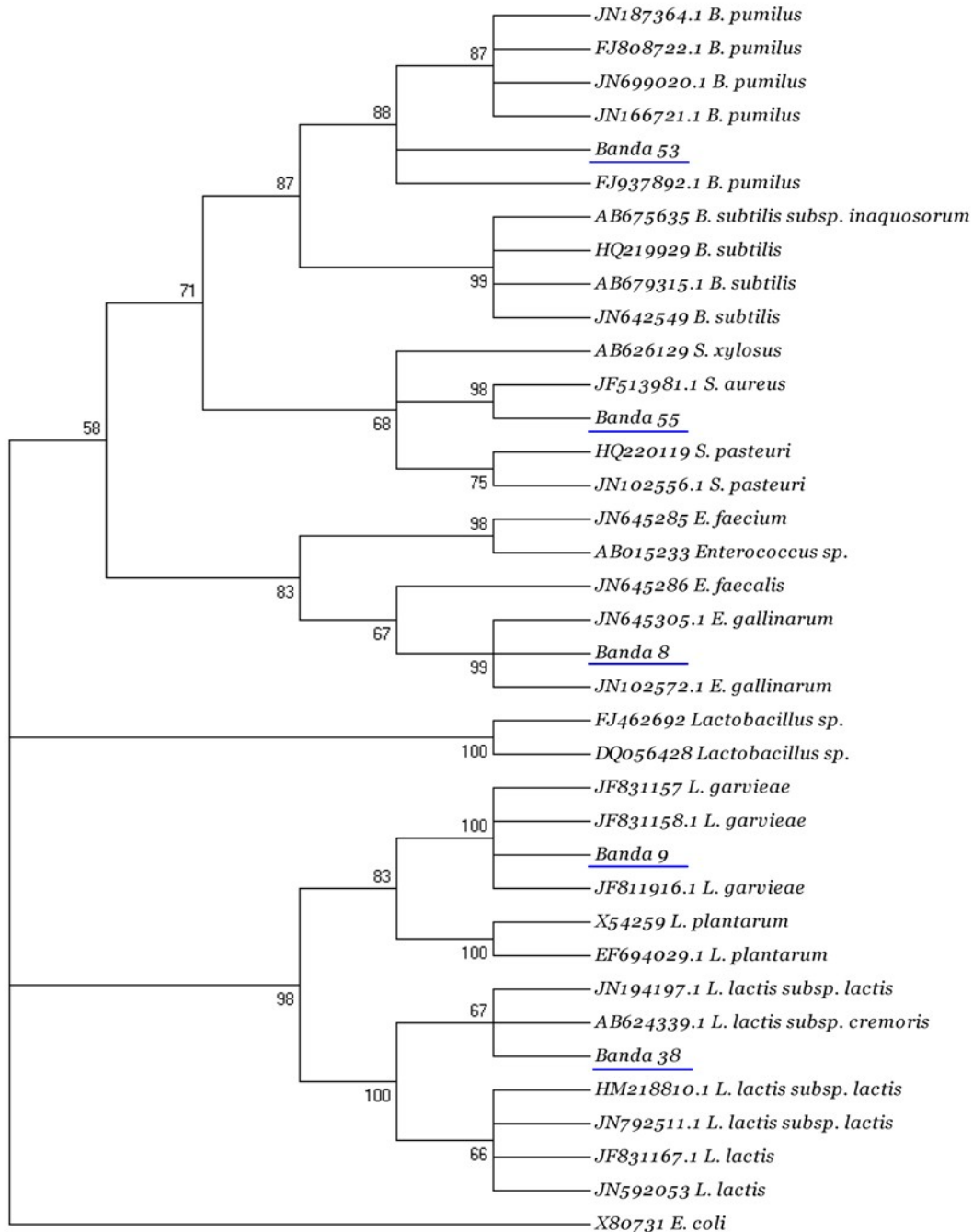


Figura 18. Relación filogenética de las bacterias identificadas por la secuenciación de bandas de la región V1 del gen ADNr 16S en el estudio del Queso Cotija. La relación filogenética fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou N y Nei, 1987). El árbol consenso inferido de entre 1,000 remuestreos representa la relación entre las 37 secuencias analizadas (Felsenstein, 1985). El valor que se muestra junto al nodo, de donde se derivan las ramas del árbol corresponde al porcentaje en el que fueron asociadas las secuencias durante el análisis por bootstrap con 1,000 remuestreos (Felsenstein, 1985). La distancia de la relación fue calculada usando el método de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del grupo de secuencias analizadas. Cada una de las secuencias analizadas tenía 143 posiciones. El análisis fue realizado empleando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

10. CONCLUSIONES

En la elaboración artesanal del queso Cotija mexicano, la actividad lipolítica de los microorganismos presentes tiene gran importancia en el sabor y olor característicos del queso. Prueba de ello, es la presencia de lipolíticos en todas las muestras analizadas y sorprendentemente también en la sal de grano. Los hallados en la cuajada salada son los importantes para el inicio de la maduración.

A pesar de las diferencias en las cuentas microbiológicas obtenidas en muestras de ambos ranchos, se observó una similitud entre los géneros de la microbiota lipolítica hallada. Mayoritariamente microbiota Gram positiva. La diferencia radica básicamente en la deficiente práctica de higiene observada durante todo el proceso de elaboración del Cotija auténtico, en el rancho de Michoacán.

La principal población de bacterias lipolíticas en ambas regiones, pertenece a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Lactococcus*; además de bacterias no cultivables de piel humana o plantas halladas principalmente en muestras del Rancho de Michoacán. Éstas son indicativas del proceso de manipulación durante la producción del queso, lo que pone de manifiesto la importancia de la higiene del productor.

Aunque en estudios anteriores con el queso Cotija, se indica la presencia de levaduras lipolíticas, no se halló presencia de éstas en la cuajada salada, lo que indica que éstas se pueden incorporar en etapas tardías de la maduración, tal vez cuando la acidez del queso aumenta y la competencia por los nutrientes es menor. Tampoco se hallaron hongos.

El proceso de salado es determinante de la microbiota que participará en la maduración del queso Cotija. Se incorporan microorganismos y se seleccionan otros.

El proceso manual de salado en seco es un paso importante en términos de inoculación de microbiota de ambientes marinos. Microorganismos como *Marinilactobacillus psychrotolerans*, *Psychrobacter* sp. y bacterias del género *Bacillus* provienen de la sal de grano, los dos últimos presentan buena actividad lipolítica.

El género *Staphylococcus* se identificó como parte de la microbiota lipolítica presente en todas las etapas de manufactura analizadas. La presencia de *S. aureus* cuestiona la calidad higiénica del producto.

Lactococcus lactis fue hallado en muestras de leche y cuajada salada, lo que indica su presencia al inicio del proceso de elaboración, manteniéndose como especie dominante hasta etapas tempranas de la maduración.

Bacillus pumilus es un microorganismo hallado en el queso Cotija madurado y se encontró presente en la cuajada fresca, por lo que se puede concluir que forma parte de la microbiota inicial y final de la maduración.

La técnica del DGGE tiene un bajo poder discriminativo cuando se obtiene múltiple bandeo, pero esta técnica es considerada como una caracterización preliminar de aislados, que se vuelve más específica, si se usan cebadores especie-específicos.

En este estudio se logró ver las diferencias entre los microorganismos aislados, pero por el múltiple bandeo que se obtiene, se aconseja probar cebadores más específicos o utilizar otra técnica molecular para complementar los resultados.

El uso de un estudio polifásico fue necesario para tener una visión más amplia de la comunidad bacteriana de este sistema microbiológico complejo.

El análisis molecular puede ser mejorado mediante la utilización de otra secuencia diana (ejemplo, Rec A) o por el uso de otro método, por ejemplo, por la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) o mediante la construcción de una biblioteca.

11. ANEXOS

Método del fenol-cloroformo-isoamílico.

1. Tomar células de un cultivo puro, agregar 150 μ L del buffer TE.
Agitar 5 minutos en vortex (hasta disolver totalmente, si es necesario ayudarse con una pipeta automática). Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
Eliminar el sobrenadante (con esto se lleva acabo un lavado).
2. Agregar 150 μ L de TE. Resuspender con ayuda de una pipeta, agitar.
3. Adicionar 20 μ g de lisozima, agitar en vórtex.
4. Incubar a 37 °C por 30 minutos, agitar.
5. Adicionar 10 μ L de proteinasa K (20 μ g/ml). Agitar.
6. Incubar en hielo por 5 min.
7. Adicionar 10 μ L de SDS al 10%, agitar.
8. Incubar a 37 °C por 40 minutos.
9. Enfriar a temperatura ambiente. Agregar 200 μ L de NaCl 6M.

(La adición de SDS y NaCl, es para desestabilizar los agregados protéicos y conferir carga, respectivamente, lo cual hace eficiente la remoción de proteínas durante la extracción con fenol-cloroformo-isoamílico.
10. Adicionar 400 μ L de una solución de fenol- cloroformo-isoamílico (25:24:1) de la marca SIGMA, en la campana. Agitar vigorosamente por 30 s (remoción de proteínas).
11. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
12. Recuperar la fase acuosa (la superior, que contiene el ADN) y transferir a un tubo eppendorf limpio, desechar fase orgánica (la inferior) .
13. Repetir la extracción (del paso 11-13), hasta que la interfase (proteínas) sea nula.
14. Transferir la fase acuosa (la superior) a un tubo eppendorf (1.5 mL) limpio.
15. Adicionar 1 mL de etanol al 100% frío, invertir el tubo de 2 a 5 veces e incubar en el congelador 1 hora. De esta manera se favorece la precipitación del ADN.
16. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4 °C (obtenemos todo el pellet).

-
17. Lavar el precipitado con 300 μL de etanol al 75%, agitar.
 18. Centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$.
 19. Desechar el etanol y dejar que se evapore el remanente a temperatura ambiente.
 20. Resuspender el pellet en 100 μL del buffer TE.

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

Purificación del ADN con RNasa

- ❖ Agregar a los 100 μL de solución de ADN, 20 μL de RNasa (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
- ❖ Incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.
- ❖ Adicionar 100 μL de NaCl 6M.
- ❖ Realizar una extracción con 400 μL de una solución de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) de la marca SIGMA (para eliminar proteínas remanentes como la RNasa).
- ❖ Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- ❖ Seguir el protocolo anterior, a partir del paso 14.

1. Agregar al pellet de células 1 mL del Buffer de lisis + lisozima (punta de espátula), agitar en el vórtex. Incubar a 37 °C por 30 minutos.

Nota: para pellet de levaduras o de muestras de alimentos agregar perlas de vidrio junto con el buffer de extracción.

2. Agregar 10 µL de proteinasa K y agitar. Incubar a 65 °C por 30 minutos.
3. Colocar 250 µL de cloroformo, agitar. Centrifugar por 5 minutos a 10,000 rpm. Recuperar el sobrenadante.
4. Agregar por cada 0.5 mL de sobrenadante, 0.5 mL del Genomic Bind Buffer. Agitar. (Nota: si hay precipitación, centrifugar dos minutos a 14,000 rpm).
5. Pasar el sobrenadante a través de la columna para ADN (DNA Binding Column). Centrifugar un minuto a 1000 rpm. Desechar el filtrado.
6. Lavar la columna con 700 µL del Genomic Wash Buffer. Centrifugar un pulso.
7. Lavar la columna con 850 µL de etanol al 75%. Este paso se realiza por triplicado.
8. Secar la columna con un pulso de centrifugación.
9. Eluir el ADN de la columna con 100 µL del buffer 1X TE (buffer de elusión). Incubar a 65 °C por 10 minutos.
10. Centrifugar un minuto a 14,000 rpm.

ANEXO 3**Condiciones de reacción para la amplificación de la región V3 y V1 por PCR**

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN V3 DEL GEN 16S ADNr**Cuadro 1.** Componentes de reacción utilizando la *Taq* polimerasa.

Reactivos	Conc. inicial	Conc. Final	Una Rx (µL)	Para 25 Rx's (µL)
Amortiguador	10X	1X	10	250
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	5	125
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	8	200
Primer 338F clamp	10 µM	0.4 µM	4	100
Primer 518R	10 µM	0.4 µM	4	100
<i>Taq</i> . diluida (INVITROGEN)	5 U	0.04 U/rx	0.8	20
Agua			28.2	705
Molde		200-250 ng/rx	40	
Volumen de reacción			100 µL	

Rx: Reacción.

Cuadro 2. Componentes de reacción utilizando la *Pfu* DNA polimerasa.

Reactivos	Conc. inicial	Conc. Final	Una Rx (µL)	Para 10 Rx's (µL)
<i>Pfu</i> buffer con MgSO ₄	10X	1X	5	50
dNTP's	10 mM	0.2 mM	1	50
Primer 338F clamp	10 µM	0.4 µM	2	20
Primer 518R	10 µM	0.4 µM	2	20
<i>Pfu</i> DNA polimerasa	2.5 U	1.25 U/ rx	0.5	5
Agua			20-25	155
Molde		200-250 ng/rx	15-20	–
Volumen de reacción			50 µL	

Rx: Reacción.

Las condiciones mostradas en el Cuadro 1, se llevaron a cabo utilizando la polimerasa *Taq* Platinum, marca Invitrogen. Al final, se decidió utilizar una DNA polimerasa con actividad de exonucleasa o de reparación, por lo que se utilizó la *Pfu* DNA polimerasa, de la marca Fermentans, con las condiciones citadas en el Cuadro 2. A la mezcla de reacción se le agregó el ADN molde, la enzima DNA polimerasa se agregó al final, en ambos casos.

Los tubos de reacción se llenaron con las cantidades indicadas y se corrieron a los ciclos mostrados en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones del Termociclador (Marca Techgene, Techne)

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

Tiempo aprox. 2.5 horas

(Muyzer *et al.*, 1999).

Al final de la reacción se obtienen amplicones de aproximadamente 220 pb.

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN V1 DEL GEN 16S ADNr

Cuadro 4. Componentes de reacción

Reactivos	Conc. inicial	Conc. Final	Una Rx (μL)	Para 5 Rx's (μL)
<i>Pfu</i> buffer con MgSO ₄	10X	1X	5	25
dNTP's	10 mM	0.2 mM	1	5
Primer pA	10 μM	0.4 μM	2	10
Primer gamma	10 μM	0.4 μM	2	10
<i>Pfu</i> DNA polimerasa	2.5 U	1.25 U/ rx	0.5	2.5
Agua			20-25	100
Molde		200-250 ng/ rx	15-20	-
Volumen de reacción			50 μL	

Rx: Reacción.

Cuadro 5. Condiciones del termociclador (Marca Techgene, Techne)

No. Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	3 min
34	94 °C	1 min
	65 °C	1.30 min
	72 °C	2 min
1	72 °C	15 min

Tiempo aprox. 3.0 horas

(Pascual, 1999)

Al final se espera un amplicón de aproximadamente 350 pb.

Conservación en perlas de vidrio.

- Inocular 4 mL de caldo nutritivo o caldo YM (según sea el caso) estéril, tomando la asada de una colonia pura (preferentemente de un cultivo recién crecido), de la cepa que se desea conservar; en un tubo para centrifuga de 50 mL.
- Incubar a 37 °C por 24 horas.
- Ya crecidos los microorganismos (observar turbidez en el tubo), medir la densidad óptica (D.O) a 600nm, de la siguiente forma:

Tomar 0.1 mL del medio inoculado, diluir en 0.9 mL de caldo nutritivo estéril y colocar en una celda. A esta dilución se le mide la D. O._{600nm} (debe ser mayor de 0.5). Si no se obtiene esta D.O. dejar incubar otras 24 horas hasta obtenerla.
- Una vez que se alcanza la D.O adecuada, centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos.
- Colocar el mosto de células obtenidas, en 2 mL de caldo nutritivo con glicerol al 15% estéril. Homogenizar bien.
- Llenar con 0.6 mL del medio (obtenido en el paso anterior) un vial que contenga de 5 a 10 perlas de vidrio o chaquiras, previamente estériles.
- Eliminar el exceso de medio en cada vial, con ayuda de una pipeta pasteur estéril.
- Etiquetar los viales con el nombre de cada cepa y la fecha.
- Almacenar en el ultracongelador.

GE Healthcare. DNA Silver Staining Kit. Plus One

1. Colocar la solución fijadora (fixing solution) y dejar el gel 1 hora en agitación. NOTA: se puede dejar toda una noche.
2. Transcurrido el tiempo, retirar la solución fijadora, con ayuda de una jeringa y agregar la solución 2 (silver solution), la que contiene la plata. Dejar en agitación por 30 minutos.
3. Preparar las soluciones 3 y 4 (developing and stopping & preserving solutions).
4. Retirar con la jeringa, la solución 2 (residuos de plata). NOTA: todos los residuos con plata se colectan para su tratamiento posterior.
5. Después, realizar un lavado con 125ml de agua desionizada estéril (residuos de plata).
6. Terminado el lavado, agregar la solución 3 (developing), dejar por 6 minutos o hasta que se empiecen a visualizar las bandas. NOTA: no exceder de 15 minutos, porque se empieza a quemar el gel, la solución 3 tiene una caducidad de una hora después haber sido preparada.
7. Cuando aparecen las bandas, desechar la solución 3 (residuos de plata) y agregar la solución 4 (stopping & preserving), esta conservará al gel.
8. Conservar el gel con agua desionizada estéril.

➤ DNA POLIMERASAS

	Taq Platinum	Pfu DNA Polimerasa
Marca	INVITROGEN	FERMENTANS
Descripción	<p>La Platinum <i>Taq</i> polimerasa es una <i>Taq</i> DNA polimerasa recombinante, que contiene anticuerpos que bloquean la actividad polimerasa a temperatura ambiente. Inicios con temperaturas altas en la reacción de PCR, incrementa la sensibilidad, especificidad y la producción.</p> <p>El uso de estos anticuerpos ayuda a reducir los requerimientos en la optimización de la PCR y los contaminantes.</p>	<p><i>Pfu</i> DNA Polimerasa es una DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>, una arqueobacteria hipertermofílica. La enzima cataliza la incorporación de nucleótidos dentro de la cadena duplex de DNA en dirección 5'→3' en presencia de Mg²⁺ a 70-80 °C.</p> <p>A diferencia de la <i>Taq</i> DNA Polimerasa, la <i>Pfu</i> DNA Polimerasa, muestra actividad exonucleasa (reparadora), que permite la corrección de errores en la incorporación de nucleótidos.</p>
Fuente	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> .

La actividad de exonucleasa de la *Pfu* DNA Polimerasa, puede degradar los primers, por lo que es muy recomendado mantener la mezcla de reacción en hielo mientras se inicia la reacción de PCR (recomendación del proveedor asentadas en la hoja de especificación). La *Taq* Platinum utiliza como fuente de magnesio el MgCl₂ y la *Pfu* DNA Polimerasa, el MgSO₄.

12. BIBLIOGRAFÍA.

-
- Albenzio, M., Corbo, M. R., Rahman, S. U., Fox, P. F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobbetti, M. (2001).** Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *Int J Food Microbiol* **67**, 35-48.
- Albuquerque, P., Mendes, M. V., Santos, C. L., Moradas-Ferreira, P., Tavares, F. (2009).** DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Sci Total Environ* **407**, 3641-3651.
- Álvarez, B. R., Barragán, L. E., Chombo, M. P. (2005).** Reglas de uso. Marca colectiva, Queso Cotija Región de Origen. México.
- Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. (1999).** Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-Independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5464-5473.
- Barkema, H. W., Green, M. J., Bradley, A. J., Zadoks, R. N. (2009)** *Invited review:* The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy Sci.* **92**, 4717–4729.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan N. L., Cogan T. M. (2001).** Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* **11**, 259-274.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Ercolini, D., Moschetti, G., Villani, F. (2003).** Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of *Staphylococci* from Italian fermented sausages. *Syst Appl Microbiol* **26**, 423-433.
- Bravo, A. (2008).** Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de Queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México.
- Casalta, E., Montel, M. C. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactococcus genus. *Int J Food Microbiol.* **126(3):271-273.**
- Casamayor, E. O., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G., Amann, R. (2002).** Micro-heterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1706-1714.
- Cocolin, L., Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I., Beimfohr, C. (2007).** Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* **120**, 100-109.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2001).** Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5113–5121.
- Collins, Y. F., McSweeney P.L., Wilkinson, M.G. (2003).** Lypolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int Dairy J* **13**, 841-866.
- Crosby, L. D., Criddle, C. S. (2003).** Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* **34**, 790-802.
- Chihara-Siomi, M., Yoshikawa, K., Oshima-Hirayama, N., Yamamoto, K., Sogabe, Y., Nakatani, T., Nishioka, T., Oda, J. (1992).** Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys* **296**, 505-513.

-
- Deetae, P., Bonnarne, P., Spinnler, H. E., Helinck, S. (2007).** Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 1161-1171.
- Dherbécourt, J., Falentin, H., Canaan, S., Thierry, A. (2008).** A genomic search approach to identify esterases in *Propionibacterium freudenreichii* involved in the formation of flavor in Emmental cheese. *Microb Cell Fact* **7**, 16-30.
- Díaz, G., Wachter, C. (2003).** Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev Latinoam Microbiol* **45**, 30-40.
- Ercolini, D. (2004).** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods* **56**, 297-314.
- Entrala, C. (2000).** Técnicas de análisis del ADN en Genética Forense. PCR. Laboratorio de ADN forense. Depto. de Medicina Legal. Universidad de Granada, España. Disponible en línea: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>
- Felsenstein J. (1985)** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- Fernández, L., Beerthuyzen, M. M., Brown, J., Siezen, R. J., Coolbear, T., Holland, R., Kuipers, O. P. (2000).** Cloning, characterization, controlled over expression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1360–1368.
- Flórez, A. B., Mayo, B. (2006).** Microbiology diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol* **110**, 165-171.
- Fontana, C., Cocconcelli P. S., Vignolo, G. (2005).** Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int J Food Microbiol* **103**, 131-142.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. (2000).** Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers, Inc. MA., U.S.A. pp. 153-216.
- García, V. (2006).** Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del Queso Cotija. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México.
- Hood, S. K. & Zottola, E. A. (1995).** Biofilms in food processing. *Food Control* **6**, 9-18.
- Inmaculada Meseguer S. (2004).** Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. Ciencia e Investigación VII ,(2), 13-17.
- Irlinger, F., Mounier, J. (2009).** Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current opinion in Biotechnology* **20**, 142-148.
- Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y., Yamasato, K. (2003).** *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 711-720.
- Jany, J-L., Barbier, G. (2008).** Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol* **25**, 839-848.
- Jurkovic, D., Krizková, L., Sojka, M., Belicová, A., Dusinský, R., Krajcovic, J., Snauwaert, C., Naser, S., Vandamme, P., Vancanneyt, M. (2006).** Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *J Gen Appl Microbiol.* **52(6):329-37.**
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos J. N., Lee, H., Trevors, J. T. (2004).** Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* **58**, 169-188.

-
- Kives, J., Guadarrama, D., Orgaz, B., Rivera-Sen, A., Vazquez, J., SanJose C. (2005).** Interactions in Biofilms of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris and *Pseudomonas fluorescens* Cultured in Cold UHT Milk. *J. Dairy Sci.* **88**, 4165–4171.
- Klappenbach, J. A., Bunbar, J. M., Schmidt, T. M. (2000).** rRNA Operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1328-1333.
- Kongo, J., Gomes, A., Malcata, F. (2008).** Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cows milk. *J Food Prot* **71**, 986-992.
- Lafarge, V., Ogier, J-C., Girard, V. (2004).** Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5644-50.
- Latorre, A. A., Van Kessel J. S., Karns., J. S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A. K., Boor, K, J., Jayarao, B. M., Houser, B. A., Daugherty, C. S., Schukken, Y. H. (2010).** Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* **93**, 2792–2802.
- Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., McLaughlin, J. (2008).** Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the Uk. *Food Microbiol* **25**, 304-12
- Marilley, L., Casey, M. G. (2004).** Flavors of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol* **90**, 139-159.
- Martínez, P. D. (2009).** Identificación de levaduras en el Queso Cotija por métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP y DGGE). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México.
- Masco, L., Vanhoutte, T., Temmerman, R., Swings, J., Huys, G. (2007).** Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *RecA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *Int J Food Microbiol* **113**, 351-357.
- Meroth, C. B., Hammes W. P., Hertel, C. (2003).** Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7453-61.
- Morales, P., Feliu, I., Fernández-García, E., Nuñez, M. (2004).** Volatile compounds produced in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *J Food Prot.* **67**, 567-573.
- Muyzer, G., De Waal, E., Uitterlinden, A. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1993).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., Jannasch, H. W. (1995).** Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* **164**, 165-72.
- Muyzer, G. (1999).** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**, 317-322.
- Navia, D. P., Villada, H. S., Mosquera, S. A. (2010).** Las biopelículas en la industria de alimentos. Artículos de revisión de un tema o de síntesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia **(8)**, 118-128.
- NMX-F-700-COFOCALEC-2004.** Sistema Producto Leche - Alimento - Lácteo - Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.

-
- NMX-F-730-COFOCALEC-2008.** Sistema Producto Leche - Alimentos - Lácteos - Prácticas de higiene recomendadas para la obtención de leche.
- NOM-092-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-110-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico.
- NOM-111-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-121-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996).** Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**, 5636-5643.
- Pascual, R. C. (1999).** Molecular taxonomic studies on some high G+C content Gram-positive bacteria from human and animal. Ph. D. Thesis. The University of Reading. Institute of Food Research, Reading Laboratory. U. K.
- Pontes, D. S., Lima-Bittencourt, C. I., Chartone- Souza, E., Amaral Nascimento, A. M. (2007).** Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 463-473.
- Prim, N., Blanco, A., Martínez, J., Pastor, F. I. J., Diaz, P. (2000).** estA, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. *Res Microbiol* **151**, 303-12.
- Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans A. D., de Vos W. M., Vaughan E. E. (2002).** Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16s rRNA. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1882-1892.
- Randazzo, C. L., Vaughan E. E., Caggia, C. (2006).** Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *Int J Food Microbiol* **109**, 1-8.
- Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G., Cocolin, L. (2004).** Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *Int J Food Microbiol* **97**, 277-284.
- Rea, C., Görges, S., Gelsomino, R., Brennan, N. M., Mounier, J., Vancanney, M., Scherer, S., Swings, J., and Cogan, T. M. (2007).** Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *J Dairy Sci* **90**, 2200-2210.
- Rivas, A. (2004).** "Queso Cotija y Chihuahua". Lácteos. p. 15.
- Saitou N & Nei M (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406-425.
- Seeley, W. H., Van Demark, J. P. (1972).** Microbes in action. Segunda edición. Editorial Freedman and Company.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommanz, S., Van den Broek, J., Van Mil, S., Wernars, K. (2001).** Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2284-2291.
- Tamura K & Nei M (1993)** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526.

-
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007)** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Sendra, E., Saldo, J., Ferragut, V., Guamis, B. (2000)**. Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research Int.* **33**, 311-316.
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R., Guamis B. (2002)**. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **3**, 295–307.
- Valbuena, E., Briñez, W. (2007)**. Microbiología de la leche cruda. Ciencia y Tecnología de la leche. Facultad de Ciencias Veterinarias de Venezuela. Disponible en línea:<http://members.tripod.com.ve/tecnologia/microteo.htm#Microorganismos%20de%20Importancia%20en%20Leche%20Cruda>
- Van Hannen, E., Gzwart, P., van Agterveld, Gons, H., Ebert, J., Laanbroek, H. (1999)**. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl Environ Microbiol* **65**, 795-801.
- Vanderzant, C., Splittstoesser, Don F. (1992)**. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Third edition. Printed in USA. American Public Health Association.
- Voigt, D. D., Patterson M. F., Linton, M., Kelly, A. L. (2011)**. Effect of high-pressure treatment of milk prior to manufacture on ripening of Camembert cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **12**, 1–5.
- Von Wintzingerode, F. V., Göbel, U. B. (1997)**. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 213-229.
- Zúñiga, A. B. (2009)**. Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México.