

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL QUESO COTIJA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en C. REBECA FLORES MAGALLÓN

DIRECTORES:

DR. JOSÉ ALBERTO NARVÁEZ ZAPATA

DR. JOSÉ LUIS MONTAÑÉZ SOTO

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL QUESO COTIJA

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

M. en C. REBECA FLORES MAGALLÓN

DIRECTORES:

DR. JOSÉ ALBERTO NARVÁEZ ZAPATA

DR. JOSÉ LUIS MONTAÑÉZ SOTO

CARTA DE CESION DE DERECHOS



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

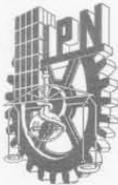
En la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, el día 12 de Noviembre del 2012, el (la) que suscribe Rebeca Flores Magallón, alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B081205, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. José Alberto Narváez Zapata y Dr. José Luis Montañez Soto y cede los derechos del trabajo intitulado "Caracterización de la microbiota asociada al queso Cotija" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben de reproducir el contenido textual, graficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. Del Maestro esquina con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899-9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Rebeca Flores Magallón

Nombre y firma

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas siendo las _____ horas del día _____ del mes de _____ del _____ se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de _____ CBG para examinar la tesis titulada:

“Caracterización de la microbiota asociada al queso cotija”

Presentada por el alumno:

FLORES

Apellido paterno

MAGALLON

Apellido materno

REBECA

Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	2	0	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

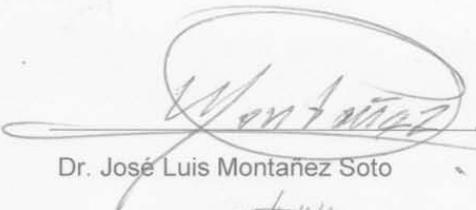
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



Dr. José Alberto Narváez Zapata



Dr. José Luis Montañez Soto



Dr. Gaspar Manuel Parra
Bracamonte



Dra. Claudia Patricia Larralde Corona



Dr. Xianwu Guo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



El presente trabajo que lleva por título **“Caracterización de la microbiota asociada al queso Cotija”**, se realizó en el laboratorio de Laboratorio de Microbiología de los Alimentos del CIIDIR-IPN Unidad Michoacán y en el laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José Alberto Narváez Zapata y del Dr. José Luis Montañéz Soto, y fue financiado por los Proyectos: Fondo Sectorial de Investigación Ambiental” para México, Proyectos FOSEMARNAT-2004-01-280 y los proyectos “Caracterización de la microbiota asociada al queso Cotija” y “Desarrollo de procesos metodológicos para la evaluación de la microodiversidad eucariotica y procariotica en diferentes sistemas ambientales” (Proyectos SIP 20090098 y 20100700, respectivamente).

DEDICATORIA

A dios

Porque junto a Él he recorrido un largo camino que me ha dado muchos momentos de alegrías como también de penurias, que al final han sido valiosas enseñanzas y lecciones de vida, que me han llevado al lugar donde estoy y ser la persona quien soy.

Al Dr. José Alberto Narváez Zapata

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Narváez, porque es una excelente persona y por haber hecho posible la realización de este trabajo, por compartir conmigo sus conocimientos científicos, su apoyo, sus consejos se lo agradezco mucho de todo corazón, pero sobre todo por su amistad, por haberme tolerado todo este tiempo y por toda su comprensión. Lo quiero mucho.

Al Dr. José Luis Montañez Soto

Primeramente por haberme brindado en todo momento su amistad, sus conocimientos, sus consejos. Ya sabe que lo quiero mucho.

A mis padres

Alfonso Flores Hernández y Rebeca Magallón Núñez a quien les dedico mi tesis de doctorado, ya que ellos siempre han estado conmigo y me han brindado todo su amor y apoyo, comprensión e incluso me acompañaron en todo esta etapa. Los amo muchisisisimo.

A mis hijas

Camila Emireth y Miranda por estar siempre conmigo y también por acompañarme en todo momento y sobre todo por tenerme paciencia cuando las tuve que dejar por estar con mi

AGRADECIMIENTOS

A mi amiga

Minerva Núñez Sánchez, por todo su apoyo incondicional en la realización de mi trabajo de investigación y sobre todo por su amistad. Te quiero mucho mine.

A mi comité tutorial

A la Dra. Patricia Larralde, Dr. Manuel Parra por todo su apoyo y todas sus aportaciones y comentarios para mejorar mi desarrollo profesional. Se los agradezco mucho. Así como al Dr. Miguel Ángel Reyes López, al Dr. Xianwu Guo y a la Dra. Hortencia Mena Violante.

A mi hermano y cuñada

Alfonso Flores Magallón, porque gracias a él pude ingresar a la región de origen del queso cotija, además de que me ayudo con la colecta de los quesos, transporte, encuesta, etc., a mi cuñada Adelita, porque también fue parte importante en el trabajo de campo. Los quiero mucho y gracias por todo su apoyo, sin su ayuda no hubiese sido posible todo el trabajo de campo.

Al departamento de posgrado del Centro de Biotecnología Genómica

Porque durante mi doctorado me estuvieron apoyando con los tramites, pero muy especialmente a la Sra. Aleyda Flores, quien siempre me tendio la mano cuando ocupe que me ayudara con los documentos del doctorado. Muchas gracias.

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE CUADROS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iv
SIMBOLOS.....	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. La leche: composición y características.....	3
2.1.1. Calidad higiénica de la leche	4
2.1.2. Calidad sanitaria de la leche.....	4
2.1.3. Calidad microbiológica de la leche	5
2.1.4. Factores que afectan la calidad de la leche.....	5
2.1.4.1. Buenas Prácticas de Higiene (BPH).....	5
2.1.4.2. Recuento de Organismos Coliformes	6
2.1.4.3. Recuento de Células Somáticas (RCS)	6
2.1.4.4. Recuento de Organismos Mesófilos Aerobios	6
2.1.4.5. Listeria	7
2.1.4.6. Brucelosis	7
2.1.4.7. Mastitis.....	8
2.1.4.8. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.2. El queso	9
2.2.1. Clasificación de los quesos	10
2.2.2. Proceso de elaboración de los quesos	11
2.2.3. Microbiota causante de la producción de características de los quesos.....	13
2.2.4. Quesos mexicanos genuinos	14
2.3. Queso cotija.....	16
2.3.1. Antecedentes históricos.....	16
2.3.2. Región de origen.....	17
2.3.4. Proceso de elaboración del queso cotija.....	18
2.3.5. Características del queso.....	18
2.3.6. Marca colectiva queso región de origen	19
2.4. Microbiología de los quesos.....	20
2.4.1. Caracterización de microorganismos presentes en el queso.....	21
2.4.2. Bacterias Acido Lácticas (BAL)	22
2.4.3. Bacterias Acido Lácticas no iniciadoras	28
2.5. BAL y calidad del queso	29
2.5.1. Otros microorganismos presentes en los quesos	31
2.6. Cultivos iniciadores.....	32

2.8.1. Tipificación molecular de microorganismos no cultivables en el queso	37
3. JUSTIFICACIÓN.....	39
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVOS	41
5.1. Objetivo general	41
5.2. Particulares.....	41
6. MATERIALES Y METODOS.....	42
6.1. Zona de colecta	42
6.2. Composición químico porcentual de la leche	43
El contenido de humedad, cenizas extracto etereo y carbohidratos totales en las diferentes muestras de leche se determinó de acuerdo a la metodología propuesta en la AOAC (2001).....	43
6.3. Calidad sanitaria del proceso de elaboración del queso cotija	43
6.4. Selección de las explotaciones lecheras y talleres de elaboración de queso ...	43
6.4.1. Selección de los puntos de muestreo.....	44
6.4.2. Toma de muestras.....	44
6.5. Análisis microbiológico.....	45
6.5.1. Implementación de BPH durante el proceso de elaboración del queso cotija.....	45
6.6. Caracterización de la microbiota asociada al queso cotija.....	47
6.6.1. Análisis físico-químico del queso cotija.....	47
6.6.2. Enumeración microbiológica del proceso de elaboración del queso cotija....	47
6.6.3. Aislamiento de bacterias y levaduras.....	48
6.6.4. Identificación de BAL.....	48
6.6.5. Identificación de levaduras	49
6.6.6. Aislamiento de microorganismos del queso para la identificación por métodos moleculares.....	50
6.6.7. Extracción del ADN de los aislados bacterianos.....	50
6.6.8. Extracción del ADN fúngico	51
6.6.9. Determinación de la integridad del material genético mediante electroforesis en gel de agarosa.....	52
6.6.10. Cuantificación del ADN obtenido	52
6.6.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	53
6.6.12. Secuenciación y análisis de los productos de PCR obtenidos	55
6.7. Elaboración de un cultivo iniciador	56
6.7.1. Capacidad de acidificación de la leche	56
6.7.2. Sensibilidad a antimicrobianos.....	56
6.7.3. Resistencia a productos de limpieza y desinfección	57
6.7.4. Capacidad de acidificación de la leche en presencia de antimicrobianos o productos de limpieza	57
6.7.5 Compatibilidad entre cepas	57
6.7.6. Preparación de los cultivos iniciadores	58
6.7.7. Elaboración del queso similar al cotija	58
6 7 8 Análisis sensorial de los quesos	59

7.1.1. Diagnóstico de las condiciones generales del proceso de elaboración del queso cotija	60
7.1.2. Composición porcentual química de la leche.....	63
7.1.3. Calidad sanitaria de la leche cruda entera	63
7.1.4. Análisis de utensilios y superficies	66
7.1.5. Determinación de OCT y Organismos Coliformes Fecales (OCF) en el proceso de elaboración del queso cotija.....	69
7.1.6. Recuento <i>Salmonella</i> sp y <i>Staphylococcus aureus</i> , en el proceso de elaboración del queso cotija	70
7.2. Implementación de BPH en el proceso de elaboración del queso cotija.....	71
7.3. Caracterización de la microbiota asociada al proceso de elaboración del queso Cotija.....	72
7.3.1. Análisis fisicoquímico del queso cotija	72
7.3.2. Enumeración microbiológica de los tiempos de muestreo del proceso de elaboración del queso cotija	73
7.3.3. Aislamiento e identificación de BAL del queso cotija.....	74
7.3.4. Aislamiento e identificación de levaduras del queso cotija	76
7.4. Elaboración de un cultivo iniciador	79
7.4.1. Identificación y capacidad acidificadora de las cepas	79
7.4.2. Sensibilidad a antimicrobianos.....	80
7.4.3. Sensibilidad a productos de limpieza de uso industrial	82
7.4.4. Selección de las cepas	84
7.4.5. Compatibilidad entre las cepas y elaboración de mezclas.....	80
7.4.6. Pruebas de preferencia de consumo queso cotija	80
8. DISCUSIÓN.....	82
8.1 Calidad sanitaria del proceso de elaboración del queso cotija.....	82
8.1.2. Calidad sanitaria del proceso de extracción de la leche después de la aplicación de las BPH.....	83
8.1.3. Calidad sanitaria del queso cotija.....	84
8.1.4. Caracterización fisicoquímica del queso cotija	86
8.2. Aislamiento e identificación de BAL y levaduras del queso cotija	90
8.2.1. Composición microbiana	90
8.2.2. Aislamiento de BAL.....	90
8.2.3. Aislamiento de levaduras del queso cotija.....	92
8.2.4. Utilización de las pruebas fenotípicas y genotípicas en la caracterización de microorganismos.....	93
8.3. Cultivos iniciadores.....	95
8.3.1. Capacidad acidificadora.....	96
8.3.2. Sensibilidad a antimicrobianos.....	96
8.3.3. Análisis sensorial de los quesos elaborados.....	99
9. CONCLUSIONES	102
10. PERSPECTIVAS	103
11. REFERENCIAS	104
ANEXO I	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración del queso cotija en la región de origen. A: Coagulación de la leche, B: Cortado y desuerado, C: Salado, D: Prensado, E: Moldeado y Desfajado; F: Proceso de maduración.....	19
Figura 2. Zona de producción en la región de origen del queso Cotija (Tomado de NMX-F-735-COFOCALEC-2011).	42
Figura 3. Contenido de Bacterias Mesofilas Aerobias en leche. Los Números en la parte superior de cada barra corresponden a los porcentajes relativos.....	64
Figura 4. Contenido de Organismos Coliformes Totales en leche. Los Números en la parte superior de cada barra corresponden a los porcentajes relativos.....	65
Figura 6. Composición microbiana durante el proceso de elaboración del queso cotija. A) Queso Artesanal Cotija, B) Queso semi-industrial. Los errores estándar en todos los valores son menores al 5%.....	74
Figura 6. Aislamiento de algunas BAL del proceso de elaboración del queso Cotija. A: <i>Lactobacillus</i> sp.; B: <i>Pediococcus</i> sp.; C: <i>Lb. casei</i> ; D: <i>Lactobacillus</i> sp.	75
Figura 7. Relaciones evolutivas de las muestras analizadas basándose en las secuencias 16S ADNr. Para este estudio solo se emplearon secuencias relacionadas del filo Firmicutes....	76
Figura 8. Aislamiento de algunas Levaduras del proceso de elaboración del queso Cotija. A: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ; B: <i>Kluyveromyces lactis</i> ; C: <i>Pichia guilliermondi</i> ; D: <i>Galactomyces</i> sp.	77
Figura 9. Relaciones evolutivas de las muestras analizadas basándose en las secuencias 16S ADNr. (A) Región ITS1–5.8S–ITS2, y (B) Región NL1–NL4 del ADNr.	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición general de la leche de bovino (por cada 100 g)*	4
Cuadro 2. Diferenciación de los géneros de bacterias lácticas. Car= <i>Carnobacterium</i> , Vag= <i>Vagococcus</i> , Ltob= <i>Lactobacillus</i> , Leuc= <i>Leuconostoc</i> , Aer= <i>Aerococcus</i> , Ped= <i>Pediococcus</i> . Ent= <i>Enterococcus</i> , Str= <i>Streptococcus</i> Lcoc= <i>Lactococcus</i> , Tetr= <i>Tetragenococcus</i>	49
Cuadro 3. Diagnóstico actual de las condiciones generales del proceso del queso cotija....	62
Cuadro 4. Composición de la leche con que se elabora el queso cotija	63
Cuadro 5. Estadístico en leche Bacterias Mesófilas Aerobias	66
Cuadro 6. Estadístico en leche Organismos Coliformes Totales	66
Cuadro 7. Evaluación sanitaria del equipo y utensilios de ordeña (UFC/cm ²), antes de la implementación de las BPH	67
Cuadro 8. Determinación de BMA y OCT (UFC/cm ²) en las manos de los trabajadores y ubres de las vacas durante el proceso de extracción de la leche.....	67
Cuadro 9. Evaluación de equipo y utensilios (UFC/cm ²) después de la implementación de las BPH.....	68
Cuadro 10. Evaluación de manos de los trabajadores y las ubres (UFC/cm ²) después de la implementación de las BPH durante el proceso de extracción de la leche.....	69
Cuadro 11. Recuento de OCT y OCF en el proceso de elaboración del queso cotija	70
Cuadro 12. Determinación de microorganismos patógenos en las diferentes etapas del proceso de elaboración del queso cotija	71
Cuadro 13. Características del queso cotija artesanal y semi-industrial (n=5).....	73
Cuadro 14. Disminución del pH de la leche debido a la acción de las BAL aisladas del queso cotija.....	79
Cuadro 15: Susceptibilidad de las cepas a diferentes concentraciones de cloxacilina	81
Cuadro 16. Susceptibilidad a la penicilina de las BAL aisladas del queso Cotija a diferentes concentraciones.	82
Cuadro 17. Sensibilidad al cloro de las BAL aisladas del queso cotija.....	83

Cuadro 19. Disminución del pH de la leche debido a la acción de las BAL aisladas del queso cotija y en presencia de antimicrobianos.....	86
Cuadro 20. Puntuaciones sensoriales de los quesos	81

ABREVIATURAS

ACE	Agar Cuenta Estándar
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosomal
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
BMA	Bacterias Mesófilas Aerobias
BPH	Buenas Prácticas de Higiene
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
BSA	Albumina de Bovino
CAMP	Cristie Atkins Munich-Peterson
CFR	Code of Federal Regulations
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
DO	Denominación de Origen
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
FAO	Organización para la Agricultura y Alimentación
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
HCl	Ácido clorhídrico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IMPI	Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
ITS	Espaciador Transcrito Interno
LB	Luria-Bertani
log	Logaritmo
MC	Marca Colectiva
MRS	Man Rogosa Sharpe

NSLAB	Non Starter Lactic Acid Bacteria
OC	Organismos Coliformes
OCT	Organismos Coliformes Totales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa
pH	Potencial de Hidrógeno
POE'S	Procedimientos Operativos Estándarizados de Saneamiento
RCS	Recuento de Células Somáticas
rpm	Revoluciones por minuto
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TBE	Trisma Base EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
USDA	United States Department of Agriculture

SIMBOLOS

%	Porcentaje
XVI	16
XIX	19
XX	20
Km²	Kilómetro cuadrado
°	Grado
Aw	Actividad de agua
L	Litro
cm	Centímetro
v/v	Volumen – Volumen
μl	Microlitro
N⁰	Número
C	Centigrado
T	Tonelada
β	Beta
A	Gama
CO₂	Dióxido de carbono
kg	Kilogramo
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
μm	Micrómetro
NaCl	Cloruro de sodio
g	Gramo
M	Molar
nm	Nanómetro
h	Hora
μg	Microgramo
mm	Milímetro
cm²	Centímetro cuadrado
ml	Mililitro
mm	Milímetro

RESUMEN

El queso cotija es un queso mexicano, artesanal, madurado, producido en la región de cotija Michoacán México desde hace 400 años. Posee gran aceptación en el mercado por sus características particulares de olor y sabor, las cuales provienen de su cuajado producido por los microorganismos presentes en el proceso de elaboración. Los microorganismos involucrados son homofermentadores (capaces de utilizar la lactosa de la leche y producir ácido láctico) y heterofermentadores (que como resultado de su metabolismo producen etanol, acetato y CO₂), principalmente. El presente trabajo contempla la caracterización fenotípica y molecular de la microbiota asociada al proceso de elaboración del queso cotija. El análisis se centra en la microbiota presente durante su elaboración, en la leche y utensilios utilizados durante este proceso, en el producto final y en la producción controlada de este queso utilizando algunos de los microorganismos aislados. Los resultados indican que el proceso de elaboración inicia con condiciones poco inocuas tanto en la leche como en los utensilios utilizados, y que estas primeras etapas de elaboración presentan cuentas microbianas de Bacterias aerobias mesofilas (5.9 UFC/ml) y de hongos (7.8 UFC/ml) muy elevadas, pero que a medida que avanza el proceso de maduración estas condiciones cambian para dar un producto inocuo y con una biota microbiana muy particular, caracterizada principalmente por bacterias ácido lácticas y levaduras. De esta forma, en el queso cotija que cuenta con tres meses de maduración, se aislaron 27 cepas microbianas, de las cuales, 16 fueron de bacterias y 11 de levaduras. Las bacterias se aislaron en medio MRS y para su caracterización se utilizaron pruebas de tinción de Gram, actividad catalasa, movilidad, producción de CO₂, utilización de glucosa, desarrollo a 15°C y 45°C, así como a diferentes concentraciones de NaCl y pH. El análisis fenotípico se complementó con el perfil de utilización de diferentes carbohidratos y el análisis de la secuencia del gen 16S ribosomal. La fracción fúngica presente en el queso se caracterizó por su capacidad de utilización de carbohidratos como fuente de carbono, el crecimiento a 48°C y pH de 8.0 y, el análisis de sus secuencias ribosomales. Los resultados mostraron que la biota bacteriana está compuesta por *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*,

Galactomyces geotrichum y *Pichia guilliermondii*. Finalmente, algunos de estos microorganismos aislados pueden ser utilizados como cultivos iniciadores para la producción controlada de un queso con características similares al queso cotija artesanal.

ABSTRACT

The cotija cheese is a Mexican, traditional, ripening cheese, since 400 years is produced in cotija, Michoacán, Mexico. It has received wide acceptance in the market for their specific smell and taste, which comes from the curd produced by microorganisms present in the process of its preparation. The microorganisms involved are homofermenters (able to use the lactose in milk and produce lactic acid) and heterofermenters (as a result of their metabolism to produce ethanol, acetate and CO₂). This work provides phenotypic and molecular characterization of the microbiota associated with the process of cotija cheese. The analysis focuses on the microbiota present during processing, in milk and utensils used during this process, the final product and the controlled production of this cheese using some of the isolates. Results showed that process starts with some unsafely conditions in both milk and utensils used and that these early stages of development presented high counts of mesophilic aerobic bacteria (5.9 CFU / ml) and fungi (7.8 CFU / ml), but as ripening progresses these conditions change to provide a safe product with a very particular microbial biota, characterized mainly by lactic acid bacteria and yeasts. In this way, in the cotija cheese ripening for three months, 27 isolates of bacteria (16) and yeast (11) were obtained. The bacteria were isolated in MRS medium and they were characterized by the test as Gram staining, catalase activity, mobility, production of CO₂, glucose utilization, development at 15 ° C and 45 ° C and at different concentrations of NaCl and pH. Phenotypic analysis is complemented by the usage profile of different carbohydrates. The 16S ribosomal gene sequences of bacterial strains were also analyzed. The fungal fraction present in cheese was characterized by its ability to use carbohydrates as carbon source, growth at 48 ° C and pH 8.0 and analysis of its ribosomal sequences. The results showed that the bacterial biota is composed of *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus* sp., *Lactobacillus brevis* and the fungal fraction by: *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Galactomyces geotrichum* and *Pichia guilliermondii*. Finally, some of these isolates can be efficiently used for the controlled production of a cheese with cotija cheese similar to

1.- INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento fermentado cuya fabricación está muy extendida, dando lugar a más de 4,000 variedades en todo el mundo con características de aroma, sabor y textura propias. Estas variedades vienen determinadas por el tipo de leche y cuajo empleado, por la preparación de la cuajada y por la presencia de microorganismos (principalmente bacterias ácido lácticas), responsables del desarrollo, durante la maduración. Los quesos pueden elaborarse a nivel artesanal, a partir de la leche recién ordeñada y donde ocurre una fermentación espontánea llevada a cabo por las bacterias lácticas. En la industria quesera donde se emplea una fermentación controlada, la leche procedente de diversos ganaderos se pasteuriza, destruyendo a la mayoría de los microorganismos y haciendo necesaria la incorporación de cultivos iniciadores para la maduración. Al estar elaborados con leche cruda los quesos artesanales presentan el inconveniente del riesgo sanitario que supone su consumo, ya que la leche cruda puede contener microorganismos patógenos y deterioradores que provocan pérdidas económicas, y más aun, enfermedades en los consumidores.

Tal es el caso del queso cotija, originario de la región del mismo nombre en el estado de Michoacán, el cual posee gran aceptación en el mercado Mexicano por sus características organolépticas y su consumo va en aumento, incluso en el extranjero, donde ha llegado a recibir reconocimientos por su sabor característico. Este queso es un producto artesanal que se obtiene a partir de la leche cruda de vaca, presenta una textura frágil, es de sabor fuerte y posee un alto contenido de sal. Es uno de los pocos quesos madurados que se consumen en el país. Con el fin de brindarle la posibilidad de ingresar a los mercados internacionales y aportar información de utilidad para el otorgamiento de la denominación de origen del queso Cotija el objetivo principal de la presente investigación fue caracterizar la microbiota presente durante la elaboración del queso considerando las diferentes etapas de su elaboración y la aplicación de buenas prácticas de higiene. En este queso, a la fecha, no existen reportes sobre la población microbiana presente durante el proceso de su

contempló el establecimiento y aplicación de las buenas prácticas de higiene durante el proceso de elaboración de este queso para apoyar la estandarización e incrementar la calidad del producto final. También se realizó el análisis, aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en cada una de las etapas del proceso de producción y maduración del queso cotija y finalmente, a partir de algunos de los microorganismos aislados se desarrollarán cultivos iniciadores que pueden permitir obtener quesos con características muy similares al queso cotija y que apoyarían aun más el proceso de estandarización de la producción de este importante queso artesanal.

2. ANTECEDENTES

2.1. La leche: composición y características

La leche es la secreción de las glándulas mamarias de mamíferos, especialmente de ganado bovino y caprino, sin calostro y sin substracción alguna de sus componentes, es una emulsión de glóbulos grasos y una suspensión de micelas de caseína (compuesta de Calcio, Caseína y Fósforo), toda ésta suspendida en una fase acuosa la cual contiene lactosa, proteínas del suero, y algunas sales y minerales (NOM-155-SCFI-2003, Rojas, 2005).

La densidad es una de las propiedades físicas de la leche y se define como el peso de un litro de leche expresada en kilogramos (Cotrino y Gaviria, 2006). En el cuadro 1, se presentan sus propiedades químicas de la leche como acidez, proteína, grasa, lactosa, minerales, sólidos no grasos y sólidos totales (Cotrino y Gaviria, 2006).

La acidez es producida principalmente por bacterias ácido lácticas, que transforman la lactosa en ácido láctico, acético y propiónico; ácidos grasos y acetona provenientes de la utilización de las grasas (Dargal, 2006). Los metabolitos que causan la desnaturalización de la leche son los ácidos orgánicos derivados de la fermentación de la lactosa (Calderón *et al.*, 2007).

La proteína es el componente químico más importante de la leche por ser necesaria para los mamíferos que dependen de ella en las primeras etapas de la vida y puede dividirse en dos grandes grupos la caseína y proteínas del suero. Dentro de la caseína se encuentra el α 1, α 2, β y la kappa, mientras que en las proteínas del suero se incluyen α lactoalbumina y la β lactoglobulina, inmunoglobulinas y seroalbuminas (Rojas, 2005; Dargal, 2006).

La grasa, es el componente más variable de la leche y puede estar influenciado por factores como la raza, edad de la vaca, estado nutricional, estado de la curva de lactancia y tipo de alimentación (Bolbe *et al.*, 2009; Moellen *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Composición general de la leche de bovino (por cada 100 g)*

Nutriente	Valores
Agua	88.0 %
Proteínas	32.0 %
Grasa	34.0 %
Hidratos de carbono	48.0 %
Minerlaes	0.72 %
Acidez	16.5 %
Solidos no grasos	8.79 %
Solidos totales	12.20 %

* Tomado de NMX-F-735-COFOCALEC-2011

2.1.1. Calidad higiénica de la leche

La calidad higiénica se refiere a todas aquellas practicas de manejo en establos que lleva consigo el control de la mastitis (Cotrino y Gaviria, 2006; Urdaneta, 2005). Producir leche con buena calidad higiénica resulta sumamente complejo ya que el producto a manejar es extremadamente delicado a la manipulación durante su recolección (Ciencia y Tecnología, 2003, Carrillo, 2007).

2.1.2. Calidad sanitaria de la leche

Está relacionada con la puesta en práctica de planes de control y/o erradicación de infecciones que pueden significar riesgos para el consumidor, el personal del establo y/o los animales. La calidad sanitaria es bonificada cuando cumple los siguientes requisitos: recuento microbiológicos que no superen los valores establecidos por las normas oficiales, así como el recuento de células somáticas y que los animales se encuentren libre de enfermedades infecto-contagiosas (Serrano, 2004).

La leche, además de ser manejada higiénicamente, debe de provenir de animales sanos y

muchos de los cuales pueden ser patógenos, tienen completamente alterada su composición y actividad enzimática (Piñeros *et al.*, 2005). La buena calidad sanitaria hace referencia a la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, Coliformes totales, Coliformes fecales y *Listeria monocytogenes* entre otros, que son causantes de enfermedades asociadas con infecciones e intoxicaciones generados por el consumo de alimentos contaminados (Salter y Santrano, 2000; Fadul y Quecano, 2005).

2.1.3. Calidad microbiológica de la leche

La leche tiene múltiples fuentes de contaminación ya que una ubre en condiciones normales puede aportar hasta 1000 microorganismos/ml, sin embargo una ubre con problemas de mastitis puede incrementar el recuento hasta en 100000 UFC/ml (Hogeveen y Ouweltjes, 2003). Lo anterior debido a que las deficientes prácticas de manejo permiten que los microorganismos de la piel, de los pezones, manos del ordeñador, pezoneras, equipos de ordeño, baldes y todo el entorno del ordeño, lleguen a la leche (Díaz, 2004; Dzidic *et al.*, 2004; Chassagne *et al.*, 2005; Braun, 2006; Nitzam *et al.*, 2006). Esta es la fuente de contaminación más importante y variable, ya que aporta un gran número de microorganismos con diferentes propiedades microbiológicas (Hopster *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2003; Hovinen *et al.*, 2005).

2.1.4. Factores que afectan la calidad de la leche

Los factores que afectan la calidad microbiológica de la leche y que se tienen que tomar en cuenta son:

2.1.4.1. Buenas Prácticas de Higiene (BPH)

Son los procedimientos rutinarios que tienen como objetivo asegurar un producto aceptable al público y a los consumidores en términos de inocuidad, precio y calidad. Los códigos de buenas prácticas deben ser guías flexibles para usarlos en sistemas específicos para una

excelentes condiciones de ordeño y adecuado control sobre las ubres y el entorno realizado por parte de los trabajadores, la imperfección puede dar lugar a una deficiente productividad y a un bajo nivel nutritivo de la leche. Trujillo, en el 2002, señala la necesidad de asegurar la inocuidad de los alimentos en la cadena alimentaria, donde cada eslabón influye sobre la inocuidad del producto.

2.1.4.2. Recuento de Organismos Coliformes

Identifica a una serie de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que incluye a los géneros de *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*; microorganismos Gram negativos usualmente encapsulados, no esporulados, que fermentan la lactosa y que causan cuadros de mastitis, los cuales van de ligera a severamente agudo (Salvador y Abner, 2005). La presencia de estas bacterias refleja un pobre manejo higiénico de la rutina de ordeña (limpieza de la piel de los pezones, manos y pezoneras) y la exposición de la leche a material fecal (Nevecherya *et al.*, 2005; Savichtcheva y Okabe, 2006).

2.1.4.3. Recuento de Células Somáticas (RCS)

Es el índice del nivel de la severidad relacionada tanto con la mastitis presente en el hato como la calidad de la leche en casos subclínicos (Bradley y Green, 2005; Calvinho *et al.*, 2005); si bien los valores límites del RCS varían en distintos países, se considera que por encima de las 500000 células/ml se trata de leche proveniente de un sistema productivo con alta prevalencia de infecciones intramamarias y es, por lo tanto, considerado como un hato problema (Monardes y Barrías, 2008).

2.1.4.4. Recuento de Organismos Mesófilos Aerobios

Es una medida de la condición de higiene de los establos, al igual que los recuentos de las bacterias anteriores, se relaciona con la insuficiente higiene del sistema de leche. Se considera que una leche con menos de 10000 UFC/ml es de excelente calidad (Taverna, 2002, Gaviria, 2007; Posada *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011). Conforman el grupo más

debido a que muchos otros tipos de bacterias no quedan incluidas porque sus rangos de temperatura óptima de crecimiento son diferentes o el oxígeno les es inhibitorio. Como la lectura se hace contando el número de colonias que aparece en la placa, producto de la multiplicación a partir de una sola célula bacteriana o de un grupo de ellas, el resultado se expresa en UFC como indicador de la calidad higiénica (Cotrino y Gavera, 2003; Gaviria, 2007).

2.1.4.5. Listeria

El género *Listeria* se agrupa en bastones Gram positivos: son bacterias no esporuladas, aerobios-anaerobios facultativos que se desarrollan entre -0,4 a 45°C, son psicrótrofos, catalasa positiva, oxidasa positiva y β -hemolíticos en agar sangre. En la prueba de Christie, Atkins, Munich-Petersen (CAMP) estimula la producción de hemolisina, toleran concentraciones elevadas de cloruro de sodio y son móviles a 25°C (Michanie, 2004; FAO, 2007)

La listeria es una bacteria ampliamente difundida en la naturaleza, se encuentra en los alimentos, distribuida en el medio ambiente, tierra, aguas, materia fecal, vegetación, ensilados y entorno a la producción de alimentos, lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos (Marzocca *et al.*, 2004, Pan *et al.*, 2006; Noriega *et al.*, 2008).

2.1.4.6. Brucelosis

Como todas las especies de brúcelas, la *B. abortus* sobrevive largo tiempo (hasta 120 días) en el medio ambiente sobre sustancias orgánicas (excrementos, residuos de abortos, leche, etc). Resisten a la congelación y la re congelación pero son destruidas a temperaturas de pasteurización, por el calentamiento a 60°C durante 10 minutos y por los desinfectantes comunes (formol, cloro y fenol) (López *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2008; OIE, 2009). El

En la infección brucelósica la leche no se altera de manera visible. En el aspecto químico, la leche sólo muestra una discreta elevación de la proteína total y la albumina disminuye ligeramente, mientras que la globulina aumenta. El incremento de la globulina en la leche brucelósica es el resultado de la producción de anticuerpos (Izquierdo *et al.*, 2009; Lamontagne *et al.*, 2007; López, 2008).

2.1.4.7. Mastitis

Es la enfermedad infectocontagiosa más común en los bovinos donde se presenta una inflamación de la glándula mamaria debido a la presencia de microorganismos que se multiplican al interior de la ubre y causan destrucción del tejido mamario y la pérdida del volumen de producción. Durante la mastitis se altera la composición de la leche y se generan pérdidas debido a los costos de reposición, gastos veterinarios y la influencia de esta enfermedad en su sabor (Salvador y Abner, 2005; Urdaneta, 2005; Ruvalcaba *et al.*, 2009). Los cambios en el sabor de la leche son originados durante la labor de ordeño, ya que una vez ordeñada la vaca el esfínter queda abierto posibilitando la entrada de microorganismos que ocasionan daños a nivel epitelial, y cambios físicos y bacteriológicos de la leche (NMC, 2006; Calderón *et al.*, 2006).

Para Delgado *et al.*, (2009), la mastitis es una enfermedad que se puede clasificar en dos grupos:

- 1.- Mastitis contagiosa: causada generalmente por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* y *Corinebacterias*, originados en el interior de la ubre de otros animales infectados y se transmite a los animales sanos.
- 2.- Mastitis ambiental: derivada de la infección que se origina del medio ambiente, generalmente causados por *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.

2.1.4.8. *Staphylococcus aureus*

por oxidación como para fermentación. Estos microorganismos se transmiten tanto por contacto directo como indirecto (Elmoslenmaya *et al.*, 2010). La causa principal de la mastitis bovina es el *S. aureus* que rivaliza con *Strep. agalactiae*. La infección tiene lugar a través del canal del pezón y su curso varía desde sublimice a agudo supurativo gangrenoso o crónico, dependiendo de la cepa infectante y resistencia del hospedero (Gonzalo *et al.*, 2010). La mastitis causada por bacterias del género *Staphylococcus* es de distribución mundial, siendo de gran importancia dentro de la casuística de esta enfermedad. A nivel de mastitis subclínica, estos microorganismos son los agentes más importantes además de que participan también como causantes de mastitis clínica (Posadas *et al.*, 2010; Estévez *et al.*, 2011; Vilart *et al.*, 2011).

2.2. El queso

El queso es un alimento muy apreciado debido a sus cualidades nutritivas y sensoriales. Se ha elaborado desde hace varios siglos a partir de leche de vaca, oveja, cabra y otros rumiantes. Se cree que los quesos tienen su origen en la observación accidental de la fermentación de la leche cuando era transportada en estómagos de animales, lo que ocasiona la separación del suero y la cuajada (Fernández, 2000; Chamorro y Losada, 2002). La leche es coagulada mediante la renina presente en el cuajo, posteriormente se elimina el suero por corte de la cuajada, agitación de los fragmentos resultantes y por el subsiguiente moldeado, prensado y madurado en condiciones adecuadas (RT, 2007). El secado o salado parcial de la cuajada se aproxima a una forma primitiva de elaboración de queso (Fernández, 2000; Chamorro y Losada, 2002).

La Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO) en 1966 definió el queso como aquel "producto fresco o madurado obtenido por coagulación de la leche entera u otros productos lácteos como nata, leche parcial o totalmente desnatada, suero de mazada o de sus mezclas, y posterior separación del suero". Para Alais (2001) y Robinsón *et al.*, (2002), el queso es "una forma de conservación de la caseína y de la materia grasa de la leche, que se obtiene por coagulación de la misma seguida del desuerado, donde se separan por un

La producción de queso en México entre 1997 y 2008 pasó de 116000 t en 1997, a 150000 t en 2008. El queso panela y la doble crema duplicaron su producción. Se evidencia así el dominio de los quesos frescos en México, lo que se refuerza con el monto de las importaciones de queso fresco las cuales pasaron de 975 t en 1997 a 15 677 t en 2008 (SIAP, 2008). Castro *et al.*, (2001) reportaron que en 1997 se produjeron oficialmente 130,000 t de queso en el país, pero que se generó la misma cantidad, o incluso más, en el sector informal. En México la industria quesera artesanal se puede clasificar convencionalmente en tres extractos (según el volumen de leche que se procese diariamente): pequeña, transforma volúmenes menores a 2 000 l/día; mediana; procesa entre 2,000 y 20,000 l/día; gran industria, que maneja volúmenes superiores a 20, 000 l/día (Villegas, 2004).

La mayor parte de esa producción no se registra. Tan solo en el estado de Chiapas existen alrededor de 600 queserías, pero solo 109 están censadas por el INEGI. Solo en la sierra de Jal-Mich (Jalisco-Michoacán) existen alrededor de 545 queseros de este tipo. Así mismo, se tienen reportes similares de queso en una región de Zacatecas. En Ocosingo, Chiapas, muchos de los queseros producen la totalidad o parte de la leche que requieren (Poméon y Cervantes, 2010).

2.2.1. Clasificación de los quesos

Inicialmente los quesos se pueden clasificar, en quesos madurados y en quesos no madurados. Los primeros tienen consistencia blanda y pueden tener bajo (Cottage) o alto (Neufchatel) contenido de grasa. Son quesos madurados aquellos que se someten a un proceso de fermentación, breve (horas) o prolongado (meses). Por su contenido en humedad se agrupan en muy duros, duros, semiblandos y blandos: 26-34% (Parmesano), 35-45% (Gruyere), 45-55% (Limburger), 65% (Neufchatel), 79 – 82% (Cottage), respectivamente. Hay que agregar los quesos fundidos y los requesones, estos últimos (como el Ricotta) preparados a partir del suero láctico. En el país se producen algunas

Chihuahua. Únicamente los dos últimos son madurados a partir de su biota natural (Fernández, 2000).

2.2.2. Proceso de elaboración de los quesos

El proceso de elaboración de un queso implica, tres grandes pasos:

1.- Coagulación de la leche: Este fenómeno se produce por la desestabilización de la solución coloidal de caseína que origina la aglomeración de las micelas libres y la formación de un gel en el que quedan atrapados el resto de los componentes de la leche (Tercero *et al.*, 2005). Existen diferentes métodos de coagulación; la acida y la enzimática, sin embargo, en la industria quesera el método más utilizado es la coagulación mixta (Fox *et al.*, 2000).

La coagulación mixta, se refiere a la coagulación láctica ó ácida, la cual es realizada por las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o procedente de fermentos, que transforman la lactosa en ácido láctico haciendo descender el pH de la leche, lo que produce la alteración de la caseína hasta la formación de un coagulo (González, 2002).

Durante la coagulación enzimática de la leche se distinguen tres fases:

- Fase enzimática o reacción primaria: el cuajo o quimosina actúa hidrolizando la K-caseína a nivel de enlace de fenilalanina-metionina que ocupan las posiciones 105 y 106 de las moléculas respectivamente. Esta hidrólisis da lugar a la formación de dos fragmentos glicomacropéptidos (106 - 109) ricos en residuos de aminoácidos ácidos y polares.
- Fase de coagulación o fase secundaria: las micelas se combinan entre sí con la ayuda de fosfato de calcio, dando lugar a la formación de un gel o coagulo que

- Fase terciaria: se inicia una vez que se ha producido el cuajado de la leche y consiste en una acción proteolítica de la caseína α y β (Pérez, 2001; González, 2002). Finalmente, ocurre la sinéresis del coagulo que consiste en la retracción del coagulo con expulsión del suero.

2.- Escurrimento: Según el tipo de coagulación seleccionada en la primera etapa, se deberá realizar un escurrido u otro.

Coagulación por acidificación: el gel obtenido tiene una gran cantidad de líquido lacto suero, el cual lleva consigo todo el calcio, por esto la cuajada con que se fabrican los quesos frescos contienen poco calcio. Coagulación por adición de cuajo: en esta etapa es necesario someter al gel resultante a un proceso mecánico y físico para poderlo escurrir y quitarle el lacto suero. Estos procesos son de corte, removido, prensado y cocción. Dependiendo del énfasis puesto en algunos de estos procesos, se tendrá un escurrido diferente, y por lo tanto, una cuajada diferente. La cuajada contiene gran cantidad de calcio (Chamorro, 2010).

3.- Maduración o afinación de la pasta:

En la maduración se define el aspecto, olor, color, textura y sabor. Esto como consecuencia de que los microorganismos que están en la cuajada realizan su labor microbiana, la cual consiste en la fermentación de la lactosa, hidrólisis de los lípidos y degradación de las proteínas. La hidrólisis libera los ácidos grasos y durante la degradación de las proteínas se consiguen péptidos, aminoácidos, aminos, amoníaco, aldehídos, cetonas y fenoles (González, 2002). Así mismo, en esta etapa, se requiere de lapsos de tiempo que van desde unos días hasta varios meses, en condiciones ambientales apropiadas. Como consecuencia de la actividad de los cultivos adicionados o los inherentes a la leche, durante la etapa de maduración, la masa del queso experimenta fenómenos bioquímicos complejos que se traducen en nuevos atributos sensoriales del producto, como son: firmeza, elasticidad,

se favorece por un exceso en la acidez. Es un defecto en quesos como el Cheddar, pero una cualidad deseable en el Roquefort. La fermentación de la lactosa por cultivos iniciadores en el interior de los coágulos contribuye a su contracción y a la expulsión de más suero (quesos menos blandos), el proceso confiere aromas al producto e inhibe el desarrollo de bacterias patógenas. La mayor parte de la lactosa desaparece por la fermentación generándose principalmente ácido láctico, acético, etanol, CO₂, acetaldehído, algunos ácidos volátiles y otras sustancias. En quesos como el Emmental, la fermentación es propiónica; se acompaña de la producción de ácido acético y CO₂. Agotada la lactosa, se restringe la actividad de bacterias indeseables, contribuyendo así a la estabilidad de los quesos madurados. La actividad enzimática (inherente a la maduración) es compleja. Las proteínas son hidrolizadas en grado variable; intensamente en quesos blandos como el Camembert y Limburger, y participan en el proceso enzimas como la renina y más activamente exoproteasas bacterianas. Cocos y bacilos lácticos liberan endoenzimas cuando mueren y se autolizan (Hemida, 2000; Duran, 2006)

El proceso de maduración puede ser menor de una semana (Manchego), alrededor de un mes (Limburger), dos meses (Brick), 4-6 meses (Camembert) y hasta 12 meses (Cheddar). En algunos quesos se recurre al uso de enzimas (proteasas, péptidas y lipasas) para acelerar el proceso de maduración, tal es el caso del queso Roquefort, en el cual la maduración alcanza una etapa de putrefacción, enranciamiento y fermentación que es similar a la de un alimento descompuesto. La biomasa microbiana (viva o muerta), representa más del 90% del peso en este producto desecado (Fernández, 2000).

2.2.3. Microbiota causante de la producción de características de los quesos

Las bacterias ácido lácticas, así como las levaduras y mohos juegan un papel muy importante en la producción de las características sensoriales de los diferentes tipos de quesos, principalmente la maduración, que comprende una serie de cambios de las propiedades físicas y químicas, adquiriendo el queso su aspecto, textura y consistencia, así

Estos microorganismos llevan a cabo procesos como la fermentación o glucólisis, en la que se realiza el proceso de conversión de la lactosa a ácido láctico, pequeñas cantidades de ácido acético y propiónico, CO₂ y diacetilo. Este proceso es realizado fundamentalmente por las bacterias lácticas. Comienza durante la coagulación y el desuerado y se prolonga hasta la desaparición casi completa de la lactosa. El ácido láctico procedente de la degradación de la lactosa no se acumula en la cuajada sino que sufre distintas transformaciones de naturaleza diversa. En quesos blandos madurados por mohos, es metabolizado por éstos (Cabeza, 2006).

González en el 2002, reporta que la función principal de las bacterias lácticas fermentativas es la producción de ácido láctico. El ácido acético promueve la formación y desuerado de la cuajada, evita que crezcan en esta microorganismos patógenos debido a que baja el pH (5.0 – 5.2) y le confiere sabor ácido. Además las bacterias dan lugar a sustancias responsables de aroma y contribuyen a la maduración mediante proteólisis y lipólisis. La proteólisis es el fenómeno más importante de la maduración, ya que afecta a la vez a la textura y al sabor (Alías, 2001). Como resultado de la proteólisis se acumulan una gran variedad de productos en el queso durante la maduración (Cabeza, 2006). Las proteasas de las bacterias ácido lácticas intervienen, en gran parte en la maduración de los quesos de pasta dura (McSweeney y Sousa, 2000). Finalmente la lipólisis, o hidrólisis de las grasas afecta a una pequeña proporción de éstas. Sin embargo, los ácidos grasos liberados y sus productos de transformación, aunque aparecen en pequeñas cantidades, influyen determinantemente en el aroma y sabor del queso (Walstra, 2001).

2.2.4. Quesos mexicanos genuinos

Se entiende por quesos mexicanos genuinos, aquellos elaborados a partir de leche fluida de vaca, con el empleo mínimo de aditivos, incorporando los permitidos por las normas vigentes. No incluyen grasa vegetal, ni derivados proteicos, a excepción de pequeñas cantidades de estos últimos, solamente para estandarizar la relación proteínas/grasa

chipileños) o extranjeros residentes. Muchos de estos quesos son regionales o exclusivamente locales y son la expresión de las condiciones ecológicas y del conocimiento tradicional del territorio donde se elaboran. Algunas se han difundido por gran parte del país (panelas), otros han llegado al extranjero, principalmente a los Estados Unidos de América, por medio de emigrantes, por ejemplo el cotija y el Oaxaca (Villegas *et al.*, 2009). En el país, existen más de 40 variedades de quesos genuinos, algunos gozan de una amplia difusión, con altos volúmenes producidos por ejemplo el queso chihuahua, el queso tipo manchego mexicano, así como los quesos asadero, panela y cotija. Otros solamente se conocen y se consumen en ciertas regiones, por ejemplo, el queso crema de Chiapas, el queso guaje, el de hoja y el queso de poro, de Tabasco (Poméon y Cervantes, 2010).

En un reporte del 2007 en el mercado nacional de quesos circulaban varios productos que a primera vista constituyen bienes sustitutos muy similares y que aparentemente cumplen la misma función de los quesos artesanales (Vargas *et al.*, 2007). Desde el punto de vista normativo, la Ley General de Salud (Secretaría de Salud, 1989) reconoció a los quesos genuinos (frescos y madurados), a los fundidos o procesados y a los llamados “imitación de quesos”, o quesos de imitación. Estos últimos se refieren a una multitud de productos que son semejantes a estos “quesos artesanales” pero en realidad no lo son, más bien son quesos apócrifos, o como dicen los productores artesanales: quesos falsos. Cabe mencionar que la referencia sobre quesos de leche cruda entera, madurados, así como los de imitación hayan sido retirados de la Ley General de Salud de 1999, de tal manera que estos productos, y a pesar de tener una existencia real e importancia económica y social, han sido excluidos de la normatividad vigente (Reid *et al.*, 2006; Del Valle, 2007). De hecho, existe una gran confusión sobre la naturaleza y propiedades de los quesos tipo imitación entre los quesos genuinos aun entre los industriales y técnicos del sector quesero y todavía más, entre los consumidores (Villegas, 2004). Los quesos mexicanos genuinos, según Villegas (2009), deben cumplir con los siguientes rasgos: Estos deben ser elaborados a partir de leche cruda de vaca o de cabra. No deben incluir grasa vegetal, ni derivados proteicos de la leche. Deben poseer una fuerte raíz histórica nacional, y deben ser elaborados desde tiempos

2.3. Queso cotija

2.3.1. Antecedentes históricos

La elaboración de quesos en México se inició con la llegada de los españoles en el siglo XVI quienes trajeron consigo diversos animales como vacas y cabras, a partir de las cuales se obtenía leche para la elaboración de una amplia variedad de quesos con una gran diversidad sensorial (Cervantes *et al.*, 2008). El queso cotija nació como consecuencia del asentamiento de los españoles en el valle de cotija y sus alrededores quienes, en búsqueda de oro y espacios libres para sus animales, transformaron a esta región en una zona ganadera (Briones *et al.*, 2009). Según los productores de la región, el origen del nombre surge de la costumbre de comercializar el queso elaborado en la región de Jal-Mich, en la ciudad de, Michoacán donde anteriormente existía una estación de tren (Briones *et al.*, 2008). Se caracteriza por ser un pueblo de arrieros, la producción de queso se realiza en toda la región pero particularmente se concentra en las zonas serranas, aisladas, donde es una necesidad procesar la leche en quesos maduros para su conservación y posterior venta (Barragán y Chávez, 1998).

Las comunidades productoras están formadas por agrupamientos voluntarios de explotaciones lecheras desde finales del siglo XIX, formando incipientes pueblos (Barragán, 1997). La ganadería se mantiene en la periferia de esos agrupamientos, ya que requiere de grandes espacios (Barragán y Chávez, 1998). El queso alcanzó su auge en la primera mitad del siglo XX, sin embargo, el desarrollo de la infraestructura pública (carreteras y electricidad) en la región incentivó nuevas formas de producción lo que desmotivó la producción artesanal del queso. De esta forma, se puede decir que la producción ganadera pasó de ser estacional a anual, con la introducción de razas mejoradas, particularmente pardo suizo y charoláis criadas de manera semi-intensiva (Barragán, 1990, Chombo, 2003). Además, el proceso de comercialización actual implica que el queso solo se conserva unos días hasta su venta, sin proceso de maduración. Finalmente, la electricidad incentivó la introducción de innovaciones técnicas en la producción del queso, como el uso

queso en San José de Gracia, un pueblo cercano a la zona de producción delimitada. Pasó de la producción artesanal del queso, madurado, a una producción semi-industrial de quesos, primero con leche bronca y luego con leche pasteurizada, produciendo queso “tipo” (Barragán, 1997). De esta forma, la tradición del queso, como producto estacional, artesanal y madurado, solo se mantiene en las zonas más aisladas de la región que no se han beneficiado con el mejoramiento de las infraestructuras. Esta es la razón por la cual la región de la Sierra de Jalisco-Michoacán es la zona de refugio del auténtico queso. En esta zona los productores siguen con el sistema de producción tradicional que vincula la producción de queso a la crianza de becerros y al cultivo itinerante del maíz. Es importante mencionar que desafortunadamente la venta del queso artesanal debe ajustarse al precio de los quesos industriales, vendidos a bajos precios. Además, la presión demográfica interna genera un fraccionamiento excesivo de la propiedad, debilitando la viabilidad económica de los ranchos (Barragán, 1997).

2.3.2. Región de origen

Primero es importante especificar que la zona de producción de la materia prima, la leche, y la zona de elaboración del queso son las mismas. De hecho, el queso se caracteriza por ser producidos por los mismos ganaderos, únicamente a partir de su propia producción de leche.

La zona, con una forma de herradura orientada al norte, abarca una superficie de aproximadamente 2 400 km², de los 19°15' a los 19°40' de latitud norte y de los 102°30' a los 103°05' de longitud oeste. Es una zona continua, ubicada en la sierra Jal-Mich, entre los estados de Jalisco y de Michoacán, incluyendo principalmente los municipios de Santa María del Oro (Jalisco) y la parte sur de los municipios de y de Tocumbo (Michoacán). Además se extiende a territorio de los municipios siguientes: norte de Jilotlan de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupán (Jalisco); suroeste de los Reyes, Peribán y Tancítaro, y norte de Buena Vista Tomatlán (Michoacán). En realidad,

Quitupán (Jalisco), Tocumbo y Buena Vista Tomatlán (Michoacán) (NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

2.3.4. Proceso de elaboración del queso cotija

En el proceso de elaboración del queso cotija se utiliza leche entera y fresca, a la cual se le adiciona únicamente cuajo y sal. La pasta que se obtiene se deposita sobre dos mantas de henequén contenidas dentro del aro que le da su forma cilíndrica y de gran formato de 20 kg en promedio, derivados de los 200 L de leche con que se elabora cada pieza de este tradicional queso. Durante los primeros tres meses de vida, las piezas de queso permanecen en los ranchos de la región, bajo el cuidado y atención de los productores, lo que le da al queso su corteza rugosa y gruesa, de color que varía del amarillo paja al ocre; textura firme, su sabor pronunciado y aroma refinado. Al tacto la pasta es dura y homogénea; al corte presenta una estructura que puede ir de compacta a granulosa; al paladar es cremoso y de buen sabor (Figura 1) (Chombo, 2003).

2.3.5. Características del queso

Este queso se produce de manera natural, es decir a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos de leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo, debe estar libre de microorganismos patógenos y solo podrán añadirse cultivos bacterianos que refuercen su inocuidad, así mismo estará libre de compuestos químicos ajenos a su naturaleza como lo son pesticidas, fertilizantes y detergentes (Poméon, 2007).

La composición básica es: Humedad máxima de 36%, grasa mínima 23% y proteína mínima 25%, y el Queso Región de Origen debe tener un mínimo de tres meses de vida dentro del área geográfica que protege la marca considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa. Este mantendrá su presentación de gran formato, cuyas dimensiones en promedio son 40 cm de diámetro y 18 cm de altura, con un peso promedio de alrededor de 20 kg (Álvarez *et al.*, 2004).

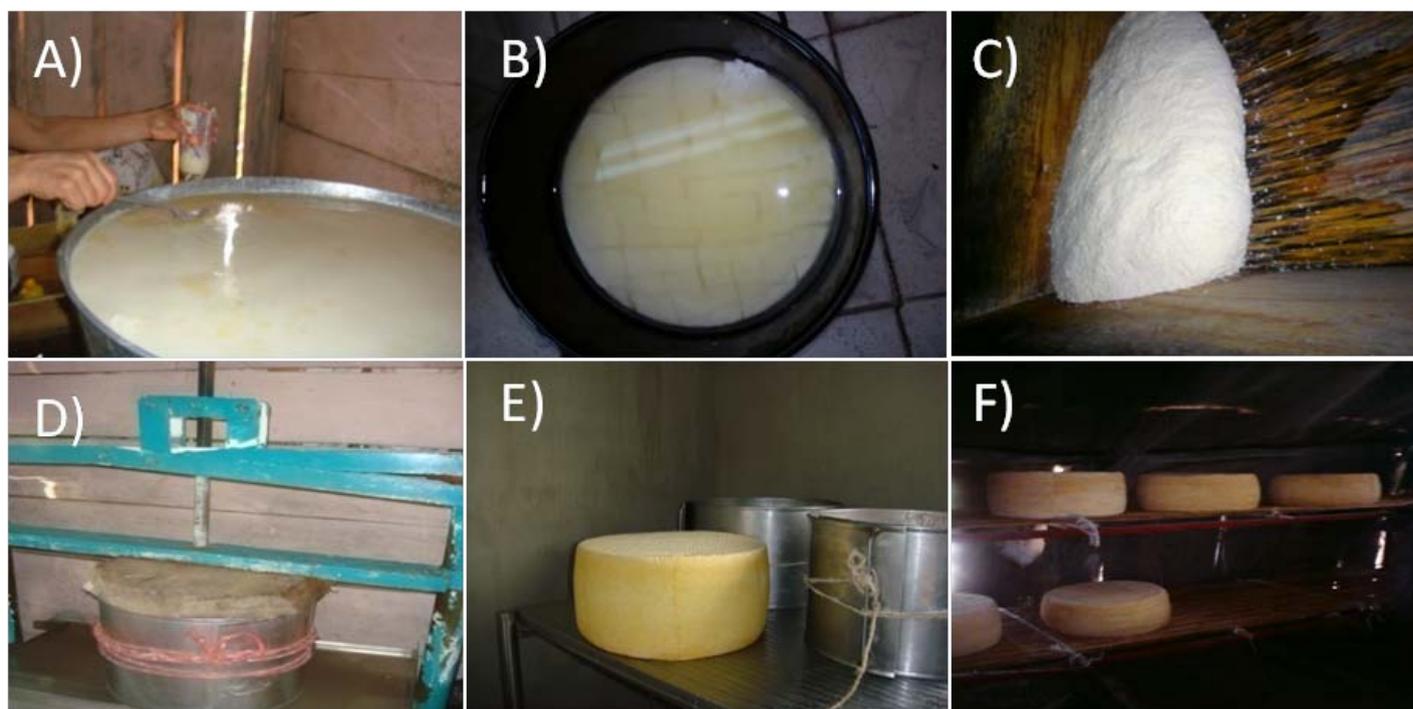


Figura1. Proceso de elaboración del queso cotija en la región de origen. A: Coagulación de la leche, B: Cortado y desuerado, C: Salado, D: Prensado, E: Moldeado y Desfajado; F: Proceso de maduración

2.3.6. Marca colectiva queso región de origen

La marca colectiva es un signo distintivo que sirve para diferenciar en el mercado los productos o servicios de los miembros de una asociación o sociedad con respecto de los productos o servicios de terceros. Dicha marca o signo se coloca en el producto para identificar que ha sido elaborado por un grupo específico de personas de una región determinada (IMPI, 2007).

La Marca representa una protección oficial y con ella una ventaja competitiva del producto en el mercado, dando garantía de autenticidad y calidad a los consumidores y un sobreprecio justificado por las especificaciones geográficas y culturales incorporadas en el producto por las condiciones precarias en que estos producen, y por el apego a determinadas normas de calidad y por la preservación del medio ambiente (IMPI, 2007).

2.4. Microbiología de los quesos

Los microorganismos responsables de la fermentación láctica son fundamentalmente las Bacterias Acido Lácticas (BAL), aunque también se pueden encontrar otros microorganismos pertenecientes a otros grupos como micrococos, estafilococos, bifidobacterias, propionibacterium, mohos y levaduras. El crecimiento de estos microorganismos va a estar controlado por algunos factores físico-químicos, como la actividad del agua (a_w), concentración de la sal, pH, ácidos orgánicos, temperatura de maduración, potencial de oxido reducción, y presencia de nitratos entre otros factores (Beresford *et al.*, 2001). La importancia de cada uno de estos factores puede venir determinada en muchos casos por el propio proceso de elaboración del queso. Se ha descrito también que la producción de algunas sustancias antagonistas por parte de las bacterias lácticas, como lo son las bacteriocinas, podrían contribuir en el control de determinadas poblaciones microbianas (Congan, 2002).

Los microorganismos que mayormente aparecen en los quesos se han dividido en dos grandes grupos: Cultivo iniciadores y cultivos no iniciadores (Beresford *et al.*, 2001). Los cultivo iniciadores intervienen fundamentalmente en la producción de acido láctico durante la primera etapa de fabricación, la coagulación de la leche y pudiendo formar parte en la maduración del mismo en forma secundaria. Estos pueden presentarse de manera natural o ser añadidos de manera intencional. Los cultivos no iniciadores son microorganismos que no van a intervenir en la acidificación (al menos de forma directa), pero van a desempeñar un papel muy importante durante la maduración del queso (Guerrero *et al.*, 2008; Martin, 2008).

2.4.1. Caracterización de microorganismos presentes en el queso

En los estudios microbiológicos más actuales, la combinación de técnicas clásicas y técnicas independientes de cultivo están dando resultados complementarios, tanto por el número como por los tipos microbianos que se detectan (Díaz y Wachter, 2003; Cava *et al.*, 2006). Rara vez un método cumple satisfactoriamente con todos los criterios utilizados para su evaluación, por lo cual, es frecuente y recomendable el uso combinado de diversas técnicas. Usualmente en primera instancia, se utiliza un método de tipificación que arroje resultados rápidamente, seguido de procedimientos que ofrezcan información más precisa (Vilchez *et al.*, 2009). Los métodos para la caracterización de microorganismos pueden clasificarse en fenotípicos y genotípicos. Los fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas e históricamente, constituyen la primera herramienta que permitió la comparación de microorganismos (Zaidi *et al.*, 2003). Estas incluyen la determinación actividades enzimáticas, determinantes antigénicos entre otros. Las técnicas de tipificación genotípica involucran el estudio del genoma del microorganismo lo que nos permite analizar propiedades, características o polimorfismos presentes en los microorganismo en estudio (Pfaller, 1999).

Los método fenotípicos constituyen una herramienta muy importante para la tipificación de muchos microorganismos, no obstante el alcance de estos procedimientos puede verse afectado por varios factores (influencia del ambiente y poco poder discriminatorio) (Vilchez *et al.*, 2009). Además, resultan poco prácticos para el análisis de microorganismos de crecimiento lento, dificultoso o no cultivables y que, generalmente, requieren la multiplicación de los mismos, y resultan poco apropiados para determinar las relaciones entre microorganismos presentando una limitada capacidad de identificación a nivel de subespecie, subtipo o cepa (Díaz y Wachter, 2003).

Los métodos genotípicos están basados en la detección del material genético del organismo, por lo tanto son independientes de los cambios en el patrón de expresión genética y de las

microorganismos, siendo posible obtener los resultados en tiempos más cortos y, usualmente con mayor poder de resolución, sensibilidad y especificidad que los métodos fenotípicos (Vilchez *et al.*, 2009). Estos métodos basados en la detección del material genético se han constituido como una herramienta que complementa a los procedimientos fenotípicos extendiendo los alcances de la microbiología y permitiendo el entendimiento del papel que juegan los microorganismos en los diversos ambientes.

En los últimos años, se han hecho esfuerzos considerables en el desarrollo de una metodología complementaria que combine reproducibilidad, velocidad, sencillez y bajo costos, en la identificación microbiana (Pontes *et al.*, 2007). La principal ventaja de las técnicas de identificación basadas en el estudio del ARN o ADN es que estas se han centrado en la detección de secuencias diana específicas de determinados microorganismos en lugar de la expresión fenotípica de los productos codificados por los genes. Gracias al desarrollo de estas herramientas se han descrito nuevas especies dentro de las BAL o bien algunas de las especies descritas se han reclasificado en los géneros *Lactobacillus* (Aslam *et al.*, 2006; Dellagio *et al.*, 2004; Felis *et al.*, 2006; Konstantinov *et al.*, 2006; Naser *et al.*, 2005., Osawa *et al.*, 2007; Vancanneyt *et al.*, 2006).

2.4.2. Bacterias Acido Lácticas (BAL)

Las BAL son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis- (Lyhs, 2002; Axelsson 2004).

En términos generales estas bacterias tienen complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones del porqué abundan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. A

para su aislamiento, por ejemplo el caldo o agar MRS (Man Rogosa Sharpe) y agar Rogosa (López y Domingo, 2007).

Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores), pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies. La síntesis de dextranos y ácido láctico, la tolerancia de las bacterias ácido-lácticas a este ácido orgánico, y a un pH inferior a 7 ha hecho que este grupo de microorganismos se emplee en la industria de los alimentos para la conservación y mejora tecnológica de los productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados (Amores *et al.*, 2004; Burton y Kack, 2007; Hemme y Foucaud, 2004). Topisirovic *et al.*, (2006) estudiaron el efecto antimicrobiano de algunas bacteriocinas producidas por diversas cepas de BAL contra bacterias patógenas y no-patógenas obteniendo en general buenos resultados por lo que concluyen entre otras que la presencia de este grupo de bacterias en los alimentos además de modificar sus propiedades físico-químicas, sensoriales y de textura, puede contribuir a un efecto protector de los mismos e incrementar su vida útil.

Los géneros más importantes de BAL son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (Savijoki *et al.*, 2006; Teuber y Geis, 2006; Konig y Frohlich, 2009). Así pues la identificación e inclusión de las BAL en los diferentes géneros se basa en el fenotipo tradicional, rutas de fermentación de glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, desarrollo a diferentes concentraciones salinas y tolerancia a pH ácido y alcalino, composición de ácidos grasos, homología ADN-ADN, secuencia del ARNr y patrones de proteínas solubles (Estrada *et al.*, 2005).

Las BAL se suelen encontrarse en suelos, aguas, y sobretodo asociadas a plantas y animales. Muchas de ellas forman parte de la microbiota habitual del tracto gastrointestinal y genitourinario de humanos y animales, donde desempeñan un papel beneficioso en el mantenimiento de la integridad intestinal y en procesos de inmunomodulación y resistencia

fermentados. La contribución más importante de estos microorganismos es conservar las cualidades nutritivas de los alimentos y aumentan la vida media de estos, e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (O'Sullivan *et al.*, 2002). Esto se debe a la competencia entre los distintos microorganismos por los nutrientes presentes en el alimento, así como la producción de sustancias inhibitorias por las BAL, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, y bacteriocinas (Ray, 1992; Budde *et al.*, 2007; Vermeiren *et al.*, 2004).

Entre los microorganismos que con más frecuencia se aíslan de derivados lácteos, destacan los lactobacilos y los lactococos. Ambos tienen una gran capacidad acidificante y muchas especies son proteolíticas. Además, en los quesos elaborados en la cuenca europea Mediterránea, también es frecuente aislar enterococos, sobre todo en aquellos que han sido elaborados con leche cruda (Martin, 2008). Por lo tanto es necesario describir las características diferenciales de los principales géneros.

- ***Lactobacillus spp***

Dentro de las bacterias lácticas, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes. Son bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaeróbicos, acidúricos o acidófilos, con requerimientos nutricionales complejos. Incluyen especies homofermentativas obligadas, facultativas heterofermentativas y heterofermentativas obligadas. Ocasionalmente forman pigmentos; amarillo, rosa o rojo ladrillo. Los límites de temperatura donde se desarrollan van de 2 – 53°C con óptima de 30-40°C. Están presentes en productos lácteos, cárnicos, de pescadería, agua, frutas, verduras y ensilaje (Feria, 2007; Castellano *et al.*, 2008). Actualmente este género cuenta con aproximadamente 80 especies reconocidas caracterizadas por una alta diversidad, la disponibilidad de las secuencias completas del genoma de algunos miembros ha permitido confirmar su extrema divergencia que se refleja en la dificultad para su clasificación taxonómica (Canchaya *et al.*, 2006)

- Primer grupo: *Thermobacteria*, está formado por lactobacilos termofílicos homofermentativos que utilizan hexosas como fuente de carbono para producir ácido láctico (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. helveticus*). (Hammes y Volgel, 1995; Carr *et al.*, 2002).
- Segundo grupo: Lactobacilos mesofílicos heterofermentativos facultativos, que utilizan otras fuentes de carbono (Hassan *et al.*, 2001), siendo capaces de producir ácidos orgánicos, CO₂, alcohol y peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Este grupo incluye *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* que no son comúnmente encontrados como cultivos iniciadores, más bien están involucrados en la fermentación secundaria, benéfica durante la maduración de los quesos (Beresford *et al.*, 2004). Estos lactobacilos son llamados de NSLAB, bacterias ácido-lácticas no iniciadoras, generalmente encontrados en fermentos lácticos artesanales (Fox *et al.*, 2000; Crow *et al.*, 2001).
- Tercer grupo, está formado por los lactobacilos mesofílicos heterofermentativas que utilizan, obligatoriamente, hexosas y pentosas como fuente de carbono. Estos microorganismos pueden producir sabores indeseables y gas durante la maduración de los quesos (Hassan *et al.*, 2001). En este grupo están incluidos *Lb. brevis* y *Lb. fermentum*, que también no son encontrados como fermento láctico (Fox *et al.*, 2000). Los lactobacilos heterofermentadores obligados son detectados con menor frecuencia en quesos (Beresford *et al.*, 2004).

En los quesos algunas especies de lactobacilos como *Lb. helveticus* y *Lb. brueckii* forman parte de algunos cultivos iniciadores industriales (Hebert *et al.*, 2000). Contribuyendo a la acidificación y a la proteólisis (Chopard *et al.*, 2001) Aunque suelen estar presentes al inicio a niveles de 10⁹ UFC/g, decrecen rápidamente durante la maduración.

- ***Lactococcus spp***

Este género está formado por siete especies pertenecientes anteriormente al género *Streptococcus* y otras relacionadas. Son típicamente esféricas u ovoides, de 0,5 a 1,2 μm por 0,5 a 1,5 μm, y se agrupan en pares o en cadenas cortas. No forman esporas y no son motiles. Tienen la capacidad de crecer a 10- 45°C en pH óptimo de 6,0–6,5, que son las características más importantes usadas para su identificación. A temperaturas entre 20 °C y 30 °C, los lactococos se toman de 10 horas a 20 horas para fermentar la leche cruda. Algunas cepas forman material gelatinoso que las rodea a manera de capsula. Recuperables de leche cruda y algunas plantas. Los lactococos son los microorganismos mesofílicos mas usados para la producción de ácido en las fermentaciones lácteas, ya que son capaces de convertir rápidamente la lactosa en ácido láctico (Madigan y Martinko, 2005).

Entre las especies conocidas de lactococos, se encuentra, *Lcoc. lactis*, que es utilizado en la fermentación de productos lácteos, destacándose, como la más importantes, las subespecies *Lcoc. lactis* subsp. *lactis* y *Lcoc. lactis* subsp. *cremoris* (Cabeza, 2006; Martin, 2008; Parra, 2010).

Lactococcus lactis subsp *lactis* es una bacteria con propiedades biopreservadoras, ya que algunas cepas son capaces de producir nisina, una bacteoricina ampliamente usada en la industria y generalmente reconocida como segura por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) (Thomas *et al.*, 2000).

Numerosos estudios han sido publicados reportando la eficacia de la nisina para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, entre ellas *Listeria monocytogenes* y *Clostridium spp*; sin embargo, son escasos los que demuestran la efectividad sobre *Staphylococcus aureus* (Rodríguez *et al.*, 2005; Valbuena *et al.*, 2005; Felis *et al.*, 2009).

- ***Streptococcus spp***

El género *Streptococcus* es un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas con gran significado para la medicina y la industria, son esenciales en procesos industriales y lácteos y como indicadores de contaminación (Harrington *et al.*, 2002).

La mayoría de las especies de *Streptococcus* son anaerobios facultativos y algunos crecen únicamente en una atmosfera enriquecida con dióxido de carbono. Sus exigencias nutricionales son complejas, y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. Son capaces de fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico y también son catalasa negativos a diferencia de *Staphylococcus* (Patrick *et al.*, 2009).

Son cocos esféricos u ovoides de 0.8-1.2µm, típicamente dispuestos en cadenas hasta con más de 50 células o en pares. La especie *Streptococcus thermophilus* es termófilo, con cepas específicas que se utilizan en la fermentación de productos lácteos, sobre todo en combinación simbiótica con otras BAL. *Lb. bulgaricus* estimula al estreptococo liberando aminoácidos mientras que este forma compuestos relacionados con el ácido fórmico, que promueven el desarrollo del lactobacilo (Ryan y Ray, 2004; Hardie y Whiley, 2006; Martin, 2008).

Str. thermophilus es una bacteria homofermentativa termorresistente, presenta la habilidad de fermentar un pequeño número de carbohidratos, crece a un pH óptimo de 6.5 soporta una concentración máxima de NaCl de 2,5%, posee actividad proteolítica limitada, produce ácido láctico como principal producto de la fermentación, tiene menor poder de acidificación que el género *Lactobacillus* y ha sido usado tradicionalmente para la fabricación de yogurt y de varios quesos, como, por ejemplo el queso Emmental, Gruyère, Parmigiano, Grana, Mozzarella y Cheddar (Hassan *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2000).

Str. thermophilus crece más rápido y produce ácido fórmico y dióxido de carbono ambos

actividad proteolítica del *Lactobacillus* produce péptidos y aminoácidos que estimulan el crecimiento de *Streptococcus* (Di Marzo *et al.*, 2003).

- ***Enterococcus spp***

Las bacterias del género *Enterococcus* consisten en células esféricas u ovoides. Son inmóviles y carecen de capsula. Son catalasa negativos y anaerobios facultativos. El pH final al fermentar carbohidratos es de 4.2 a 4.6. Se desarrollan a temperatura de entre 10 a 45°C, a pH de 9.6 y en presencia de bilis al 40%, o de NaCl al 6.5%. Los *Enterococcus* son muy comunes en quesos y se les detecta en más del 96% de diferentes variedades de quesos italianos; su número depende de la etapa del proceso muestreada y de los periodos de maduración. En muchos quesos se utilizan como iniciadores y las células que sobreviven a la pasteurización se muestran muy activas y participan en la generación de aromas (Fernández, 2000). Los miembros de este género eran clasificados como *Streptococcus* Grupo D hasta 1984 cuando un análisis de ADN genómicos indicaron que un genero separado era más apropiado (Fischetti *et al.*, 2000; Tunger *et al.*, 2004; Guardado *et al.*, 2006).

2.4.3. Bacterias Acido Lácticas no iniciadoras

La microbiota láctica secundaria o adventicia, llamada NSLAB (Non Starters Lactic Acid Bacteria), se desarrolla espontáneamente en todos los quesos independientemente de la manera de producirlos (industrial o artesanal). Este grupo de microorganismos se compone fundamentalmente de lactobacilos mesófilos heterofermentadores facultativos y obligados como lo son *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, aunque también se incluyen otros lactobacilos homofermentadores como son *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Beresford *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2001).

Algunos autores atribuyen hasta el 80% de los defectos detectados en quesos a las NSLAB,

y aroma, por lo que se puede considerar en estos casos una contaminación deseable (Crow *et al.*, 2001).

Algunos lactobacilos pueden estar presentes en forma natural en la microbiota de productos lácteos formando parte de las llamadas BAL no iniciadoras (Coppola *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2001). Al contrario que las BAL de los cultivos iniciadores, estas especies suelen estar presentes al inicio de la fermentación en un número relativamente bajo ($10^2 - 10^3$ UFC/g). Algunos estudios sobre la dinámica poblacional de quesos, indican que se van produciendo cambios en la secuencias de especies predominantes, con un claro predominio de *Lb. paracasei* conforme se alarga el tiempo de maduración. Además se ha descrito la aparición y desaparición, así como la recurrencia de diferentes cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* a lo largo de la maduración (Fitzsimons *et al.*, 2001).

2.5. BAL y calidad del queso

Las bacterias ácido lácticas han sido empleadas por siglos en fermentaciones industriales y han despertado gran atención al ser utilizadas en la industria farmacéutica y de alimentos, especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los productos alimenticios y el bajo costo energético de su producción (De Vos, 2004; Wilches, 2005; Topisirovic *et al.*, 2006). Además durante la última década se ha incrementado el número de estudios sobre el empleo de algunas cepas de BAL como cultivos prebióticos (Topisirovic *et al.*, 2006). Sin embargo, las BAL también han sido asociadas como bacterias alterantes de alimentos y en mayor medida de productos cárnicos (Lyhs, 2002; Hemme y Foucaud, 2004; Cayréy *et al.*, 2005).

La biota láctica secundaria o adventicia, llamada NSLAB se desarrolla espontáneamente en todos los quesos, ya sea en aquellos obtenidos en ambientes industriales, con leche pasteurizada y cumpliendo estrictas normas de seguridad y calidad, como en los productos

casei, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum*, aunque también incluye otros lactobacilos, pediococos, micrococos y *Leuconostoc* spp. (De Angelis *et al.*, 2001; Quiberoni *et al.*, 2005).

En los quesos obtenidos industrialmente se utiliza leche de calidad controlada, pasteurizada, y el cuajo y el fermento son de características claramente definidas y constantes en el tiempo (Crow *et al.*, 2001). En este contexto, la estrategia que se ha delineado para superar los posibles defectos asociados al crecimiento de una flora láctica adventicia, es el agregado de fermentos de lactobacilos mesófilos, conocidos como fermentos adjuntos, de afinado, de maduración, o secundarios, entre otras denominaciones. También pueden ser parte de la formulación del fermento primario, pero aún en ese caso se consideran como un adjunto, más allá de la forma o el momento de su agregado a la tina, porque no contribuyen significativamente a la acidificación durante la elaboración del queso. Para el desarrollo de estos cultivos adjuntos, se aíslan lactobacilos de quesos de buena calidad, que presenten características sensoriales favorables y ningún defecto, y se estudian mediante ensayos *in vitro* e *in situ* para determinar sus características tecnológicas (Crow *et al.*, 2001). Finalmente, los fermentos adjuntos de lactobacilos pueden tener características multipropósito, ya que se ha comprobado que algunas cepas de *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* aisladas de queso, poseen potencialidad como cultivos probióticos (Ugarte *et al.*, 2004, Mishra y Prasad, 2005).

Los fermentos adjuntos, para ser adecuados, no deben contribuir a la acidificación durante la elaboración del queso, deben crecer rápidamente en la cuajada, alcanzar altas densidades al comienzo de la maduración y mantener altos recuentos ($\sim 10^7 - 10^8$ UFC g⁻¹) durante largos períodos. Asimismo, deben producir un balance de efectos deseables y ningún defecto en el producto final (Delgado y Mayo, 2004; Alegría *et al.*, 2010).

2.5.1. Otros microorganismos presentes en los quesos

Además de los grupos bacterianos que se acaban de señalar en los apartados es conveniente destacar la presencia de otros microorganismos que participan en la elaboración de los quesos, como la bacterias del ácido propiónico, bacterias de superficie, mohos y levaduras. Las bacterias del ácido propiónico están presentes en muchas variedades de quesos al final de su maduración y son utilizadas en particular en la producción del queso tipo Emmental, ya que son las principales responsables de proporcionar sus características particulares como consecuencia de la acumulación de gas durante la fermentación de azúcares y lactato a propionato, acetato, agua y CO₂ (Huang y Adams, 2004). Estos se dividen en dos grandes grupos: Las bacteria propiónicas cutáneas y las clásicas. Las clásicas son importantes en la microbiología de los quesos y dentro de ellas destacan las siguientes especies: *Propionibacterium freundenreihii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium jenseii* y *Propionibacterium acidipropionici*. En quesos elaborado con leche cruda pueden aparecer de forma natural, pero en aquellos quesos elaborados con leche pasteurizadas, las propionibacterium se añaden durante la elaboración del queso (Beresford *et al.*, 2001, Leverrier *et al.*, 2004).

El desarrollo de las bacterias propiónicas en quesos duros (larga duración) puede ser la causa de la hinchazón tardía en los quesos holandesas (Gouda y Edam) y quesos duros italianos (Grana y Parmigiano), aunque un tipo de hinchazón precoz en el queso Grana se atribuye a la presencia de *Clostridium butyricum* (Quiberoni *et al.*, 2004).

Respecto a mohos y levaduras se reporta su destacada presencia en el proceso de maduración de los quesos (Gerasimov *et al.*, 2001; Calleja *et al.*, 2002; Persic y Jovanovic, 2005; Lopandic *et al.*, 2006). Así mismo, poseen determinadas características particulares, entre éstas se encuentra su capacidad de fermentación/asimilación de la lactosa, la producción de enzimas proteolíticas extracelulares (ejemplo lipasas), la asimilación del

Las levaduras se aíslan con mayor frecuencia en la superficie de los quesos y son, entre otras especies: *Debaromyces hanseii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Trihosporon beigeli* (Beresford *et al.*, 2001). Estas utilizan el ácido láctico presente, derivado de la degradación de la lactosa y algunas producen enzimas proteolíticas y lipolíticas, las cuales influyen directamente en el proceso de maduración (Corsetti *et al.*, 2001). Sin embargo, pueden ocasionar defectos en las leches fermentadas y en los quesos produciendo gas, aromas frutados, decoloraciones y cambios en la textura (Cook y Sandeman, 2000). Las elevadas concentraciones de levaduras contaminantes en cultivos naturales de suero se han relacionado con problemas de hinchazón precoz en los quesos duros argentinos (Crosa *et al.*, 2009).

La presencia de mohos como agentes secundarios en la maduración interviene a nivel de sus enzimas proteasas y lipasas, las cuales contribuyen a la textura y sabor de cada tipo de queso. El crecimiento de mohos en la superficie proporciona una apariencia, color y sabor determinado (Fernández *et al.*, 2009). Por ejemplo, Beresford *et al.*, (2001) reporta que la presencia de *Penicillium roqueforti*, en el queso Roquefort, Gorgonzola, es responsable de las venas azules de estos quesos. De forma similar, la especie relacionada *Penicillium Camemberti* es la responsable de los cambios en la superficie del queso Camembert.

2.6. Cultivos iniciadores

La primera evidencia de la presencia de microorganismos iniciadores ocurrió en 1873 cuando Lister aisló un cultivo iniciador puro y confirmó su importancia en la fabricación de los quesos. Sin embargo, es a partir de 1890 cuando comienza a desarrollarse la tecnología de los cultivos iniciadores en quesos. Tradicionalmente, estos cultivos están desarrollados a partir de los microorganismos nativos de la leche. Para su obtención, se inducía el crecimiento de estos microorganismos mediante el calentamiento de la leche (Powell *et al.*, 2002) para posteriormente utilizar el suero obtenido como un cultivo para el siguiente. Sin embargo, por la necesidad de obtener productos finales uniformes e incluso con la finalidad

específicos constituidos por microorganismos bien definidos. Actualmente la mayor parte de la producción está destinada a la industria láctea, situándose en 2002 la cuota de mercado a los 250 millones de dólares/año (Hansen, 2002).

El principal papel de los cultivo iniciadores es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa con la disminución del pH. Beresford *et al.*, (2001) definieron a los cultivos iniciadores como aquellos aislados capaces de producir ácido láctico hasta reducir el pH por debajo de 5.3 en 6 horas y a una temperatura de 30-37°C. Esta reducción del pH afecta la actividad enzimática y la solubilidad de los diferentes minerales (principalmente calcio y fosfatos). Los cultivos iniciadores también pueden tener un papel importante durante la maduración, debido fundamentalmente a la producción de compuestos aromáticos a partir de la lactosa, el citrato, proteína y los péptidos de la leche, además de contribuir en la textura, como consecuencia de la degradación de las proteínas y grasas. Así los aminoácidos originados por la degradación de las proteínas, servirán como precursores para la formación de compuestos volátiles responsables en gran parte de la características organolépticas del queso (Martin, 2008). Estos cultivos crecen desde el comienzo de la coagulación, hasta alcanzar densidades celulares muy altas en las primeras horas de fermentación (10^8 - 10^9 UFC/g). Posteriormente, hay una disminución gradual a lo largo de la maduración del queso. Entre la cepas que se utilizan para este fin destacan las especies de *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* en el caso de los cultivos mesófilos (crecimiento óptimo a 30-37°C), y *Str. thermophilus* y especies de *Lactobacillus* como lo son *Lb. delbrueeckii* y *Lb. helveticus* en el caso de los termófilos (crecimiento a 42°C) (Beresford *et al.*, 2001). En el caso de los quesos artesanales que se suelen fabricar sin la adición de cultivo iniciadores, los lactococos presentes en la leche suelen ser los que predominan en la maduración del queso (Martin, 2008).

Los cultivo iniciadores primarios son aquellos cultivos empleados en la producción del queso destinados a desarrollar y controlar el aroma, color y textura del queso (Raltray, 2002). Estos cultivos están conformados por diferentes tipos de bacterias, mohos y

los son la halotolerancia, crecimiento a bajo pH, utilización del lactato, formación de CO₂ o propiedades particulares de proteólisis y lipólisis. Entre estos cultivos destacan *Geo. candidum* que suele encontrarse en quesos con maduración de superficie tanto bacteriana como de levaduras (Martin, 2008).

En el caso de los quesos artesanales, como ocurre con numerosas variedades españolas y mediterráneas como el queso Majorero español y el Pecorino sardo italiano, que se suelen elaborar sin la adición de cultivos iniciadores, los *Lactococcus* presentes en leche son los microorganismos que suelen predominar al inicio de la maduración. El género *Enterococcus* suele aparecer también en aquellos quesos elaborados con leche cruda, aunque actualmente se está incrementando el uso de cultivos iniciadores definidos también en los quesos de elaboración artesanal (Congan, 2002).

Otro de los efectos positivos de los cultivos iniciadores en la fabricación de quesos es la aceleración de los tiempos de maduración, lo que se ha traducido en una reducción de costos considerables para la industria (Azarnia *et al.*, 2006). Estos cultivos pueden estar formados por células atenuadas o por células viables, existiendo además la posibilidad de una combinación de ambas (El Soda *et al.*, 2000).

Finalmente, los cultivos iniciadores se pueden clasificar de diferentes formas, pero en general pueden ser cultivos definidos o indefinidos en función del conocimiento que se tenga de su microbiota constituyente (Beresford *et al.*, 2001). Estos cultivos se pueden suministrar en dos formas: mediante la producción de grandes volúmenes de cultivos frescos, o preferentemente, mediante la preparación de cultivos concentrados (coagulados o liofilizados) suministrados por diferentes proveedores (Giraffa, 2004).

2.7. Amplificación de la región 16S y 18S del ADNr

posible diseñar pruebas específicas contra grupos particulares de microorganismos, lo que permite estudiar con mayor eficiencia los cambios de las comunidades microbianas bajo condiciones naturales (Hurt *et al.*, 2001). El uso de las técnicas que involucran al ADNr se ha visto favorecido por la implementación de la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR). Para la amplificación y posterior secuenciación de estas regiones conservadas del genoma se emplean cebadores específicos. El uso de secuencias del ADNr 18S para la identificación de mohos no está tan extendido como el del ADNr 16S para la identificación de bacterias, a causa de la menor variabilidad en la secuencia del ADNr 18S. Por ello la identificación de bacterias basadas en la comparación de secuencias del ADNr 16S aun en la actualidad continúa usándose. Por el contrario, el uso de secuencias de ADNr 18S para la identificación de mohos ha sido sustituido por el de secuencias correspondientes a las regiones espaciadoras intergénicas (ITS) (López, 2011). El clúster del ADN ribosómico de eucariotas consiste en una repetición en tándem de tres regiones codificantes (18S, 5.8S y 28S) y dos regiones no codificantes que actúan a modo de espaciadores (Internal Transcribed Sequences – ITS e Intergenic Sequences-IGS) (Michaelson *et al.*, 2009; Piñar y Sterflinger, 2009).

2.8. Antecedentes en el uso de métodos fenotípicos y genotípicos para la caracterización de microorganismos en quesos

Hasta ahora gran parte de los estudios relacionados con la microbiología de los quesos, se han basado en técnicas clásicas que implican la siembra y el recuento posterior en medios selectivos, y han estado dirigidos principalmente, a la descripción de géneros ó grupos microbianos previamente identificados como representativos de este hábitat (Giraffa, 2004). Los métodos fenotípicos constituyen una herramienta de suma importancia para la tipificación de muchos microorganismos, no obstante, el alcance de estos procedimientos puede encontrar serias restricciones (Vilchez y Alonzo, 2009), entre las cuales se encontraron algunos rasgos fenotípicos que son susceptibles a la influencia del ambiente,

reproducibilidad o poder discriminatorio. Adicionalmente, presentan la desventaja de encontrarse, en algunos casos, limitados a unas pocas especies. Ello ha limitado indudablemente los resultados y el hallazgo de otros microorganismos implicados, que previamente no habían sido referidos o eran difíciles de cultivar. Las técnicas moleculares de análisis del ADN y ARN han supuesto un gran avance en la identificación y tipificación de estos microorganismos (Olivera, 2011). Estos métodos genotípicos están basados en la detección del material genético del organismo, y por lo tanto son independientes de los cambios en el patrón de expresión genética y de las influencias ambientales, ofreciendo una alternativa con mayor estabilidad y reproducibilidad. Los métodos de genotipificación se han constituido en una herramienta que complementa a los procedimientos fenotípicos (Versalovic y Lupski, 2002).

En la actualidad existen antecedentes que describen la microbiota encontrada en quesos artesanales durante el proceso de elaboración y maduración, utilizando métodos fenotípicos y genotípicos de análisis. Tal es el caso del queso Zlatar que durante la maduración de este y empleando la combinación de métodos fenotípicos (API 50 CH) y moleculares (rep-PCR) fueron identificadas bacterias de los géneros: *Lb. paracasei subsp. paracasei*, *Lb. brevis*, *Lb. lactis subsp. lactis*, *Ent. faecium* y *Ent. faecalis* (Terzic *et al.*, 2007). Florez y Mayo (2006), caracterizaron también la microbiota del queso con denominación de origen Cabrales y encontraron géneros tales como: *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lcoc. raffinolactis*, *Str. parauberis*, *Lcoc. lactis*, *Lb. kefir*, *Lb. buchneri*, *Lb. parabuchneri*, *Bifidobacterium psychroaerophilum*, *Geo. candidum*, *Deb. hansenii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *Pen. roqueforti*, *Chrysogenum*, y *P. griseofulvum*. Ramos *et al.*, (2009), aislaron, identificaron y caracterización bacterias ácido lácticas empleando métodos fenotípicos y genotípicos, durante la elaboración de un queso crema tropical, habiendo identificado cinco especies de *Lb. fermentum* y una especie de *Lb. pentosus*. Finalmente, Randazo *et al.*, (2010) reporta la diversidad y dinámica poblacional del queso artesanal Pecorino Crotones, en el cual por medio de la secuenciación 16S ARNr se demostró la presencia de especies de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* en la cuajada y

Varios autores han realizado la caracterización de diferentes productos mediante el empleo de estos tipos de análisis (fenotípico y genotípico), un ejemplo son las investigaciones de Kunene *et al.*, (2000) donde se utilizaron métodos fisiológicos y moleculares para caracterizar la microbiota láctica de un alimento de destete a base de sorgo fermentado. Determinaron el origen de las cepas predominantes mediante el análisis de los resultados de AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados), encontrando que *Lb. plantarum* provenía del polvo de sorgo usado como ingrediente y como las cepas de *Lcoc. mesenteroides* no mostraban un origen común, se sugirió entonces que provenían de las casas donde se preparó el alimento.

2.8.1. Tipificación molecular de microorganismos no cultivables en el queso

Recientemente, se han aplicado diversas metodologías no basadas en el cultivo para el análisis de los microorganismos en el queso, tal es el caso del queso Stilton, en el cual se empleó la combinación de dos técnicas como la DGGE y la de hibridación fluorescente *in situ* o FISH demostraron la presencia de *Lcoc. lactis*, *Ent. faecalis*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Leuc. mesenteroides*, *S. equorum*, y *Staphylococcus* agrupados en diferentes zonas del queso, demostrando de esta forma, una actividad fisiológica diferencial de estos microorganismos durante la fermentación de este tipo de queso (Ercolini *et al.*, 2003). Otro estudio realizado fue el de Cocolin *et al.*, (2004) en la cual se empleó el protocolo basado en el DGGE donde se caracterizó la presencia de *Clostridium* spp. La producción de queso artesanal también ha sido evaluada utilizando la técnica de PCR-DGGE en el queso Pecorino Siciliano demostrando la dominancia de los microorganismos *Lcoc. lactis* y *Str. thermophilus* durante su proceso de elaboración (Randazzo *et al.*, 2006). Nikolic *et al.*, (2008) reporta que mediante el uso de métodos microbiológicos y moleculares como rep-PCR con (GTG), determinó la presencia de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, como cepa predominante del queso Bukuljac, así mismo, por PCR-DGGE reveló a la

industriales utilizando el análisis de DGGE, con la cual se mostro la presencia de *Streptococcus thermophilus* en todos los quesos estudiados y el dominio de *Enterococcus*. *Lactobacillus rhamnose* y *Lactobacillus casei* en la mayoría de los quesos. Además de la presencia de *Lactococcus lactis* como control.

3. JUSTIFICACIÓN

El queso cotija es un producto madurado, elaborado de manera artesanal en el país, al que se le ha prestado poca atención, a pesar de ser un producto de gran tradición y muy apreciado en la región, pues se ha elaborado desde hace 400 años. Durante la elaboración de este queso se generan olores, sabores y atributos de textura que hacen que el queso cotija sea tan singular y que lo distinguen de otros quesos en México y en el mundo. A pesar de su importancia, este producto no ha sido estudiado a fondo, como muchos otros productos alimenticios elaborados de manera artesanal en México y aunque actualmente existe la norma NMX-735-COFOCALEC-2011 (Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Alimento Regional-Queso cotija Artesanal Madurado-Denominación, Especificaciones y Métodos de Prueba) donde se señalan las especificaciones para este producto, aun no se conoce específicamente como es que se obtienen estas características organolépticas tan apreciadas durante su elaboración. Al respecto, se sabe que muchas de estas características son causadas por cambios fisicoquímicos y por el metabolismo de los microorganismos presentes. Las actividades metabólicas de mayor impacto sobre las características organolépticas del producto son la proteólisis, lipólisis y catabolismo de carbohidratos. El queso cotija se elabora con leche cruda entera y sin ningún tratamiento térmico, por lo que la microbiota presente en la leche y la que se va adicionando durante el proceso es la encargada de la maduración. Los microorganismos responsables de la fermentación láctica son fundamentalmente las Bacterias Acido Lácticas (BAL), aunque también se pueden encontrar otros microorganismos pertenecientes a otros grupos como micrococos, estafilococos, bifidobacterias, propionibacterias, mohos y levaduras. El establecimiento y aplicación de las buenas prácticas de higiene puede apoyar la estandarización de este proceso de elaboración enfocado a incrementar la calidad del queso cotija. Adicionalmente, el análisis, y el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en cada una de las etapas del proceso de producción y maduración del queso cotija puede incrementar el conocimiento de la generación de las características organolépticas tan apreciadas en este alimento. Finalmente, el desarrollo de cultivos iniciadores puede permitir obtener quesos

4. HIPÓTESIS

La caracterización de la microbiota asociada al queso cotija permitirá obtener información útil de sus características de inocuidad, condiciones adecuadas de elaboración y microorganismos involucrados en la impartición de las características organolépticas en este producto.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar la microbiota presente durante el proceso de elaboración y maduración del queso.

5.2. Particulares

1. Determinar la calidad sanitaria de la leche con que se elabora este queso y la calidad sanitaria del queso.
2. Caracterizar fenotípicamente e identificar genéticamente a los microorganismos presentes en las principales etapas del proceso de producción y maduración del queso.
3. Elaboración de un cultivo iniciador para la elaboración de un queso similar al cotija.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Zona de colecta

La zona de la región de origen, presenta una forma de herradura orientada al norte, abarca una superficie de aproximadamente 2 400 km², de los 19°15' a los 19°40' de latitud norte y de los 102°30' a los 103°05 de longitud oeste. Es una zona continua, ubicada en la sierra Jal-Mich, entre los estados de Jalisco y de Michoacán, incluyendo principalmente los municipios de Santa María del Oro (Jalisco) y la parte sur de los municipios de Cotija y de Tocuambo (Michoacán). Además se extiende a territorio de los municipios siguientes: norte de Jilotlan de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupán (Jalisco); suroeste de los Reyes, Peribán y Tancítaro, y norte de Buena Vista Tomatlán (Michoacán). Los municipios que se involucraron y que cuentan con productores participando en el proceso de calificación del queso cotija son seis: Santa María del Oro, Jilotlan de los Dolores y Quitupán (Jalisco); Cotija, Tocuambo y Buena Vista Tomatlán (Michoacán) (Figura 2). Las muestras microbianas involucradas en el proceso de elaboración del queso cotija fueron obtenidas de productores de la región de origen de los municipios de Santa María del Oro, Jilotlan de los Dolores y Quitupán, Jalisco, y por parte del estado de Michoacán las muestras se obtuvieron de los municipios de Tocuambo y Cotija.



6.2. Composición química porcentual de la leche

El contenido de humedad, cenizas extracto etereo y carbohidratos totales en las diferentes muestras de leche se determinó de acuerdo a la metodología propuesta en la AOAC (2001).

6.3. Calidad sanitaria del proceso de elaboración del queso cotija

La determinación de la calidad sanitaria de la leche cruda entera y de los talleres de elaboración del queso se inicio con la realización de un diagnostico actual. Para lo cual se realizaron visitas a cada explotación lechera y a los talleres de elaboración de queso, donde se observaron puntos esenciales al flujo de las operaciones para detectar cruces y retornos inadecuados en el sentido de la línea de producción del queso cotija. Se aplicó un cuestionario al personal encargado de la extracción de la leche. Este cuestionario se basó en el conocimiento del personal en la aplicación de los sistemas de sanidad conocidos como BPH y Procedimientos Operativos Estándar de Saneamiento (POE'S) producción (NMX-F-730-COFOCALEC-2008; Guía de Prácticas de higiene recomendadas para la obtención de leche, y validada por Fundación Produce Michoacán). (Anexo I).

6.4. Selección de las explotaciones lecheras y talleres de elaboración de queso

Este proyecto se realizó en la región de origen de producción del queso cotija; donde fueron muestreados 42 explotaciones lecheras y 42 talleres de elaboración del queso cotija.

Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- 1.- Productores dispuestos a adoptar el programa de Buenas Prácticas de Higiene durante el proceso de elaboración.
- 2.- Productores con características similares en cuanto al manejo (número de quesos

Exclusión:

1.- Productores que no tienen la disponibilidad para mejorar el proceso de elaboración del queso cotija.

Nota: Los 100 productores son miembros de la Asociación de Productores de queso cotija, región Jalisco-Michoacán.

6.4.1. Selección de los puntos de muestreo

Después de realizar el diagnóstico en cada una de las explotaciones, se establecieron los puntos de muestreo de acuerdo al flujo del proceso de obtención de la leche. Para evaluar la calidad microbiológica de la leche fueron tomadas muestras de las cántaras o tambos donde se recolecta; así como de los utensilios (cántaras, cubetas, tambos de recolección), superficies (manos de los trabajadores y ubres) que se emplea para el lavado de utensilios. La determinación de la calidad sanitaria del queso se muestreo durante las etapas de procesamiento (cuajada, cuajada mas sal, un mes de maduración y tres meses de maduración).

6.4.2. Toma de muestras

Para la recolección de las muestras de leche se tomaron 100 ml en frascos de vidrio estériles y para las muestras de quesos 100 g en bolsas de plástico estériles. En los quesos a diferentes etapas de maduración se tuvo especial cuidado de tomar las muestras en el centro y en un punto situado a una distancia mínima de 10 a 20 cm del borde, pasando por el centro hasta aparecer por el lado opuesto de profundidad (NMX-F-718- COFOCALEC-2006). Todas las muestras fueron transportadas en una hielera a 5⁰C para su procesamiento directo.

6.5. Análisis microbiológico

Las determinaciones microbiológicas para leche fueron: Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) y Organismos Coliformes Totales (OCT), tanto en leche cruda entera como en superficies y utensilios. La metodología aplicada para cada determinación fue la propuesta por la NOM-092-SSA1-1994 para BMA y la NOM-113-SSA1-1994 para OCT.

Para determinar la calidad sanitaria del queso, se tomaron muestras de quesos que tuvieran 3 meses de maduración de acuerdo a lo establecido por las reglas de uso. Para *Salmonella* sp. La NOM-114-SSA1-1991, para *S. aureus* la NOM-115-SSA1-1991 y para la presencia o ausencia de *Escherichia coli* se utilizó el Método de MUG+Fluorescencia. Todos los análisis se realizaron en un lapso no mayor de dos horas de obtenidas las muestras en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos del CIIDIR-Michoacán.

Para las variables BMA y OCT se utilizó un diseño experimental de muestras apareadas donde las observaciones de los dos tratamientos (antes y después de la aplicación de las Buenas Prácticas de Higiene) en leche se comparó aplicando la prueba de *t student* a un nivel de significancia del 0.05 (Wayne, 1990). Finalmente, en el queso se utilizó la estadística descriptiva para las variables *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y para BMA y OCT.

6.5.1. Implementación de BPH durante el proceso de elaboración del queso cotija

Para la implementación de las BPH se tomaron en cuenta los siguientes aspectos de acuerdo de acuerdo a la NOM-120-SSA1-1994:

Proyecto y construcción de las instalaciones

Vías de acceso, patios, edificios, pisos, pasillos, paredes, techos, puertas, ventanas, rampas

estructuras y materiales, se observó que el equipo que se use este de tal manera que permita un mantenimiento y limpieza adecuado.

Control de las operaciones

Para esta actividad se realizaron los muestreos, educación al trabajador y la inspección de la leche y el proceso de elaboración y maduración del queso cotija con la finalidad de contribuir a la protección del consumidor.

Instalaciones, mantenimiento y saneamiento

En este apartado se hicieron anotaciones sobre los servicios de mantenimiento a cada una de las explotaciones lecheras y a los talleres de elaboración del queso, los periodos cuando se realiza limpieza del área de ordeño y si en los talleres se cuenta con programas de mantenimiento, la disposición del contenido de los recipientes para desechos, instalaciones sanitarias, así como los procedimientos de limpieza y desinfección.

Higiene personal

Uno de los conceptos más importantes en el manejo de la leche indudablemente es la higiene del personal que permite asegura la calidad sanitaria de acuerdo a lo estipulado por el 21 CFR-110.1-110.110. (Prácticas de Buena Manufactura, Manufactura, Empaque, Almacenamiento de los Alimentos para seres humanos), por lo que se realizaron platicas constantes al trabajador, sobre Buenas Prácticas de Higiene durante el proceso de obtención de la leche y en la elaboración del queso, así como la importancia de la higiene en su persona.

Elaboración de POE'S

6.6. Caracterización de la microbiota asociada al queso cotija

Los muestreos se realizaron mensualmente en la sierra Jalisco-Michoacán, donde se eligieron dos productores: uno con características rústicas, perteneciente a la población de Lourdes del municipio de Cotija, Michoacán y el segundo productor con características semi-industriales ubicado en La Troja municipio de Quitupan Jalisco. En los muestreos del productor artesanal se obtuvieron muestras de queso en cuatro etapas del elaboración (cuajada, cuajada más sal, un mes de maduración y tres meses de maduración). Para el productor semi-industrial únicamente se muestreo cuajada, cuajada mas sal y un mes de maduración. De cada una de las etapas en estudio fueron pesados 25 g de queso. Las muestras con uno y tres meses de maduración se tomaron de la parte central del queso, haciendo el corte mediante un bisturí previamente flameado, al cual sde le retiró las partes externas. Las muestras fueron transportadas en un termo con nitrógeno líquido para mantener la integridad de la biota presente.

6.6.1. Análisis físico-químico del queso cotija

Para realizar el análisis de proteína y humedad en queso se siguió la metodología propuesta por la AOAC (2000), y para grasa en base seca utilizando el método propuesto por la FAO/WHO.

6.6.2. Enumeración microbiológica del proceso de elaboración del queso cotija

Las determinaciones microbiológicas fueron: BMA, mohos y levaduras y BAL. La metodología aplicada para cada determinación fue la propuesta por la NOM-092–SSA1-1994 para BMA y la NOM-111-SSA1-1994 para mohos y levaduras. Para la determinación de las BAL se aplicó la técnica de vaciado en placa empleando el medio MRS.

6.6.3. Aislamiento de bacterias y levaduras

Se colocaron 10 gramos de muestra en bolsas estériles que contenían 90 ml de agua peptonada al 1%, se tomaron alícuotas de diluciones seriadas. Estas fueron sembradas por duplicado en placas de MRS (BD Difco) para BAL, Agar Papa Dextrosa (PDA) (Bioxon) para el aislamiento de levaduras, así como en Agar Cuenta Estándar (ACE) (Difco) para el recuento de BMA. Se seleccionó la dilución 10^4 de los medios MRS y PDA donde se desarrollaron aproximadamente 100 colonias aisladas, de las cuales se tomaron 10 de cada medio con un palillo estéril, luego fueron cultivadas en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y conservadas a -10°C .

6.6.4. Identificación de BAL

Una vez aisladas las bacterias se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Tinción de Gram, Catalasa, Movilidad, CO_2 glucosa, desarrollo a 10° y 45°C , desarrollo en NaCl 6.5 mM y 1.8 mM, pH 4.0 y 9.6, principalmente para bacterias ácido lácticas (géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Tetragenococcus* de acuerdo al cuadro 2 (Bergey's, 2001).

Cuadro 2. Diferenciación de los géneros de bacterias lácticas. Car= *Carnobacterium*, Vag= *Vagococcus*, Ltob= *Lactobacillus*, Leuc= *Leuconostoc*, Aer= *Aerococcus*, Ped= *Pediococcus*. Ent= *Enterococcus*, Str= *Streptococcus* Lcoc= *Lactococcus*, Tetr= *Tetragenococcus*

	<i>Car</i>	<i>Ltob</i>	<i>Aer</i>	<i>Ent</i>	<i>Lcoc</i>	<i>Vag</i>	<i>Leuc</i>	<i>Ped</i>	<i>Str</i>	<i>Tetr</i>
Características										
Bacilos	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocos	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tétradas	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Movilidad	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CO ₂ Glucosa	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-
Desarrollo a 10° C	+	+/	+	+	+	+	+	+/	-	+
Desarrollo a 45° C	-	+/	-	+	-	-	-	+/	+/-	-
NaCl 1.8 mM	-	+/	+	+	-	-	+/-	+/	-	+
NaCl 6.5 mM	-	-	--	-	-	-	-	-	-	+
pH 6.4	-	+/-	-	+	+/-	+/-	+/	+	-	-
pH 8.6	-	-	+	+	+/-	+/-	+/	+	-	-

Después de la caracterización preliminar por géneros se realizaron las pruebas de fermentación de carbohidratos, para lo cual se utilizaron los siguientes: Arabinosa, Galactosa, Lactosa, Maltosa, Manitol, Melobiosa, Ramnosa, Sorbitol, Sacarosa, Trehalosa y Xilosa. También se evaluó el crecimiento a diferentes temperaturas, las cuales fueron: 15 °C y 45 °C para la identificación de la especie de acuerdo al manual de Bergey's (2001).

6.6.5. Identificación de levaduras

Para la identificación de levaduras se realizaron pruebas distintivas de los géneros: características macro y micro morfológicas, producción de ureasa, asimilación de nitrato, asimilación de inositol, rafinosa, lactosa, xilosa, manitol, glucosa, galactosa, ramnosa, trealosa, crecimiento a 48 °C y a pH de 8.0 (Linares y Solis, 2001).

6.6.6. Aislamiento de microorganismos del queso para la identificación por métodos moleculares

La colección microbiológica analizada en este estudio fue aislada en colaboración dentro del grupo de trabajo y el detalle del aislamiento y caracterización preliminar fue reportado por Barrera (2011). A continuación se describe brevemente la metodología de aislamiento: Una porción de 10 g de queso obtenido en las cuatro etapas de elaboración, se colocó en una bolsa estéril que contenía 90 ml de agua peptonada al 1% y se homogenizó en el Stomacher. Una dilución fue inoculada en placas de agar MRS por duplicado para BAL y PDA para la identificación de mohos y levaduras. Una vez obtenidos los aislados del medio, se tomó una azada del cultivo en medio MRS para BAL, de cada una de las muestra y se colocó en 10 ml de medio Luria-Bertani (LB), para posteriormente incubarla a 37°C durante 24 horas en una incubadora rotatoria a 100 rpm. Posteriormente para los aislados de mohos y levaduras se procedió de la misma forma, la azada tomada del medio PDA sólido fue depositada en 100 ml de medio PDA por cinco días a 25°C en una incubadora rotatoria a 250 rpm. De los cultivos en medio líquido LB y PDA, se tomó 1 ml del caldo de cultivo, el cual se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, previamente pesado, posteriormente se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm descartándose el sobrenadante, se repitió la operación hasta tener la cantidad requerida de muestra. Se agregaron de 800-1000 µl de agua estéril miliQ, posteriormente se agitó vigorosamente en el vortex, asegurándose que la pastilla estuviera completamente disuelta, seguido de centrifugación por 2 min a 13,000 rpm, descartándose el sobrenadante.

6.6.7. Extracción del ADN de los aislados bacterianos

La extracción del ADN total se realizó mediante la metodología descrita por Raeder y Broda (1985). Se depositaron de 40 a 50 mg de muestra en nitrógeno líquido por 20 minutos en tubos eppendorf estériles seguidos de una maceración por 5 min con pistilo estéril. Se agregaron inmediatamente 500µl de amortiguador de extracción (temperatura

de fenol-cloroformo (50/50) (4°C) y se mezclaron en vortex a máxima velocidad durante 5 min y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf, donde se le adicionaron 400µl de cloroformo frío (4°C). Se mezcló durante 1min, y se colocó en vortex para homogenizar la muestra y se centrifugó durante 5min a 13000 rpm. Se le añadió 8µl de RNAsa (10mg /ml) (Invitrogen, US). Se incubó durante 30 min a 37°C en block caliente. Se le adicionaron 500µl de isopropanol frío (4°C) y se mezcló por inversión ligera y se incubó a -20°C durante 15 min. Se centrifugó durante 5 min. El sobrenadante se desechó, se añadieron 500µl de etanol al 70% a 4°C, se mezcló por inversión ligera, se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante se desechó y la pastilla se seco en papel secante durante 30min, esta se re suspendió en 30 µl agua estéril miliQ y se conservó -20°C.

6.6.8. Extracción del ADN fúngico

Se extrajo el ADN genómico presente, empleando el protocolo propuesto por Rojas y Herrera (2008), el cual fue desarrollado para la extracción de DNA a partir de comunidades bacterianas con altas cantidades de polisacáridos. La metodología utilizada se describe a continuación: el ADN en la solución contaminada se mezcló con 20 µl de solución de incubación (5 ml del precipitado obtenido a partir de 1 g de dióxido de silicio). Posteriormente fue agitado suavemente esta solución por 5 minutos y se centrifugó a 12,000 g por 20 seg. La pastilla resultante fue lavada en 200 µl de solución de lavado (95% alcohol, 5% [0.2 M NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH 7.0] y se centrifugó a 12,000 g por 20 segundos. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Los fragmentos de ADN fueron recuperados de la solución adicionando de 20 a 30 µl de amortiguador TE (10 mM Tris HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA) e incubados a 37° C por 5 min. Posteriormente la solución se centrifugó a 11,500 g por un min. La solución de ADN fue transferida a un nuevo tubo para su uso posterior y la pastilla fue descartada.

6.6.9. Determinación de la integridad del material genético mediante electroforesis en gel de agarosa

Se preparó una solución de agarosa (BIO Basic Inc.) al 1% p/v; disolviéndose en amortiguador TBE 1x (108 gr Trisma Base; 55 gr Acido Bórico; 40 ml EDTA 0.5M pH 8). Se disolvió esta solución de agarosa en amortiguador calentando en un horno de microondas. La agarosa ya disuelta se colocó en un soporte para el gel, sellando con cinta adhesiva esperando a que gelificara. Se colocó el peine de acuerdo a los pocillos que se necesitaron. Se retiró la cinta adhesiva con la que se selló el soporte del gel y se colocó en la cubeta de electroforesis. Los pocillos quedaron cerca del cátodo (polo negativo). Se añadió amortiguador de electroforesis TBE 1X, de forma que cubriera bien el gel de agarosa. Se aplicó la muestra preparada de la siguiente manera: 2 μ l de colorante y 3 μ l de muestra, teñido con Syber Gold™ (Invitrogen, US), colocando el marcador de peso molecular 100 bp ADN Ladder (PROMEGA Corp. US) como referencia. Se programó la fuente a 80 voltios de energía y el gel de electroforesis se corrió durante 45 min. Una vez acabada la electroforesis se visualizó el ADN mediante luz UV y se tomó una fotografía de la imagen en el foto documentador (KODAK Gel Logic 112).

6.6.10. Cuantificación del ADN obtenido

La estimación de la cantidad de ácidos nucleicos en las preparaciones se realizó por espectrofotometría, en la cual se realizó una estimación de la cantidad de radiación UV absorbida por las bases nitrogenadas. Para cuantificar la cantidad de ADN, se registraron las longitudes de onda a 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm se utilizó para calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. En el caso de los ácidos nucleicos una densidad óptica (DO) de 1 corresponde a ~50 μ g/ml de doble hebra de ADN, 40 μ g/ml de hebra simple de ADN ó ARN, y a ~33 μ g/ml de hebra simple de oligonucleótidos. La relación entre las lecturas de 260 nm y 280 nm provee una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos, de esta forma una relación menor a 1.8 indica que la muestra se encuentra

las lecturas de las longitudes de onda: 260 y 280 nm, y se calcularon con la siguiente fórmula:

Concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$) = $(A_{260} \times 40) \times \text{Factor de Dilución}$ (Sambrook y Rusell, 2001). Donde 40 es el grado de corrección relativa a la naturaleza de la doble hebra de ADN.

6.6.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

a) Amplificación del gen 16S ARN ribosomal de bacterias

La reacción PCR fue aplicada para amplificar regiones utilizadas en la identificación a nivel de especie de los aislados obtenidos del queso cotija. Se utilizaron dos oligonucleótidos reportados previamente para la hibridación con las regiones filogenéticas conservadas de la subunidad 16S ribosomal de eubacterias. Para la región 16S se usaron los cebadores descritos por Strom *et al.*, (2002) (16S-for 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y 16S-rev 5'CGGGAACGTATTCACCG 3'). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μl , utilizando 1 μl del ADN, 2.5 μl de Amortiguador 10X, 0.75 μl de cloruro de magnesio 50 mM, 0.2 μl de dantos 10 mi, 1 μl de cada uno de los iniciadores (16S Forward y 16 S Reverse) 0.5 mi y 0.2 μl de la enzima Taq DNA polimerasa 5 U/5 μl (Gibco-BRL, Rockville, MD), 0.5 de BSA (Albumina bovina) al 10% y completando el volumen a 25 μl con agua milliQ estéril. El programa de amplificación consistió de 1 ciclo de desnaturalización por 5 min a 95°C y 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 50 seg a 59°C, 1 min a 72°C, por último se dio un paso de extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% mezclando 5 μl del producto de PCR con 3 μl de Syber GoldTM y depositándolos en el mismo, el cual se corrió en una cámara de electroforesis de la marca Bio-Rad a 100 volts por 30 min. De igual manera los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.0% teñido con Syber GoldTM 10X, grabando la imagen en el programa Kodak digital ScienceTM 1D. Los productos de PCR fueron purificados con el Sistema comercial Wizard SV and PCR clean up System de Promega, para su posterior secuenciación.

b) Amplificación de la región ITS presente en eucariotas

Los mohos y levaduras fueron determinados empleando las regiones ITS del ADN ribosomal ya que como se menciona anteriormente estas regiones espaciadoras del ADN evolucionan mucho más rápido que las regiones codificantes, ya que las sustituciones en las regiones espaciadoras no muestran efectos letales para los microorganismos, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos en sentido ó ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') y el oligonucleótido en anti sentido ó ITS 4 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') (White *et al.*, 1990). En solo dos casos de levaduras que no fueron bien responsivas para los cebadores ITS fue necesario aplicar los oligonucleótidos NL1 (5' GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') y NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') descritos por (White *et al.*, 1990) para este análisis. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Perkin Elmer GeneApm PCR system 9700, Applied Biosystems). Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µl, utilizando 1 µl del ADN, 2.5 µl de Amortiguador 10X, 0.75 µl de cloruro de magnesio 50 mM, 0.2 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada uno de los iniciadores 0.5 mM y 0.2 µl de la enzima Taq ADN polimerasa (Gibco-BRL, Rockville, MD), 5 U/5 µl y completando el volumen a 25 µl con agua milliQ Isteril. El programa utilizado consistió de 1 ciclo de desnaturalización por 5 min a 94°C y 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 50 seg a 58°C, 72°C durante 1 min y 72°C por 7 min como paso de extensión final. Posteriormente los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% mezclando 5 µl del producto de PCR con 3 µl de Syber Gold™ y depositándolos en este, el cual se corrió en una cámara de electroforesis de la marca Bio-Rad a 100 volts por 30 min. De igual manera los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.0% teñido con Syber Gold™ 10X, grabando la imagen del en el programa Kodak digital Science™ 1D. Los productos de PCR fueron purificados con el estuche comercial Wizard SV and PCR clean up System de Promega para su posterior secuenciación.

6.6.12. Secuenciación y análisis de los productos de PCR obtenidos

Una vez purificados los fragmentos amplificados por PCR tanto para el gen 16S para bacterias y de la región ITS y ITS1–5.8S–ITS2 para levaduras (con excepción de dos muestras analizadas por la región ribosomal NL1 y NL4), se procedió a su secuenciación utilizando el secuenciador automático de capilaridad ABI Prism (Applied Biosystem Modelo 3130). Con los mismos cebadores aplicados en la reacción de PCR original se procedió a realizar las reacciones de secuenciación de la siguiente forma: Los productos de PCR purificados fueron nuevamente amplificados utilizando las siguientes condiciones de reacción: 4 µl de amortiguador Big dye v 3.1 5X, 1 µl de iniciador, 4 µl de Big dye v 3.1 Ready Mix, 2 µl del producto de PCR, 9 µl de agua estéril milliQ par un volumen final de 20 µl. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 96 °C por un min, seguido de 25 ciclos a 96°C 10 segundos, 59°C durante 4 min. Posteriormente la reacción de secuenciación fue purificada mediante el estuche comercial Big dye X Terminator (Applied Biosystems, U.S.), procediendo de la siguiente manera: se colocó en un tubo de PCR de 2.5 µl del producto de secuenciación, 2.5 µl del reactivo X-Terminator, 11.25 µl del reactivo SAM, se homogenizo la mezcla en vortex por 15 seg, se incubó en un Thermomixer (Eppendorf) por 30 min a 25°C a 13 000 rpm, se homogenizó en vortex por 15 seg seguido por una centrifugación por 2 min a 13 000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los productos de PCR purificados fueron finalmente secuenciados utilizando el secuenciador automático de capilaridad ABI Prism (Applied Biosystem Modelo 3130).

La secuencia nucleotídica obtenida fue alineada y comparada con las encontradas en la base de datos BLAST del Banco mundial de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information), para la comparación e identificación se seleccionaron las secuencias de referencia con las cuales se tenía similitud usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 5.0.6 (Hall, 1999) y CLUSTAL W 1.82 (Thompson *et al.*, 1994). Los dendogramas fueron construidos por medio de un programa analítico (MEGA versión 3.1) (Kumar *et al.* 2001) usando los métodos neighbor-joining (Saitou *et al.* 1987)

distancias entre los pares de bases de las secuencias. La confiabilidad de los grupos fue evaluada por “bootstrapping” con 1000 replicas.

6.7. Elaboración de un cultivo iniciador

Una vez que fueron identificados los géneros se procedió a elaborar el cultivo iniciador, para la lo cual se realizaron las siguientes pruebas:

6.7.1. Capacidad de acidificación de la leche

Las cepas aisladas fueron sembradas en tubos de BHI a 35°C durante 48 h, posteriormente se inocularon 2 ml de cada una en 200 ml de leche descremada y esterilizada, se incubaron a 37 °C y se monitoreo el descenso del pH hasta las 8 horas (Alvarado *et al.*, 2007).

6.7.2. Sensibilidad a antimicrobianos

Para esta prueba se analizaron los antimicrobianos más comúnmente empleados en el tratamiento de bovinos como son; Penicilina G (penicilina G sódica, 1,000.000 UI), Kanamicina (sulfato de kanamicina, 25 g/ml) y Cloxacilina (cloxacilina sódica, 25 mg/ml) (Bauver *et al.*, 1966). El método empleado fue el de disco en placa solida, el cual consistió en colocar la suspensión bacteriana en placas de agar MRS para posteriormente ser sembradas por superficie. Por separado se prepararon disco de papel filtro (con diámetro de 5 mm) los cuales fueron impregnados con soluciones de diferentes concentraciones de los antimicrobianos (5, 25, 50, 75 y 100 µg/ml), una vez que las cepas fueron sembradas se colocaron los discos en la superficie presionando suavemente. Posteriormente se incubaron a 37°C por un espacio de 12 h, observándose la aparición de halos de inhibición alrededor del disco. Los halos de inhibición fueron medidos con un Vernier. Para la interpretación de los resultados se considero como resistentes a aquellas cepas que presentaron diámetros menores a 10mm, medianamente sensibles menos de 20mm y sensibles más de 20mm (Bauver *et al.*, 1966).

6.7.3. Resistencia a productos de limpieza y desinfección

Se determinó la resistencia de las bacterias aisladas a productos como detergentes clorinados (Cloralex) y un producto ácido como (Anibac). En estas pruebas se utilizó el método de disco mencionado anteriormente. Las concentraciones utilizadas del detergente clorinado fueron 3; 6; 9 y 12 mg/l. Para el caso del ácido y detergente se tomó un matraz erlenmeyer estéril de 250 ml de capacidad al cual se agregó una solución del producto de limpieza preparado según recomendaciones del fabricante (ácido 2ml/l y detergente 0.5 ml/l), se descartó la solución y se enjuagó una vez con agua. Se eliminó el contenido y se agregó 100 ml de agua estéril, se agitó y con esta última solución se impregnaron los discos para realizar las pruebas (Collins *et al.*, 1991).

6.7.4. Capacidad de acidificación de la leche en presencia de antimicrobianos o productos de limpieza

Para la prueba de acidificación de la leche con antimicrobianos, 200 ml de leche descremada y estéril conteniendo antimicrobianos (Penicilina G, 25 µg/ml, Kanamicina 100 µg/mL ó Cloxacilina 100µg/ml) fueron inoculadas con 2% v/v de un cultivo de las cepas aisladas, se incubaron a 37⁰C y se midió el descenso del pH hasta las 8 horas.

Para la acidificación de la leche conteniendo productos de limpieza y desinfección, la concentración del producto clorinado fue 12 mg/l. Para el caso de detergente y ácido los matraces erlenmeyer que contenían la leche para el ensayo, se trataron como se mencionó anteriormente. La leche se inoculó con 2% v/v de un cultivo de las cepas a evaluar, se incubaron a 37⁰C y se midió el descenso del pH hasta las 8 horas (Rodríguez *et al.*, 2007)

6.7.5 Compatibilidad entre cepas

Para evidenciar la compatibilidad entre las cepas seleccionadas se utilizó el método de difusión en agar. Cajas de agar MRS fueron sembrados con cultivos de las cepas crecidas

ensayar. Posteriormente las placas fueron incubadas por un espacio de 24 h a 37°C y se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos (Rodríguez *et al.*, 2007)

6.7.6. Preparación de los cultivos iniciadores

Para elaborar los cultivos iniciadores a ser empleados en la elaboración del queso cotija, cada cepa fue incubada por separado en un volumen de leche de 10 ml durante 12 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las mezclas de las cepas compatibles se elaboraron con una concentración de células de 10^8 UFC/mL. Las mezclas fueron las siguientes: **Mezcla A:** BCOT-5, BCOT-9, BCOT-12; **Mezcla B:** BCOT-2, BCOT-4, BCOT-6, BCOT-8; **Mezcla C:** BCOT-1, BCOT-3, BCOT-7, BCOT-10, BCOT-11, BCOT-13, BCOT-14, BCOT-15 y BCOT-16. Adicionalmente, y con el objetivo de conocer el comportamiento de las bacterias lácticas utilizadas para fabricar los 3 tratamientos (Mezcla A, B, C), se realizó el recuento de los diferentes generos de bacterias antes de la inoculación al queso y después de ser inoculado.

6.7.7. Elaboración del queso similar al cotija

Con las mezclas preparadas en el punto anterior se elaboraron quesos similares al cotija utilizando leche pasteurizada y se siguió el mismo procedimiento de elaboración del queso artesanal. La metodología fue la siguiente:

Se emplearon 140 litros de leche cruda entera los cuales fueron distribuidos en 14 recipientes con 10 L cada uno, posteriormente se realizó la pasteurización de la leche por calentamiento a 75°C por un espacio de 30 minutos, posteriormente se procedió a un enfriamiento rápido a 5°C. Cuando la leche tenía una temperatura entre 35°C y 37°C se añadió 10 ml del cuajo marca Cuamex (Chr. Hansen de México S.A. de C. V., México), el cual fue diluido en 100 mL de agua purificada a temperatura ambiente (25°C y 2gr de sal de mar, de esta manera se obtuvo una floculación en un lapso de 30 minutos. Al transcurrir

Posteriormente la cuajada fue amasada con sal (65 g/Kg de cuajada) por 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, la masa fue colocada en aros de madera sobre mantas los cuales fueron fajados y colocados sobre una prensa para su escurrimiento total. Los quesos fueron desfajados al tercer día y se colocaron en el cuarto de enfriamiento del CIIDIR-IPN Unidad Michoacán a una temperatura entre 18 y 20⁰C. Una vez que los quesos fueron desfajados se limpiaron cada tercer día con la finalidad de retirarles la grasa o incluso el polvo que pudieran tener. Los quesos permanecieron tres meses en este cuarto simulando el proceso de maduración como lo indican las reglas de uso para la elaboración del queso cotija.

6.7.8. Análisis sensorial de los quesos

Los diferentes quesos fueron evaluados sensorialmente a partir de los 90 días de maduración, debido a que este es el tiempo mínimo que señala las reglas de uso del queso cotija. Para ello se utilizó un panel de cata formado por 14 productores de queso cotija, 5 del municipio de Cotija, 5 del municipio de Quitupan, y 4 del municipio de Valle de Juárez, considerando un 10% de los municipios de estudio. Es importante mencionar que no fue posible incluir a todos los municipios debido a que los ranchos de los productores se encuentran muy retirados, no hay acceso a todas las comunidades y por problemas de inseguridad. El panel fue entrenado durante 8 sesiones de entretenimiento con dos sesiones de repetición para la evaluación del panel, cada sesión tuvo una duración aproximada de 20 a 30 minutos. Este panel fue entrenado mediante la técnica del QDA® (Quantitative Descriptive Analysis) descrita por Stone *et al.* (1974) y por la norma francesa NF ISO 11035 (AFNOR, 1995). Los atributos evaluados fueron: Características externas (forma del queso, consistencia, textura y color de la corteza), características de la pasta (textura y color), aroma sabor y aceptabilidad general. La máxima aceptación para un queso fue de 20 puntos repartidos de la siguiente manera: características externas 3 puntos, características de la pasta 5 puntos, aroma 3 puntos, sabor 6 puntos, características de la pasta 5 puntos, aroma 3 puntos, sabor 6 puntos y aceptabilidad general 3 puntos. Los resultados se calificaron mediante una prueba de puntos o calificación ya que esta es la prueba que

7. RESULTADOS

7.1. Calidad sanitaria del proceso de elaboración del queso Cotija

7.1.1. Diagnóstico de las condiciones generales del proceso de elaboración del queso cotija

El análisis estadístico que se empleo para el diagnóstico actual de las condiciones generales fue una estadística no paramétrica utilizando el programa SPSS obteniendo los siguientes resultados para el personal (Cuadro 3):

El número de personas que participa en el proceso de elaboración del queso en promedio es de 4. Además es importante mencionar que en lo general el personal labora sin utilizar el uniforme sanitario (overol, casco y cofia), b) Es frecuente observar comiendo o fumando a los trabajadores durante la jornada de trabajo, c) Los trabajadores no se lavan ni se desinfectan las manos antes de iniciar su trabajo, d) No se practica un análisis clínico del personal de acuerdo a lo estipulado por la norma NOM- 120- SSA1 -1994, e) No existe un control en las personas que se presentan enfermas a trabajar, f) No existen letreros que adviertan la prohibición de entrada y transito de visitantes.

Con respecto a las instalaciones; El 22% de los productores cuentan con corrales de manejo, lugar de ordeño, cuarto para la elaboración del queso, cuarto de maduración y no tienen servicio sanitario, así mismo, el piso de los talleres es rustico, el 50.5% no cuenta con agua potable, el agua que utilizan es agua almacenada en el periodo de lluvias y el 55.2 % cuenta con un control de plagas.

Con respecto a la raza de animales; en los hatos lecheros predomina las cruza formadas por las raza cebú, pardo y suizo (54.3%).

Con respecto a la raza de animales encontrados en la sierra Jal-Mich todos los productores son ganaderos con un objetivo muy preciso sobre la selección de las vacas, no tienen raza específica, por lo que realizan cruzas de vacas cebú con otros toros especializados en carne o leche, predominando estas cruzas en los hatos ganaderos con el 54.3% (Cuadro 3). El reporte de la encuesta aplicada señala que que las principales cruzas formadas con el ganado cebú son: suizo (73%), simental (10 %), Holstein (9%) y Charolais (8%). Sin embargo, cuando el ganado cruzado comienza a perder las características “rusticas” del ganado cebú se recomienda la reintroducción de las mismas a través de realizar nuevas cruzas utilizando un toro rústico sobre la vaca más especializada, por lo que un análisis mas detallado de las cruzas genéticas entre las diferentes razas presentes en la región podría ser considerado. Así mismo, solo el 82.79% de los productores tiene al ganado identificado con aretes, el 66.7% de los productores cuenta con un programa de vacunación y desparasitación, y no presentan problemas reproductivos, ni respiratorios. Finalmente, el 97.1% participa en el programa oficial para el control de Brucella (Br) y Tuberculosis (Tb) y el 65.7% comenta que hace un año realizaron el último estudio para el control de Br y Tb; sin embargo, el 52.4% de los productores no cuenta con certificado de hato libre de Br y Tb. Por otro lado el 76.2 de los productores comenta que sus animales no presentan problemas de mastitis.

En cuanto al proceso de elaboración del queso cotija, el 100% de los productores realiza el ordeño manual, el 76.2% limpia y seca los pezones de las ubres de las vacas. Sin embargo, el 88.6% de los productores no realiza el presello y el sellado de los cuartos. El equipo utilizado tanto en el proceso de extracción de la leche, como en los talleres (cubetas, tambos y cántaras) no se lava con la frecuencia requerida, además de que el agua empleada no es potable. Los tambos y cubetas durante el proceso de ordeño generalmente se contaminan de excremento, estiércol o tierra, no se tiene la más mínima precaución en el manejo de estos tanques, es frecuente observar en los talleres latas de refresco, el ingreso de animales domésticos e incluso en las mismas tarimas donde se deja que los quesos maduren se encontraron envases de insecticidas. En cuanto al tiempo que transcurre entre la

En cuanto a los talleres de elaboración; las puertas, ventanas, paredes y techos se encuentran sumamente deteriorados, en las explotaciones que cuentan con estos talleres, debido a que no tienen la precaución de darles el mantenimiento adecuado, el 98.1 utiliza la sal de grano para la elaboración del queso y cuajo natural (67.6%), así mismo, el 53.3% tiene control sobre el proceso de elaboración y el 49.5 % deja madurar el queso 3 meses y finalmente el 83.8% no identifica su producto.

Cuadro 3. Diagnóstico actual de las condiciones generales del proceso del queso cotija

Pregunta	Validado	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
PERSONAL				
Número de personas que participan en el proceso de elaboración del queso.	4	34	32.4	74.3
¿El personal conoce y aplica las buenas prácticas de higiene?	SI	88	83.4	83.8
INSTALACIONES				
¿Su unidad de producción cuenta con las siguientes áreas de forma independiente?				
▪ Corral de manejo:	Si	62	15.1	59.0
▪ Lugar de ordeño:	Si	89	21.7	84.8
▪ Cuarto para la elaboración del queso:	Si	97	23.6	92.4
▪ Cuarto para la elaboración del queso:	Si	87	21.2	82.9
▪ Servicios sanitarios para el personal:	No	76	18.5	72.4
¿Dichos lugares, con excepción del corral de manejo, se encuentran protegidos de la intemperie y cuenta con piso estabilizado (no de tierra)?	Rustico	87.0	82.9	82.9
¿Cuenta con agua potable y en cantidad suficiente	NO	51.4	51.4	100
¿Las diferentes áreas del establo y lugares de fabricación y maduración del queso se mantienen limpias y ordenadas?	SI	93.3	98	93.3
GANADO				
Raza de ganado	Cruza*	54.3	57	54.3
¿Cuenta con programa de vacunación y desparasitación?	SI	66.7	70	67.7
Su ganado ha tenido problemas reproductivos.	Ninguno	80.0	84	80.0
Participa en el programa oficial para el programa de Br y Tb	SI	102	97.1.	97.1

PROCESO				
Tipo de ordeño	Manual	100	100	100
¿Limpia y seca los pezones antes del ordeño?	SI	80	76.2	76.2
¿Tiempo transcurrido entre la obtención de la leche y el inicio de elaboración del queso?	3 h	43	41.0	41.0
Tipo de sal	Grano	100	100	100
Tipo de cuajo	Natural	100	100	100
Tiempo de maduración	3 meses	52.0	49.5	49.5

7.1.2. Composición porcentual química de la leche

En la cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos de la composición química de la leche con que se elabora el queso Cotija, en el cual se puede apreciar que el porcentaje de grasa es similar a los valores que señala la NMX-700-COFOCALEC-2007 que es el 31.93 %. La alta dispersión en los resultados obtenidos obedece al hecho de que las diferentes muestras de la leche analizada fueron recolectadas en diferentes temporadas del año, factor que influye en la alimentación del ganado y por ende en la composición de la leche.

Cuadro 4. Composición de la leche con que se elabora el queso cotija

Constituyente	Contenido		
	(%) Base húmedad	(%) Base seca	NMX-700- COFOCALEC-2007
Agua	86.5±0.95	-----	-----
Sólidos totales	13.5±0.35	100.00	-----
Grasa	4.31±0.20	31.93±1.48	≥ 32
Proteínas	3.67±0.18	27.19±1.33	≥ 31
Carbohidratos totales	4.75±0.15	35.19±1.11	43- 50
Minerales	0.77±0.10	5.70±0.74	-----
Sólidos no grasos	9.19±0.15	68.07±1.48	83

7.1.3. Calidad sanitaria de la leche cruda entera

explotaciones bovinas presentaron de 4.93 – 5.90 log UFC/ml de BMA, mientras que un 23% de las explotaciones lecheras presentó cuentas del orden de 6.70 – 7.50 log UFC/ml, las cuales se encuentran por arriba del límite máximo (6 log UFC/ml) establecido por la NOM-F-700-SCFI-2004.

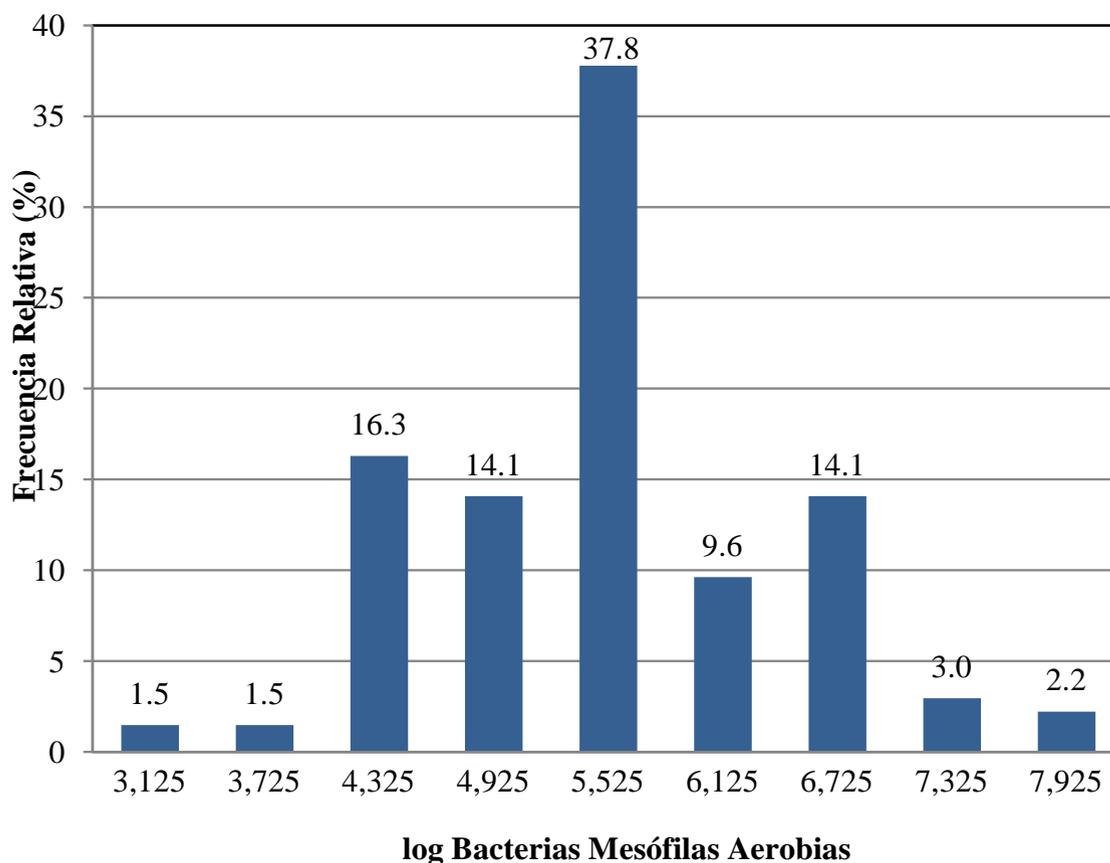


Figura 3. Contenido de Bacterias Mesofilas Aerobias en leche. Los Números en la parte superior de cada barra corresponden a los porcentajes relativos.

Con respecto a la cuenta de OCT, el 73.52% registro valores entre 4.45 y 5.56 UFC/ml, el 13.19% se ubicó entre 6.58 - 7.33 log₁₀ UFC/ml. Sin embargo, en México no existe un valor de referencia en el que se pueda establecer un límite para este grupo indicador. Después de haber iniciado la aplicación del programa de mejoras higiénicas y operativas en el proceso de obtención de la leche, el 76.96% de las explotaciones lecheras arrojaron cuentas de BMA del orden de 2.57 – 3.55 log UFC/ml; resultados inferiores a los obtenidos durante la primera etapa. Comparado con los que se obtuvo en la primera etapa la diferencia es altamente significativa, así mismo estos datos se encontrarían dentro de lo

4.71 log₁₀ UFC/ml, solamente el 5.45% de las muestras superaron los límites referenciados.

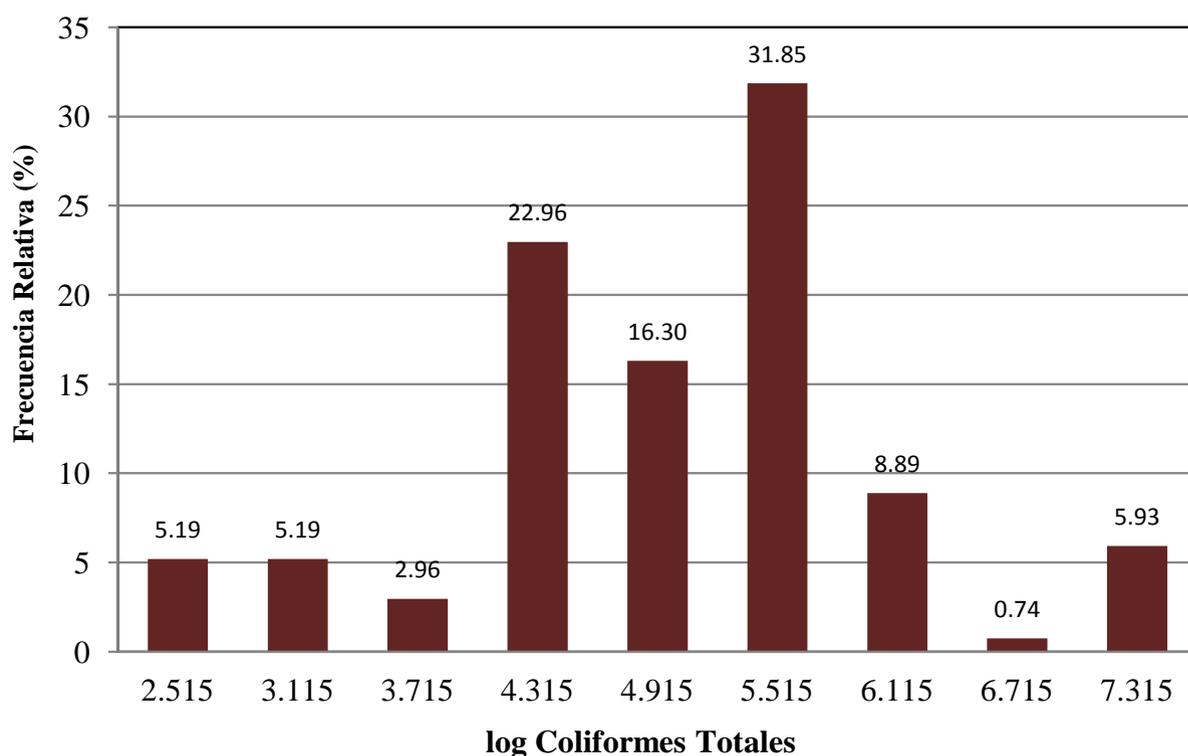


Figura 4. Contenido de Organismos Coliformes Totales en leche. Los Números en la parte superior de cada barra corresponden a los porcentajes relativos.

Los OCT registraron el 66.8% de las muestras entre 3.55 y 4.24 log₁₀ UFC/ml, valores que aun se encuentran superando el NOM-155-SCFI-2003, sin embargo los resultados obtenidos de la primer etapa fueron superiores a esta, y en esta segunda etapa se logro disminuir una unidad de logaritmo (Figura 4).

Al realizar el análisis estadístico para determinar la diferencia entre las medias obtenidas a partir de las muestras de leche antes y después de las buenas prácticas higiénicas (BPH), se empleó la prueba de comparaciones por pares (distribución de t) del programa estadístico STATS Graphics versión 5, obteniéndose los siguientes valores:

Cuadro 5. Estadístico en leche Bacterias Mesófilas Aerobias

	Antes BPH	Después BPH
N° de Muestras	133	133
x (Media) log UFC/ml	5.52	3.69**
Desviación estándar	0.92	0.72
Dispersión (log UFC/ml)	5.04	3.4

** = Altamente significativo $p < 0.005$

Cuadro 6. Estadístico en leche Organismos Coliformes Totales

	Antes BPH	Después BPH
N° de Muestras	133	133
x (Media) UFC/ml	4.22	2.00**
Desviación estándar	1.08	0.96
Dispersión (log UFC/ml)	5.65	4.78

** = Altamente significativo $p < 0.005$

De acuerdo al análisis estadístico existen diferencias altamente significativas ($p < 0.005$) (Cuadro 5 y 6) antes de los cursos de capacitación y diversas mejoras al proceso (Etapa I) y después de la implementación de las BPH (Etapa II), reduciéndose la extensión de la distribución de 5.04 a 3.4 \log_{10} UFC/ml para BMA con diferencias significativas de 5.65 a 4.78 \log_{10} UFC/ml para OCT,

7.1.4. Análisis de utensilios y superficies

En el cuadro 7 se indican los valores obtenidos en los puntos de muestreo para BMA y OCT; para cubetas los valores se ubican entre 10^6 y 10^8 UFC/cm², en el caso de los tambos los valores fluctúan entre 10^5 a 10^7 UFC/cm², para BMA y OCT de 10^6 a 10^8 UFC/cm², lo cual indica la falta de higiene en los utensilios que son empleados en el proceso de obtención de la leche.

En general las cargas bacterianas se ubicaron entre 10^5 a 10^8 UFC/cm² para BMA, en el

por lo que es importante un mayor cuidado durante las operaciones de higiene y sanidad de los equipos.

Cuadro 7. Evaluación sanitaria del equipo y utensilios de ordeña (UFC/cm²), antes de la implementación de las BPH

<i>Puntos de muestreo</i>	<i>BMA</i>		<i>CT</i>	
	<i>Valores</i>		<i>Valores</i>	
	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Cubetas	3.73 X 10 ⁷	3.96 X 10 ⁸	5.20 X 10 ⁶	5.40 X 10 ⁸
Tambos	5.60 X 10 ⁵	6.20 X 10 ⁷	3.40 X 10 ⁶	5.80 X 10 ⁸
Cántaras	8.10 X 10 ⁶	8.20 X 10 ⁷	2.90 X 10 ⁵	2.20 X 10 ⁷

En el cuadro 8 se muestran los resultados para el análisis sanitario en las manos de los trabajadores, en el cual se observa que al final del proceso de ordeña las cargas bacterianas para BMA son las más altas ya que éstas se ubican entre 10⁵ y 10⁸, para OCT tanto al inicio como al final los valores se ubican entre 10⁴ y 10⁶. Estos valores son el reflejo de que los trabajadores no se lavan las manos. El 100% de las muestras está fuera del límite establecido por la norma NOM-093-SSA1-1994 para BMA y CT de <3 X 10³ UFC/cm², lo cual sugiere la necesidad de capacitar a los trabajadores.

Cuadro 8. Determinación de BMA y OCT (UFC/cm²) en las manos de los trabajadores y ubres de las vacas durante el proceso de extracción de la leche.

<i>Manos</i>	<i>BMA</i>		<i>OCT</i>	
	<i>Valores</i>		<i>Valores</i>	
	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Inicio	3.90 X 10 ⁴	2.90 X 10 ⁶	1.88 X 10 ⁴	3.66 X 10 ⁶
Intermedio	2.88 X 10 ⁴	1.20 X 10 ⁷	4.66 X 10 ⁵	3.90 X 10 ⁵
Final	3.33 X 10 ⁵	3.44 X 10 ⁸	5.67 X 10 ⁴	2.77 X 10 ⁶
<i>Ubres</i>				
Inicio	3.90 X 10 ²	8.89 X 10 ⁴	1.80 X 10 ²	3.66 X 10 ⁴
Intermedio	2.60 X 10 ³	3.77 X 10 ⁵	4.66 X 10 ²	3.90 X 10 ²
Final	5.56 X 10 ³	6.88 X 10 ⁵	5.67 X 10 ²	2.77 X 10 ²

valores de 10^2 a 10^4 UFC/ cm² hasta 10^3 a 10^5 UFC/cm² en BMA y OCT esto debido a que no se lavan las ubres y pezones de la vaca.

En el cuadro 9 se indican los resultados obtenidos después de la implementación de los programas de limpieza y desinfección donde se manifiesta una considerable disminución en los recuentos de ambos indicadores, con reducciones de 2 a 3 logaritmos para cubetas, tambos y cántaras. En OCT ya no se detectan microorganismos, demostrando que las BPH en superficies se han llevado a la práctica, es decir, se realizó una adecuada desinfección y latinización de las superficies.

Cuadro 9. Evaluación de equipo y utensilios (UFC/cm²) después de la implementación de las BPH

<i>Puntos de muestreo</i>	<i>BMA</i>		<i>OCT</i>	
	<i>Valores</i>		<i>Valores</i>	
	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Cubetas	2.90×10^4	1.40×10^5	2.80×10^4	3.55×10^6
Tambos	1.8×10^4	2.87×10^5	5.66×10^4	1.88×10^5
Cántaras	3.33×10^3	3.34×10^4	9.98×10^3	3.77×10^5

* Desinfectadas

En el cuadro 10 se muestran los resultados de la evaluación de las manos de los trabajadores después de la implementación de las BPH donde las reducciones fueron de 2 y 4 logaritmos para BMA y OCT, ubicándose un mayor porcentaje de los muestreos dentro del límite permitido por la NOM-093-SSA1-1994 de $<3 \times 10^3$ UFC/ cm² para BMA. En el caso de OCT los valores en general fueron bajos. Estos resultados indican una buena concientización en los trabajadores en BPH.

Cuadro 10. Evaluación de manos de los trabajadores y las ubres (UFC/cm²) después de la implementación de las BPH durante el proceso de extracción de la leche

	<i>BAM</i>		<i>OCT</i>	
	<i>Valores</i>		<i>Valores</i>	
<i>Manos</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Inicio	1.88 X 10 ²	3.44 X 10 ³	sc	1.88 X 10 ²
Intermedio	2.55 X 10 ²	5.67 X 10 ³	sc	3.77 X 10 ²
Final	2.60 X 10 ³	6.55 X 10 ⁴	5.67 X 10 ²	6.40 X 10 ³
<i>Ubres</i>				
Inicio	sc	8.70 X10 ²	sc	1.88 X10 ²
Intermedio	1.90 X10 ²	2.77 X10 ³	sc	6.77 X10 ²
Final	6.88 X10 ²	3.90 X10 ³	1.77 X10 ²	5.60 X10 ³

sc: sin crecimiento

En el caso de las ubres de las vacas en la segunda etapa indican la notable disminución en carga bacteriana de BMA y OCT en las ubres. Tanto al inicio como al final del proceso disminuyeron en 2 logaritmos para BMA y CT, lo cual, indica la constante capacitación de los trabajadores para realizar la limpieza y lavado de ubres, así como el presellado y sellado de pezones.

7.1.5. Determinación de OCT y Organismos Coliformes Fecales (OCF) en el proceso de elaboración del queso cotija

En el cuadro 11 se presentan los resultados obtenidos en los quesos analizados comparando el proceso de elaboración con dos productores, una que elabora el queso de manera artesanal y el segundo semi-industrial. Respecto a la presencia de OCT y OCF se observa que para ambos productores hay deficiencia de buenas prácticas de higiene del personal, así como de la limpieza y desinfección de los equipos señalados anteriormente. Los equipos y utensilios involucrados en la preparación de alimentos deben estar libres de OCT, ya que la presencia de estos organismos indica una contaminación fecal que demerita la calidad sanitaria de los alimentos y constituyen un peligro potencial de contaminación con patógenos entéricos.

Los valores promedios de OCT y OCF evidencian en el queso Cotija madurado una disminución significativa con respecto a los valores obtenidos en la cuajada, lo cual puede explicarse por la acción inhibitoria de la sal en el crecimiento de diversos microorganismos. Respecto al queso Cotija con un mes de maduración, se observó que el productor artesanal presentó una disminución de 3 logaritmos al inicio del proceso de elaboración hasta la maduración del queso para OCT, y en OCF solamente disminuyó una unidad logaritmica. En el caso del productor semi-industrial hubo una reducción de 1 logaritmos para ambos grupos indicadores.

Cuadro 11. Recuento de OCT y OCF en el proceso de elaboración del queso cotija

<i>Granja artesanal</i>	<i>OCT</i> (NMP/100 g)	<i>OCF</i> (NMNP/100 g)
<i>Etapas de muestreo</i>		
Cuajada	3.8X10 ⁴	370
Cuajada + Sal	1.9X10 ⁴	280
1 mes de maduración	2.7X10 ³	43
3 meses de maduración	16	27
Granja semi-industrial		
<i>Etapas de muestreo</i>		
Cuajada	2.7X10 ⁵	1100
Cuajada + Sal	3.78X10 ⁵	237
1 mes de maduración	2.97X10 ⁴	370

NMP: Número Más Probable

7.1.6. Recuento *Salmonella* sp y *Staphylococcus aureus*, en el proceso de elaboración del queso cotija

En el cuadro 12 se presentan los resultados obtenidos del análisis de patógenos en el

conocimiento del comportamiento de estas bacterias es de gran interés para el análisis de riesgos. Los resultados permiten observar la presencia de *Salmonella* sp, la cual estuvo presente en tres de las etapas de elaboración del queso, así como *Staphylococcus aureus* en un promedio de 5.34×10^4 UFC/g, sin embargo *Escherichia coli* no se detectó su presencia. En contraste con la leche, los factores ecológicos que prevalecen en el ecosistema propio del queso no son propicios para una actividad ilimitada de los microorganismos patógenos.

Cuadro 12. Determinación de microorganismos patógenos en las diferentes etapas del proceso de elaboración del queso cotija

<i>Productor artesanal</i>	<i>Salmonella</i> sp. (25 g muestra)	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Etapas de muestreo</i>		
Cuajada	Presente	3.13×10^4
Cuajada + Sal	Presente	2.90×10^4
1 mes de maduración	Presente	3.23×10^5
3 meses de maduración	Ausente	4.00×10^4
Productor semi-industrial		
<i>Etapas de muestreo</i>		
Cuajada	Presente	5.56×10^4
Cuajada + Sal	Presente	1.06×10^5
1 mes de maduración	Presente	5.44×10^5

7.2. Implementación de BPH en el proceso de elaboración del queso cotija

Después de la implementación del programa de BPH se obtuvo un mejoramiento en las explotaciones lecheras y en los talleres de elaboración. Estos talleres actualmente cuentan con separaciones definidas y áreas de alimentación y ordeña mejoradas. De la misma manera puertas, ventanas y techos fueron reparados. Así mismo, en los talleres de elaboración del queso, los productores están implementando mejoras en su infraestructura

De hecho, en algunas instalaciones ya se cuenta con letreros que indican que no ingrese personal ajeno a esta actividad. Con la aplicación de las BPH ahora el equipo utilizado en la elaboración del queso como cántaras y tambos es lavado con agua limpia y jabón, y en su mayoría es desinfectado. Los desinfectantes empleados fueron sales cuaternarias de amonio (doble cadena) y de primera generación, un producto que cuenta con registro de la EPA N° 47371, aprobado por la USDA y FDA y que está declarado para el uso de equipos y utensilios.

En esta fase del estudio, se fomentó la realización de la limpieza de las instalaciones y áreas de ordeño, es decir, el retiro del estiércol de los animales durante la extracción de la leche. Una vez aplicadas las BPH sugeridas en el presente estudio por los productores participantes el proceso de extracción de la leche se realiza con mejores condiciones higiénicas, también las manos de los trabajadores son higienizadas. Finalmente, a través de la implementación de estas BPH en las explotaciones participantes, el personal se lava las manos antes de la ordeña, se lavan las ubres de las vacas, se realiza el presellado y el sellado de pezones.

7.3. Caracterización de la microbiota asociada al proceso de elaboración del queso Cotija

7.3.1. Análisis fisicoquímico del queso cotija

En el cuadro 12 se presentan los parámetros físicos de pH, conductividad eléctrica y actividad de agua durante el proceso de elaboración del queso Cotija. Nuestros resultados permiten apreciar con respecto al pH y a la conductividad que no hay diferencias significativas entre las dos explotaciones analizadas. Sin embargo, a nivel de la actividad del agua si se presentan diferencias significativas entre ambos procesos de producción en los quesos producidos. El pH es una variable importante por ser la coagulación un proceso enzimático de la hidrólisis proteica, las enzimas involucradas tienen una temperatura óptima de actividad que se encuentra en el rango de 20 - 42 °C (Troxler y Reardon, 2011).

esa agregación y consecuente formación del gel. Respecto a los análisis químicos del queso se observaron diferencias significativas entre ambos quesos, lo cual puede ser consecuencia de las diferentes formas de elaboración de los quesos. Las reglas de uso para elaborar el queso cotija de acuerdo a la marca colectiva señalan una serie de requisitos entre los cuales se menciona que los animales deben de alimentarse únicamente de los pastos que se producen en la región y la leche con que se elabora el queso debe ser de ganado cebú criollo. En el caso del queso semi-industrial se observó que la leche empleada para elaborar el queso no es únicamente del ganado de la región sino que también se mezcla con leche pasteurizada, y la alimentación del ganado también incluye un concentrado de pasturas comerciales.

Cuadro 13. Características del queso cotija artesanal y semi-industrial (n=5)

Queso	pH	Aw	Acidez	NaCl	CE	H	Grasa	Prot
Cotija			mg/Ác.láctico	%	(μ s)		%p/p	
Artesanal	5.0±0.01	0.9±0.06	0.7±0.01	6.9±0.07	16.6±0.2	30.0±0.3	28.8±0.2	26.9±0.1
Industrial	5.3±0.01	0.9±0.01	0.8±0.4	6.7±0.07	16.4±0.2	36.6±0.2	24.8±0.4	23.6±0.1

Aw: Actividad de agua; **CE=** Conductividad eléctrica; **H=** Humedad, **Prot=** proteína.

7.3.2. Enumeración microbiológica de los tiempos de muestreo del proceso de elaboración del queso cotija

Se analizaron los recuentos de bacterias, mohos y levaduras durante el proceso de elaboración del queso cotija tanto en condiciones rústicas como en semi-industrializadas, además de los recuentos de BMA como se indica en la Figura 5.

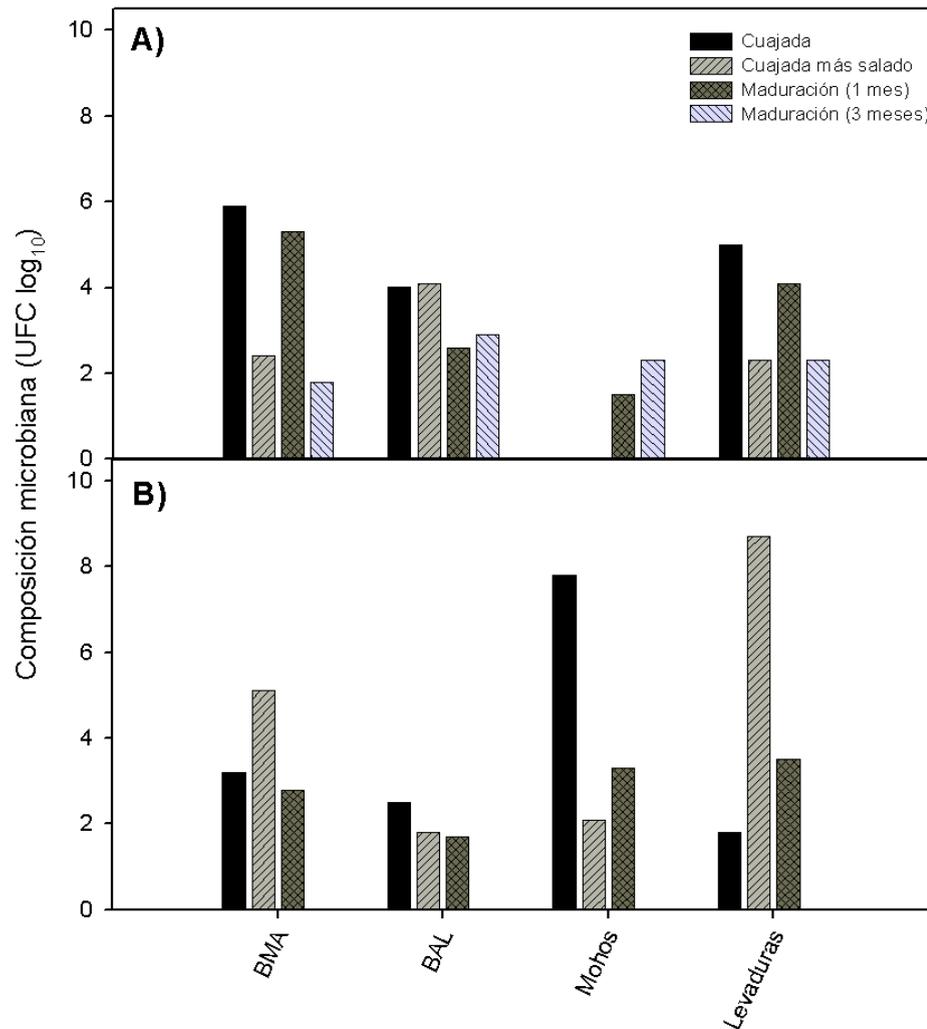


Figura 6. Composición microbiana durante el proceso de elaboración del queso cotija. A) Queso Artesanal Cotija, B) Queso semi-industrial. Los errores estándar en todos los valores son menores al 5%.

7.3.3. Aislamiento e identificación de BAL del queso cotija

En colaboración con un trabajo previo de nuestro grupo de estudio se logró el aislamiento y análisis preliminar de los microorganismos seleccionados. De esta forma, a partir de las muestras de queso se analizaron 16 colonias de un total de 200 aislamientos (Barrera H. 2011). Estas bacterias fueron identificadas a través de sus características fenotípicas (Figura 6) y su secuencia 16S del ADNr. Dichos aislamientos fueron clasificados mediante las siglas BCOT y enumerados del 1 al 16.

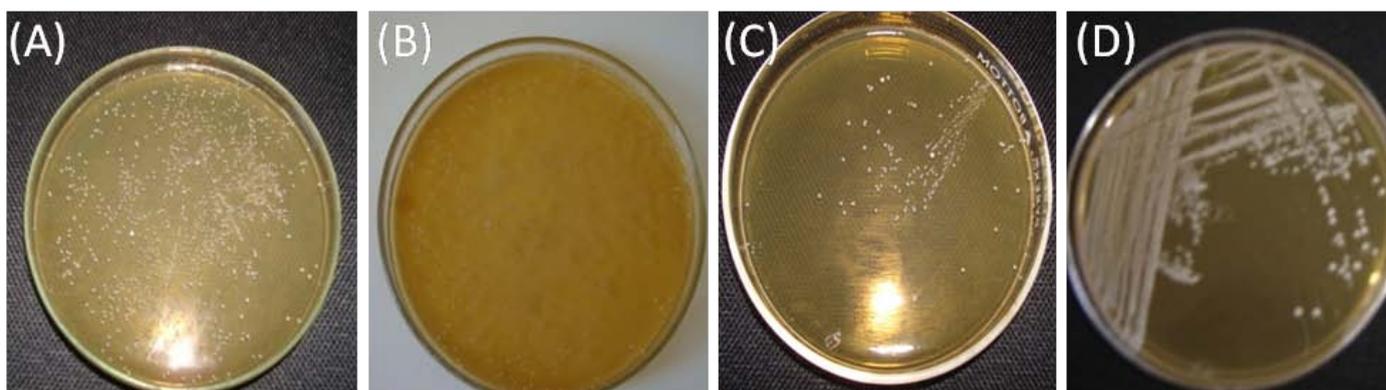


Figura 6. Aislamiento de algunas BAL del proceso de elaboración del queso Cotija. A: *Lactobacillus* sp.; B: *Pediococcus* sp.; C: *Lb. casei*; D: *Lactobacillus* sp.

A partir del trabajo desarrollado por Barrera (2011) se puede mencionar que todos los aislamientos mostraron actividad de catalasa excepto BCOT 7 y 13, estas mismas no presentaron desarrollo a 10°C y a 45°C, así como a las concentraciones dadas de NaCl (1.8 mM y 6.5 mM) a pH de 4.4. La suma de estas características permitieron posicionar estas cepas dentro del género *Pediococcus*. El crecimiento a 10 ° C fue la característica más frecuente, aunque algunos aislamientos (BCOT 9 – 14) también pueden desarrollarse a 45 °C. Cinco cepas (BCOT -3, -4, -9, -10 y -11) puede crecer a altas concentraciones salinas (NaCl 6,5 mM) como se podría esperar debido a la alta salinidad que presenta el queso cotija.

Barrera (2011) reportó la identidad preliminar de los aislados bacterianos los cuales pertenecían al filo Firmecitas, por lo anterior en este estudio se realizó una comparación más detallada de estas secuencias de 16S del Admr. en la base de datos con cepas del filo Firmecitas el cual comprende alrededor de 20 géneros (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*) siendo el género *Lactobacillus* el más abundante (Bouzar *et al.*, 1997; Gálvez *et al.*, 2007). En la mayoría de los casos fue posible asignar especies a las bacterias aisladas, sin embargo en algunos casos solo pudo asignarse el género *Lactobacillus* (Figura 7).

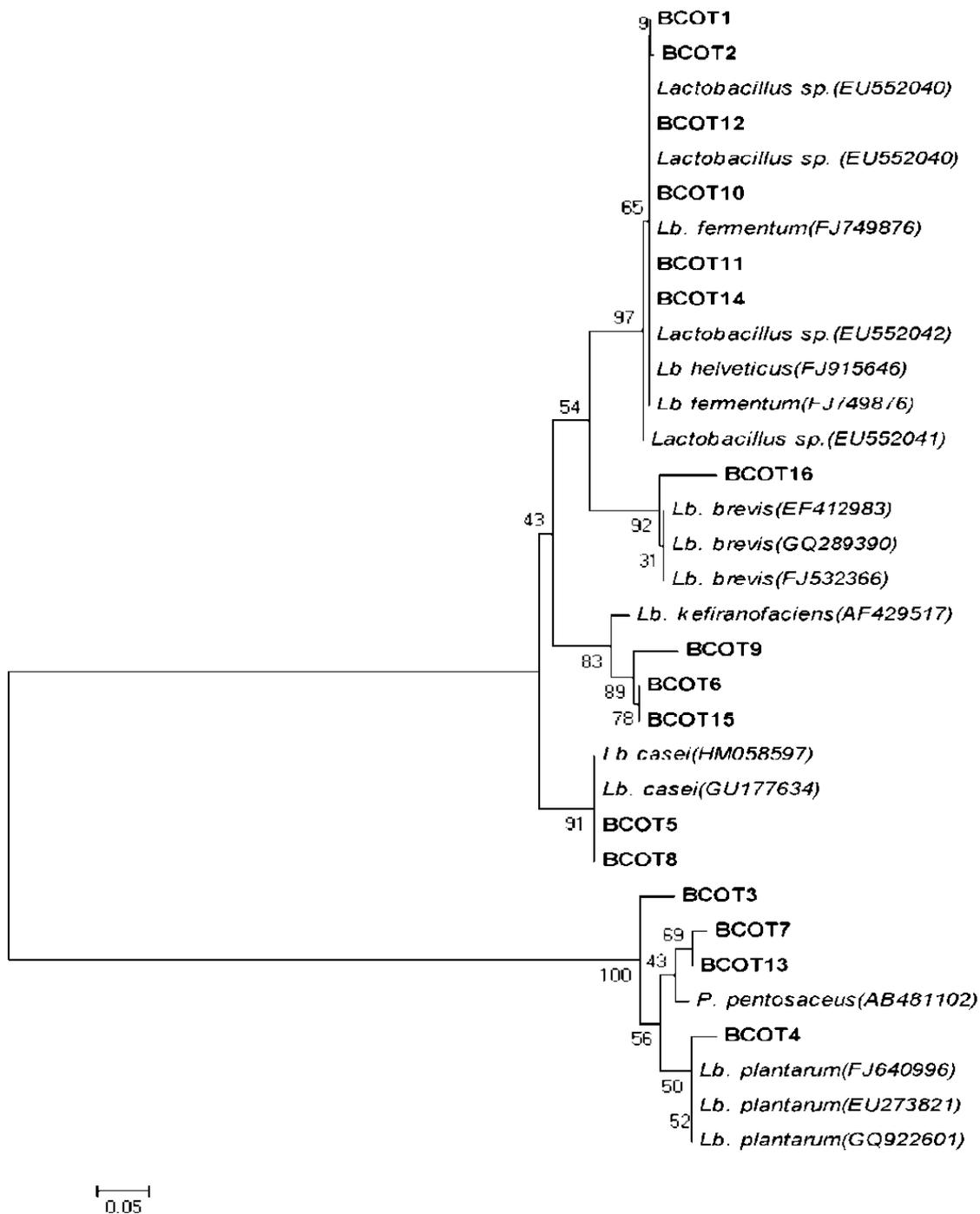


Figura 7. Relaciones evolutivas de las muestras analizadas basándose en las secuencias 16S ADNr. Para este estudio solo se emplearon secuencias relacionadas del filo Firmicutes.

7.3.4. Aislamiento e identificación de levaduras del queso cotija

Como se mencionó previamente, se trabajó con 11 colonias de levaduras de un total de 180 aislamientos realizadas en nuestro grupo de estudio (Barrera 2011). Estas se identificaron

las siglas FCOT. Las características fenotípicas evaluadas fueron: plasma coagulado, producción de ácido acético, desarrollo a 37°C, producción de ureasa, tubo germinativo y leche fluida. Así mismo se determinó para cada uno de los aislamientos su desarrollo a pH de 8.0, a temperatura de 48°C y la utilización de diferentes carbohidratos como fuente de carbono (Figura 8).



Figura 8. Aislamiento de algunas Levaduras del proceso de elaboración del queso Cotija. A: *Rhodotorula mucilaginosa*; B: *Kluyveromyces lactis*; C: *Pichia guilliermondii*; D: *Galactomyces* sp.

Barrera (2011) reportó la identificación preliminar por la región ITS mediante PCR. En este estudio se obtuvieron todas amplificaciones mediante las condiciones de reacción anteriormente citadas. Sin embargo, en algunos casos, algunas levaduras no fueron responsivas para su amplificación utilizando esta región y tuvieron que ser amplificadas utilizando la región NL1 y NL4 del ADNr. A partir de las secuencias obtenidas se elaboraron dos árboles de distancias génicas, uno para la región ITS y otro para la región NL1 y NL4, donde las levaduras se agruparon por género y especie, obteniéndose 5 grupos (Figura 9). Los grupos formados en el árbol filogenético fueron (de arriba hacia abajo): *Kluyveromyces lactis* (FCOT -27) se aisló en la etapa de cuajada mas sal y (FCOT-36) en la cuajada. *Pichia guilliermondii* (FCOT-22) al mes de maduración, *Rhodotorula mucilaginosa* (FCOT-20), en la etapa de cuajada mas sal, *Galactomyces geotrichum* (FCOT-21 y -28, -37, -45) en las etapas de un mes de maduración y cuajado respectivamente. *Kluyveromyces marxianus* (FCOT-30) al mes de maduración.

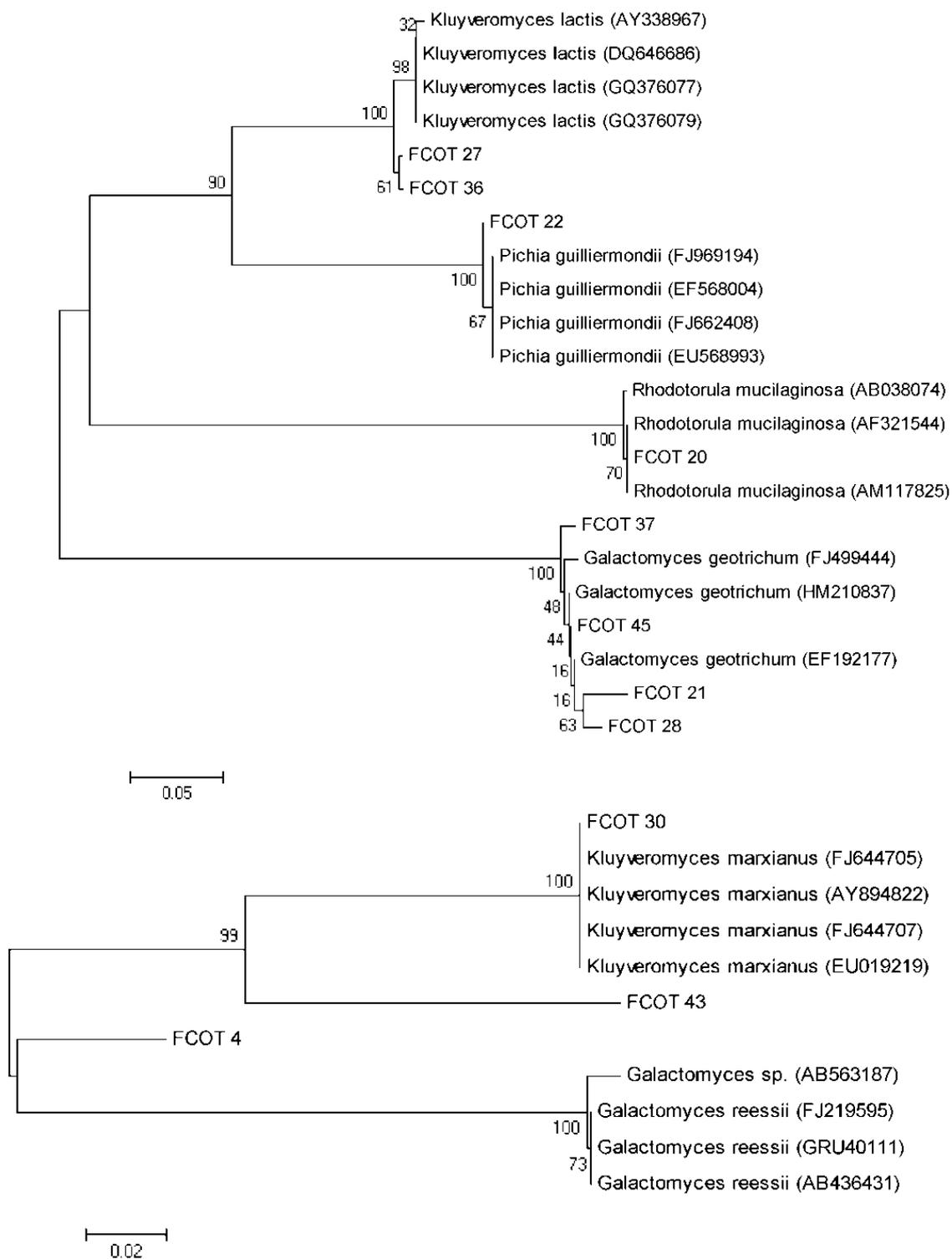


Figura 9. Relaciones evolutivas de las muestras analizadas basándose en las secuencias 16S ADNr. (A) Región ITS1–5.8S–ITS2, y (B) Región NL1–NL4 del ADNr.

7.4. Elaboración de un cultivo iniciador

7.4.1. Identificación y capacidad acidificadora de las cepas

Para esta etapa del proyecto se consideraron solo aquellas bacterias identificadas como ácido lácticas por ser las de interés para crear cultivos iniciadoras. Todas las cepas seleccionadas pudieron acidificar lentamente la leche a 37° C de manera parecida y se destacaron como más acidificadoras las cepas 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 12 (Cuadro 14). La cepa -5 acidificó la leche más rápido que las otras alcanzando un pH de 5,06. Para esta cepa se observó coagulación de la leche en ocho horas, presentando un coagulo liso, homogéneo y con mucho suero. Contrariamente, las cepas 2, 4, 6, 8, 9 y 12, presentaron un potencial de acidificación más lento. Estas cepas presentaron coagulación a las 24 h, y de igual manera todas las cepas presentaron un coagulo liso, homogéneo y con poco suero, estos valores de tiempo de coagulación son parámetros útiles a nivel tecnológico.

Cuadro 14. Disminución del pH de la leche debido a la acción de las BAL aisladas del queso cotija

BCOT	0 h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h
1	6.67	6.51	6.41	6.36	6.13	5.90	5.57	5.43	5.28
2	6.66	6.51	6,40	6,29	6.09	5.91	5.64	5.51	5.18
3	6.65	6.53	6.48	6.47	6.40	6.30	5.97	5.72	5.76
4	6.63	6.53	6.39	6.31	6.11	5.87	5.62	5.45	5.38
5	6.62	6.50	6.43	6.42	6.38	6.36	6.32	5.19	5.06
6	6.63	6.52	6.34	6.20	5.95	5.75	5.53	5.45	5.30
7	6.63	6.53	6.50	6.48	6.45	6.39	6.18	5.87	5.69
8	6.61	6.50	6.35	6.25	6.02	5.78	5.51	5.38	5.20
9	6.62	6.53	6.46	6.42	6.13	6.16	5.80	5.58	5.40
10	6.62	6.52	6.41	6.33	6.13	5.84	5.51	5.37	5.20
11	6.62	6.53	6.41	6.31	5.96	5.92	5.64	5.47	5.37
12	6.61	6.49	6.35	6.22	6.10	5.73	5.50	5.35	5.15

14	6.54	6.54	6.39	6.22	6.18	5.82	5.58	5.42	5.30
15	6.62	6.52	6.49	6.36	6.19	5.92	5.59	5.42	5.45
16	6.54	6.54	6.40	6.37	5.93	5.99	5.79	5.68	5.45

7.4.2. Sensibilidad a antimicrobianos

De las 16 cepas aisladas se observó que todas las cepas mostraron resistencia a las concentraciones probadas de kanamicina. En el ensayo de cloxacilina, solo 2, 4, 9 y 12 mostraron sensibilidad moderada a concentraciones de 50, 75 y 100 µg/ml (Cuadro 15). Mientras que para la penicilina la cepa - 6 presentó la mayor sensibilidad a todas las concentraciones (Cuadro 16).

Cuadro 15: Susceptibilidad de las cepas a diferentes concentraciones de cloxacilina

BCOT	Cloxacilina				
	($\mu\text{g/ml}$)				
	5	25	50	75	100
1	SC	SC	SC	SC	SC
2	SC	SC	1.5 mm	SC	1.6 mm
3	SC	SC	1.0 mm	1.4 mm	1.5 mm
4	SC	SC	1.3 mm	1.0 mm	1.0 mm
5	SC	SC	SC	SC	SC
6	SC	SC	SC	SC	SC
7	1.7 mm	3.0 mm	2.8 mm	3.2 mm	2.7 mm
8	SC	SC	SC	SC	SC
9	SC	SC	1.0 mm	1.0 mm	1.5 mm
10	SC	SC	SC	SC	1.0 mm
11	SC	1.4 mm	1.8 mm	1.6 mm	1.8 mm
12	SC	SC	1.5 mm	1.6 mm	1.8 mm
13	SC	1.6 mm	1.2 mm	1.8 mm	1.9 mm
14	SC	SC	SC	SC	SC
15	2.1 mm	2.5 mm	2.6 mm	3.6 mm	3.6 mm
16	1.9 mm	2.0 mm	2.5 mm	3.4 mm	3.4 mm

SC: Sin Crecimiento

Cuadro 16. Susceptibilidad a la penicilina de las BAL aisladas del queso Cotija a diferentes concentraciones.

BCOT	Penicilina				
	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)				
	5	25	50	75	100
1	SC	SC	1.2 mm	1.1 mm	1.5 mm
2	SC	SC	SC	SC	SC
3	SC	SC	SC	SC	SC
4	SC	SC	SC	SC	SC
5	SC	SC	SC	SC	SC
6	1.2 mm	2.0 mm	2.0 mm	2.5 mm	3.0 mm
7	SC	SC	SC	SC	SC
8	SC	1.8 mm	1.7 mm	2.3 mm	2.0 mm
9	SC	SC	SC	SC	SC
10	SC	1.8 mm	1.7 mm	2.3 mm	2.0 mm
11	SC	SC	SC	SC	SC
12	SC	SC	SD	SC	SC
13	1.0 mm	SC	1.5 mm	1.5 mm	1.6 mm
14	SC	1.8 mm	1.5 mm	2.0 mm	2.8 mm
15	SC	1.5 mm	1.4 mm	1.7 mm	1.4 mm
16	SC	SC	SC	SC	SC

SC: Sin Crecimiento

A pesar de que la cloxacilina es un derivado de la penicilina las cepas mostraron sensibilidad alta a concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$ del fármaco.

7.4.3. Sensibilidad a productos de limpieza de uso industrial

Todas las cepas aisladas en este trabajo fueron tolerantes a las concentraciones de los

(Cuadro 17). Sin embargo, en muchos casos los tratamientos se realizan a concentraciones mayores que las que aquí se emplearon.

Cuadro 17. Sensibilidad al cloro de las BAL aisladas del queso cotija

BCOT	Cloro mg/L			
	3	6	9	12
1	1.4 mm	2.2 mm	SC	SC
2	SC	2.5 mm	1.5 mm	SC
3	1.6 mm	SC	1.0 mm	1.4 mm
4	SC	2.2 mm	1.3 mm	1.0 mm
5	1.6 mm	2.6 mm	SC	SC
6	1.8 mm	SC	2.1 mm	2.1 mm
7	1.7 mm	3.0 mm	2.8 mm	3.2 mm
8	SC	2.1 mm	SC	SC
9	1.5 mm	SC	1.0 mm	1.0 mm
10	SC	SC	SC	2.6 mm
11	1.8 mm	SC	1.8 mm	1.6 mm
12	SC	1.9 mm	1.5 mm	1.6 mm
13	SC	2.7 mm	1.0 mm	1.0 mm
14	SC	2.8 mm	SC	SC
15	2.1 mm	SC	2.6 mm	3.6 mm
16	1.9 mm	SC	2.5 mm	3.4 mm

SC: Sin Crecimiento

Cuadro 18. Sensibilidad a las sales cuaternarias de amonio de las BAL aisladas del queso cotija
SC: Sin Crecimiento

BCOT	Sales cuaternario de amonio			
	mg/l			
	3	6	9	12
1	SC	SC	SC	SC
2	SC	1.5 mm	1.5 mm	SC
3	SC	2.4 mm	1.0 mm	1.4 mm
4	1.4 mm	SC	1.3 mm	1.0 mm
5	1.6 mm	1.5 mm	SC	SC
6	SC	SC	SC	SC
7	1.7 mm	3.0 mm	2.8 mm	3.2 mm
8	SC	1.4 mm	SC	1.5 mm
9	SC	2.5 mm	1.0 mm	1.0 mm
10	SC	SC	SC	SC
11	SC	1.4 mm	1.8 mm	1.6 mm
12	1.4 mm	SC	1.5 mm	1.6 mm
13	SC	2.5 mm	1.0 mm	1.0 mm
14	SC	1.5 mm	1.6 mm	SC
15	2.1 mm	2.5 mm	2.6 mm	3.6 mm
16	1.9 mm	2.0 mm	2.5 mm	3.4 mm

7.4.4. Selección de las cepas

Las cepas seleccionadas fueron aquellas que cumplieron con los siguientes requisitos: buena capacidad acidificadora, resistencia a los antimicrobianos, y a los productos de limpieza. Las cepas seleccionadas fueron BCOT 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 12.

Con las cepas seleccionadas se repitieron las pruebas de sensibilidad pero esta vez determinando como los diferentes productos afectaban la capacidad acidificadora de las

menor inhibición lográndose disminuir el pH de la leche de 6.13 a 5.20. Estos ensayos inhibieron el crecimiento y por ende disminuyeron el potencial acidificador de la leche. El efecto de los antimicrobianos se refleja mejor cuando se mide el crecimiento y el potencial acidificador de los distintos microorganismos que cuando se emplea el método de disco, la causa de esta diferencia podría ser que en el método del disco por difusión el antimicrobiano a través del agar no es efectivo lo que causa una falsa apreciación de la inhibición del crecimiento de las cepas.

Cuadro 19. Disminución del pH de la leche debido a la acción de las BAL aisladas del queso cotija y en presencia de antimicrobianos

BCO T	0h			1h			2h			3h			4h			5h			6h			
	P	K	C	P	K	C	P	K	C	P	K	C	P	K	C	P	K	C	P	K	C	
2	6.6	6.2	6.3	6.6	6.1	6.2	6.5	6.1	6.1	6.3	6.0	6.0	6.2	5.9	6.0	5.9	5.3	5.6	5.7	5.2	5.4	5.5
	1	0	6	0	6	3	1	6	9	5	3	5	1	1	0	6	4	3	7	6	3	4
4	6.5	6.1	6.3	6.5	6.1	6.2	6.4	6.0	6.1	6.3	5.9	6.0	6.2	5.8	5.9	5.8	5.3	5.7	5.6	5.2	5.4	5.5
	0	8	5	6	4	0	5	7	9	1	3	9	3	0	6	8	6	6	4	9	0	6
5	6.6	6.1	6.3	6.6	6.1	6.2	6.5	6.1	6.1	6.3	6.0	6.0	6.2	6.0	5.9	6.0	5.3	5.7	5.8	5.2	5.3	5.5
	0	8	9	0	6	3	2	3	8	5	3	5	8	3	8	4	6	9	0	3	6	7
6	6.5	6.1	6.5	6.5	6.1	6.2	6.5	6.0	6.1	6.4	5.8	6.0	6.2	5.8	5.9	6.1	5.1	5.8	5.9	5.1	5.0	5.5
	9	8	8	8	3	1	2	3	8	0	8	3	5	4	6	0	8	6	0	4	0	7
8	6.5	6.2	6.3	6.5	6.1	6.2	6.5	6.1	6.1	6.4	6.0	6.0	6.2	5.9	5.8	6.3	5.3	5.8	6.2	5.2	5.0	6.0
	6	0	6	5	7	1	4	3	9	0	5	3	9	4	6	4	4	0	9	9	6	5
9	6.5	6.1	6.3	6.5	6.1	6.2	6.5	6.0	6.1	6.3	5.9	6.0	6.3	5.7	5.8	6.1	5.0	5.7	5.9	4.9	5.4	5.5
	6	9	9	5	3	3	0	6	5	8	5	5	6	9	9	4	7	0	3	7	5	7
12	6.5	6.1	6.4	6.5	6.1	6.2	6.5	6.0	6.1	6.3	6.5	6.0	6.2	5.8	5.6	5.9	5.1	5.4	5.6	5.2	5.0	5.5
	8	8	2	7	5	0	0	6	5	0	8	4	1	1	6	6	6	5	0	2	6	2

P= Penicilina; **K:** Kanamicina; **C:** Clohexamina.

7.4.5. Compatibilidad entre las cepas y elaboración de mezclas

Las cepas 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 12, fueron seleccionadas por estar entre las mejores acidificadoras y que presentaron resistencia a los productos como cloro y sales cuaternarias de amonio. Con ellas se prepararon pruebas de compatibilidad entre sí. Todas las cepas fueron compatibles y con ellas se formaron los cultivos iniciadores. Para esto se establecieron 3 mezclas: **Mezcla A** (5, 9 y 12), **Mezcla B** (2, 4, 6 y 8), y **Mezcla C** (1, 3, 7, 10, 11, 13, 14, 15 y 16). Los recuentos bacterianos en estas mezclas fueron menores de 10 UFC/mL, lo que refleja la eficiencia de la pasteurización que produjo una leche de buena calidad microbiológica. Cabe destacar que después de la inoculación de las mezclas (A, B y C) que fue de 10^8 UFC/mL los recuentos obtenidos fueron de 10^7 UFC/mL.

7.4.6. Pruebas de preferencia de consumo queso cotija

Con las cepas aisladas y seleccionadas como iniciadoras se elaboraron quesos experimentales tipo cotija como se describió en la metodología. Posteriormente los quesos fueron sometidos a una evaluación sensorial de acuerdo a Witting (1982). En esta evaluación y a manera de control se incluyeron dos quesos: uno elaborado con leche cruda de un productor del municipio de Jiquilpan y sin adicción de cepas (D) y otro elaborado con un productor de la región de origen (E). Los resultados obtenidos de la degustación se presentan en el Cuadro 20, en el cual se observa que la mezcla A y B existen diferencias en cuanto a sus características externas, así mismo, en ambas mezclas hay diferencias con respecto al sabor. El análisis estadístico que se empleo para determinar las puntuaciones sensoriales fue un análisis de varianza con comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS versión 9.0, teniendo los siguientes resultados.

Cuadro 20. Puntuaciones sensoriales de los quesos

Mezclas (BCOT-)	Car.	Car.	Aroma	Sabor	Aspecto general
	externas	de la pasta			
	Promedio				
A (5, 9 y 12)	2.44bc	4.39b	2.83a	5.55ba	2.55a
B (2, 4, 6 y 8)	2.71ba	4.34b	2.93a	5.32bc	2.68a
C (1, 3, 7, 10, 11, 13, 14, 15 y 16)	2.24c	4.02b	2.60b	4.93c	2.17b
D Queso: productor de Jiquilpan	2.39bc	4.09b	2.38b	4.95c	2.00b
E Queso: Productor de la región de origen	2.8900a	4.8100a	2.9200b	5.9000a	2.8600a

Letras iguales no son significativas estadísticamente ($\alpha=0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Calidad sanitaria del proceso de elaboración del queso cotija

La inocuidad de los alimentos se debe garantizar en cada uno de los eslabones de la cadena alimenticia desde la granja hasta la mesa. La calidad de la leche cruda así como la de los otros derivados lácteos es la consecuencia de todas las actividades desarrolladas durante su proceso de producción, desde las granjas hasta la transformación en la industria láctea (WHO/FAO, 2008; Vilar *et al.*, 2011). Por ello, es importante establecer los límites microbianos que contribuyan a garantizar la calidad. Tal es el caso del recuento de las BMA en los tanques de leche cruda, ya que su concentración resulta fundamental debido a que esto constituyen uno de los factores más importantes que influyen en el precio de la leche (Hayes *et al.*, 2001). Así mismo, determinar el nivel de contaminación durante la producción de la leche refleja las condiciones higiénicas de todo el proceso (Elmoslemanya *et al.*, 2010).

En este estudio se evidenció un deficiente estado de calidad sanitaria en las explotaciones lecheras antes de la aplicación de las BPH. Comparativamente, en un estudio realizado en explotaciones bovinas lecheras de Argentina, se determinó una carga bacteriana de BMA de 6.87×10^5 UFC/ml, valores que se atribuyeron principalmente a problemas de mastitis, una rutina de ordeño inadecuada, el sellado y secado de pezones (Revelli *et al.*, 2011). Estos resultados concuerdan con la presente investigación ya que cuando se realizó el diagnóstico actual, algunas de las observaciones fueron falta de limpieza en el área de ordeño, así como la omisión del presello y sellado de los cuartos de la ubre de la vaca.

8.1.2. Calidad sanitaria del proceso de extracción de la leche después de la aplicación de las BPH

Después de haber iniciado la aplicación del programa de mejoras higiénicas y operativas en el proceso de obtención de la leche, el 76.96% de las explotaciones lecheras arrojaron cuentas de BMA inferiores a las obtenidas durante la primera etapa (antes de la aplicación de las BPH). La diferencia en la calidad sanitaria entre ambas etapas es altamente significativa ($P > 0.05$), así mismo los datos obtenidos después de la aplicación de las BPH indican que la calidad sanitaria de las explotaciones lecheras se encontrarían dentro de lo estipulado por la NOM-155-SCFI-2003 con solamente un 5.45% de las muestras fuera de los límites referenciados, lo cual corrobora lo señalado por Villoch (2010) en el sentido de que el cumplimiento de los indicadores de calidad no se consiguen de forma espontánea. Estas exigencias solo se logran con una planificación de las actividades de las explotaciones lecheras y con el establecimiento de BPH que contribuyen a disminuir las cargas bacterianas. La Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario maneja como límite máximo de BMA para leche cruda grado A $5 \log_{10}$ UFC/ml. Este mismo valor es el utilizado por la FDA. El 76.96% de las muestras analizadas en este estudio se ubico dentro de este límite. Cabe señalar que este programa de BPH se ha implementado también en ganado caprino, donde al inicio del trabajo se tuvo del 80-100% de los establecimientos productivos fuera de los límites, y una vez implementado el programa la reducción fue del 38-82% (Morales *et al.*, 2012). Cuando se aplican las BPH es recomendable dividir las en distintas etapas, con el objetivo de que una vez cumplidas las normas establecidas para una fase se pudiera continuar con la otra. De esta forma, se facilitaría disminuir el número de cambios y la inversión a aplicar en determinados periodos de tiempo (When, 2010). La aplicación de programas de BPH en explotaciones lecheras ha contribuido satisfactoriamente a mejorar la calidad de la leche, tal es el caso de Revelli *et al.*, (2011) el cual después de haber implementado un programa de BPH en explotaciones lecheras reportó una carga bacteriana de 6.87×10^5 a 4.23×10^5 UFC/ml.

han catalogado como factores importantes en la regulación del número de bacterias (Ruiz *et al.*, 2012).

Utensilios, equipo y superficies

Las distintas fuentes de contaminación de la leche al momento del ordeño y las condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento, antes de llegar a la planta de recepción, definen el número de bacterias/ml, las cuales se convierten en la población inicial (Taborda, 2011). Así mismo, uno de los principales problemas que se tienen en el proceso de extracción de la leche de manera manual es la contaminación, donde quedan implicadas las cubetas, manos de los trabajadores y las ubres de las vacas, entre otros factores (Bolaños, 2007). En un estudio realizado en el 2009, Meléndez y colaboradores reportan que los principales factores que inciden en la calidad de la leche son de tipo genético, higiénico y sanitario. De forma similar a este estudio, antes de implementar un programa de BPH las principales fuentes de contaminación fueron; superficies, equipo y utensilios.

8.1.3. Calidad sanitaria del queso cotija

La disminución del pH y la producción de metabolitos son factores que limitan el desarrollo de bacterias no deseables y la competencia del mismo sustrato durante la maduración (Boza, 2008). La maduración del queso y su inocuidad es importante en el desarrollo de sus características organolépticas típicas (Rodríguez, 2010). En un estudio realizado en queso de Capa de Mompox en Colombia, se determinó la presencia de OCT con valores de 23 NMP/g y ≥ 3 NMP/g (Granados *et al.*, 2010). Estos resultados son muy similares a los encontrados en esta investigación. Por otra parte, al evaluar la vida útil del queso asadero, se encontraron valores de OCT de 243 NMP/g. valores superiores a los detectados en la presente investigación. Este tipo de

2011). De hecho, la afectación en las características organolépticas de sabor y rancidez son atribuidas a las lipasas producidas por los microorganismos (Sinigaglia *et al.*, 2008). Tal es el caso de la presencia de *Salmonella* sp. (Ferreira y Campo, 2008), si la producción de ácido es lenta, este microorganismo puede desarrollarse en las primeras etapas del proceso de fabricación, lo cual indica una baja higiene en la elaboración del queso. Los problemas por *Salmonella* en leche y quesos son de los más frecuentes en países desarrollados y subdesarrollados (Urquilla, 2005). En México, se registraron 1364 brotes infecciosos por este patógeno (INEGI, 2007), con predominancia de los serotipos *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* (Gutiérrez, 2005). Durante el 2005, se encontró que de 10,6991 muestras de productos lácteos y alimentos preparados, el 27% estuvo fuera de la especificación, 9% rebaso los límites de OCT, el 10% de OCF, el 1% de *Escherichia coli* y el 1% de *Salmonella*. Siendo los productos lácteos los que presentaron un porcentaje mayor de contaminación con 43%. En estudios previos se ha mostrado que hasta el 2006 y analizado 36,607 muestras de productos lácteos se obtuvo un 23% de productos fuera de la especificación, el 8% rebaso los límites de OCT y el 9% de OCF, el 1% de *E.coli* y el 1% de *Salmonella* (Díaz, 2007; Zago *et al.*, 2007).

Respecto a la presencia de *Escherichia coli* en las etapas de elaboración del queso todas las muestras resultaron negativas a este patógeno, sin embargo la presencia de *Salmonella* sp estuvo presente en las primeras etapas de elaboración del queso. Sin duda alguna, la presencia de enterobacterias constituye un alto riesgo potencial para la salud de los consumidores.

En el caso de *S. aureus* es muy probable que su presencia se deba a las malas prácticas de higiene en el proceso de ordeña y elaboración del queso cotija. Un número elevado de *S. aureus* implica la producción de toxinas ocasionando intoxicaciones alimentarias (Nomanno *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2008). Chuquimarca, (2009) comenta que la utilización de leche brava en la elaboración de quesos ocasiona una elevada

El queso cotija está catalogado como alimento de baja humedad y en sus condiciones de manipulación y de conservación existe un alto riesgo de la presencia de *S. aureus* durante su comercialización. Los productores del queso cotija exhiben su producto a temperatura ambiente y sin refrigeración, así mismo en los mercados populares los quesos son exhibidos en ambientes abiertos a una temperatura entre 25 a 30⁰C, manteniéndolos en estas condiciones durante varias horas. Algunos trabajos refieren que las malas prácticas de manipulación y las temperaturas inadecuadas a los que son sometidos los productos durante su comercialización contribuyen al aumento en la población de estos microorganismos (Ponce, 2009).

8.1.4. Caracterización fisicoquímica del queso cotija

El proceso de fabricación del queso provoca algunas diferencias entre los productos artesanales y semi-industriales. Los parámetros fisicoquímicos entre ambos quesos varían ligeramente con excepción de los contenidos de proteína, la cual varió considerablemente de 30 a 24% para el queso de cotija artesanal y semi-industrial, respectivamente. Los valores altos de proteína encontrados en el queso cotija artesanal probablemente sean consecuencia de su período extendido de maduración (3 meses).

Inocente *et al.*, en el 2002 reporta que un bajo contenido de humedad en la matriz del queso conlleva a una limitada hidratación de la proteína y menor libertad de movimientos. Por el contrario, un queso con alto contenido de humedad resulta con una estructura más débil y firme. En otro estudio comparativo sobre la cobertura para un queso madurado como el llanero se encontró un 25.03% de proteínas, estos resultados son similares a los que se encontraron en la presente investigación, considerando que este queso tiene un tiempo de maduración de 60 días mientras que en el queso semi-industrial el productor generalmente distribuye la comercialización de los quesos entre los 30 y 45 días (Mendoza y Oyon, 2002).

En el caso del queso chanco, que es un producto que se obtiene después de 6 semanas de maduración se reporta un porcentaje de proteínas de 24.05, estos resultados son similares a los que se obtuvieron en los quesos cotija semi-industriales. Generalmente se ha observado que la temperatura de maduración y las proteínas de la leche contribuyen a la firmeza del producto, en cambio la grasa de la leche proporciona suavidad al queso, por lo tanto a mayor cantidad de grasa el queso es más blando y suave (Arteaga, 2004). Así mismo, en otro trabajo realizado con el queso chanco, pero adicionando suero de polvo, se obtuvo un porcentaje de proteínas del 25.00%, observándose una disminución de la humedad, lo cual posiblemente se debe a que las proteínas tienen un papel dominante en la ligación del agua, la caseína retiene alrededor del 55% (m/m) y las proteínas solubles el 30% (m/m) del agua, pero al desnaturizarse y formar complejos con la caseína se incrementa la capacidad de ligar al agua (Arteaga, 2004).

En la caracterización del queso EDAM se observó que de acuerdo al tiempo de maduración de 60 días, las proteínas van disminuyendo levemente por efecto de maduración (Osorio *et al.*, 2004). Según Maldonado y Llanca (2008), en el estudio de la calidad del queso mano comercializado en el municipio de Girardot, Venezuela, estos deben presentar un porcentaje de proteínas del 22.17%, sin embargo es importante considerar que este se trata de un queso fresco, por lo que los valores obtenidos son inferiores al del queso cotija. Adicionalmente, en la caracterización del queso chanco adicionado con suero lácteo en polvo, se reporta un 21.57% de proteína, dicho resultado es atribuible a la incorporación de proteínas séricas, las cuales presentan un comportamiento similar a la grasa frente a la red caseinica, actuando solo como un material inerte y de relleno en esta (Arteaga *et al.*, 2009).

Cuando los quesos son sometidos a maduración, sufren cambios como la pérdida de humedad, hidrólisis de las grasas, proteólisis y transformación de la corteza, los cuales influyen sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas del

Otro rubro donde se presentaron diferencias entre ambos procesos de producción es a nivel de la actividad de agua (a_w), la cual describe la proporción de agua libre que contiene el queso, por tanto el agua disponible para las reacciones enzimáticas propias de maduración, como también aquellas que provocan riesgos de deterioro del producto. Los resultados de a_w obtenidos en el presente trabajo son similares a los obtenidos por otros autores como Cabezas *et al.*, (2007) en el queso Manchego, en donde se produce el mismo descenso para el mismo tiempo de maduración. Similarmente, en el queso Idiazábal, la a_w descendió de 0.988 ± 0.002 (1 de maduración) a 0.932 ± 0.004 (180 días de maduración) y en queso Zamorano de 0.991 ± 0.002 (1 de maduración) a 0.913 ± 0.018 (día 240 de maduración) (Etayo *et al.*, 2006). Finalmente, para el queso los Pedroches se produjo un descenso de 0.979 a 100 días de maduración (Sanjuan *et al.*, 2002).

Con respecto al pH que se obtuvo en los quesos estudiados, los resultados concuerdan con los presentados por Cabezas *et al.*, (2007) donde también se encontraron diferencias de pH en dos tipos de quesos a diferentes tiempos de maduración. En su estudio sobre la maduración del queso Manchego los valores de pH estuvieron entre 5.03 y 6.07. Otros reportes, muestran que los rangos de valores de pH observados en el presente estudio son más reducidos cuando se comparan los obtenidos por Etayo *et al.*, (2006) quien observó que para queso Idiazábal y el queso Manchego no había una tendencia clara en la evolución de este parámetro a lo largo de la maduración. Otro estudio muestra que los valores de pH prensa en un queso Gauda obtenidos por Brito (2010) son superiores a los reportados en este estudio, ya que el promedio que se determinó fue entre 5.6 y 5.9.

Por otro lado, la acidificación durante el proceso de elaboración del queso es el resultado de la conversión de la lactosa en ácido láctico (Guinne y Fox, 2004). La acidez no solo tiene incidencia sobre el sabor del queso, sino que además influye en la calidad del mismo. Distintos autores afirman que el contenido de humedad y pH, son

debido a estos parámetros que se influye en las características organolépticas del producto final, tal como se ha demostrado en estudios en queso Cheddar, Feta, Fynbo, entre otros (Lawlor *et al.*, 2003; Sihufe *et al.*, 2003; Guinne y Fox, 2004).

Respecto al porcentaje de grasa que se determinó en los quesos analizados se encontró un 28.8% para el queso artesanal y 24.8% para el queso semi-industrial. Al respecto, se ha encontrado en estudios realizados en queso Gauda semidescremado con variaciones tecnológicas diferentes a esta investigación, una disminución del 25% en este parámetro (Navarrete, 2007; Flores, 2008). La materia grasa otorga importantes propiedades organolépticas al queso, mediante el cual se puede observar la alta influencia de este parámetro, sobre atributos tales como la firmeza, adhesividad, cohesividad y elasticidad, lo que al final se resume en la calidad y aceptación del producto final (Guinne, 2004).

Respecto a la concentración de sal el queso cotija presenta un alto contenido de Cloruro de sodio, comparativamente a los reportados por Olivera y Brito (2006), los cuales reportan para el queso Gauda chileno un porcentaje de entre 1.2 y 1.8. Por otro lado, en un estudio realizado en una empresa de la décima región con el fin de caracterizar el queso Gauda se encontró un porcentaje de sal entre 1.06 y 1.39% de NaCl a los 28 días de maduración, lo que deja claro el amplio rango que se puede manejar de acuerdo a los requisitos del mercado (Bazaes, 2004). Otro estudio realizado en el queso Cheddar, donde se analizó el comportamiento de este parámetro en 3 tipos de cultivos, incluyendo un cultivo DVS (directo a tina) mostró valores superiores al 4%, lo cual pueden traer consecuencias en la actividad del cultivo láctico con cierta probabilidad de inhibirlo (Farkye, 2004; Agarwal, 2008). En el contenido de sal no existe una normatividad que proporcione un rango en los quesos, viéndose muy variado según las características del queso que se desea elaborar, sin embargo la FAO (1986), indica que para quesos semiduros un contenido normal de sal en humedad debería ser entre 0.8 y 2.0% rango que de igual forma se puede ver ampliado ó

8.2. Aislamiento e identificación de BAL y levaduras del queso cotija

8.2.1. Composición microbiana

Se encontró que la elevada presencia de BAL y levaduras en las etapas iniciales de elaboración del queso Cotija tradicional puede promover la disminución de hongos y BMA en este queso, hecho que ha sido reportado por varios autores como Alvarado *et al.*, (2007) que aislaron 94 cepas de de BAL, de las cuales 25 mostraron actividad antimicrobiana debido principalmente a la disminución del pH en alimentos tradicionales mexicanos, por la producción de ácidos orgánicos principalmente contra *S. aureus* y *E.coli* durante la fermentación de estos, así mismo se tienen reportes de la producción de compuestos antimicrobianos por la BAL (peróxido de hidrogeno, bacteriocinas y exopolisacáridos) efectivos contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Oslon y Aryana, 2008; Lin *et al.*, 2007., Rodríguez *et al.*, 2003). Estos microorganismos contaminantes en cambio fueron abundantes en el queso cotija producido de forma industrial.

8.2.2. Aislamiento de BAL

A nivel de los aislados bacterianos fueron caracterizadas 16 cepas. *Lb. brevis* es un lactobacilo mesófilo heterofermentativo, que utiliza exclusivamente hexosas y pentosas como fuente de carbono (Beresford y Williams, 2004; Chuquimarca, 2009). En un estudio realizado por Coppola *et al.*, (2000) en el queso italiano Parmigiano Reggiano se encontró que la población bacteriana de este queso está constituida principalmente por bacterias ácido lácticas, particularmente *Lb. casei*, a los cuatro meses de maduración de dicho queso, lo que concuerda con el presente estudio ya que este tipo de cepa no fue aislada de la cuajada. En otro estudio reportada para el queso serbio Zlatar Veljovic *et al.* (2007) encontraron como la biota predominante en dicho queso

Durante la maduración de los quesos los productos del metabolismo de las BAL como los que producen *Lb. plantarum* y *Lb. casei* (ácidos orgánicos, CO₂, alcohol y peróxido de hidrogeno) intervienen en la aparición de las características organolépticas como el sabor y el aroma de estos quesos (Tempel y Jakobsen, 1998). Perry (2004) señala que las BAL son las primeras responsables, por la transformación de la lactosa en ácido láctico, durante la producción de los quesos, así mismo la proteólisis está involucrada en la conversión de los aminoácidos en compuestos volátiles así como los resultantes del metabolismo de la lactosa que son los responsables de la maduración de los quesos. Sin embargo, algunos autores señalan que los lactobacilos mesófilos heterofermentativos obligados como *Lb. brevis*, producen sabores indeseables y gases durante la maduración de los quesos (Hassan y Frank, 2001; Bruno *et al.*, 2009). El hecho de también haber encontrado a *Lb. casei* en la cuajada del queso Cotija, se debe a que en dicha etapa se genera más intensamente la actividad fermentativa (Fernández 2000). Por otro lado, los lactobacilos mesófilos heterofermentativos han sido detectados con menor frecuencia en quesos frescos (Beresford y Williams, 2004).

El género *Pediococcus* también encontrado en este estudio se encuentra dentro de la familia Streptococcaceae, y son cocos Gram positivos, microaerofilicos, homofermentativos que utiliza la ruta de Embden-Meyerhoff. Este género se ha reportado como la biota dominante en el queso Cheddar canadiense (Martin, 2008) y se le ha involucrado en la mejora del sabor de este queso durante las primeras etapas de maduración. El género consiste de siete especies: *P. pentosaceus*, *P. acidolactici*, *P. damnosus*, *P. halophiles*, *P. parvulus*, y *P. urinae-equi* (Parra, 2010). Este autor también encuentra la presencia de *P. pentosaceus* al mes de maduración. Esta especie contribuye mediante la oxidación de la lactosa, y la producción de péptidos y de lactato, al desarrollo del sabor en los quesos (Thomas, 1986). En este estudio, el microorganismo incluido en la rama más separada del árbol filogenético está relacionado con *P. pentosaceus* (12) y fue aislado al mes de maduración. En términos

8.2.3. Aislamiento de levaduras del queso cotija

Las levaduras del género *Kluyveromyces*, (*K. lactis* y *K. marxianus*), encontradas en este estudio aisladas en la etapa de maduración, se les reconoce por su habilidad de fermentar la lactosa (Lima *et al.*, 2009). *K. marxianus* ha sido aislada de fruta, queso, yogurt (Maubis, 1989), y leche (Roostita, 1996). *K. marxianus* ha sido utilizado en el procesamiento del lacto suero; fermentación de galactosa, sacarosa, rafinosa, y lactosa. Está levadura crece a temperaturas entre 20-30°C y pH 4,5-5, y con ella se obtienen etanol, glicerol, enzimas y proteína unicelular (Padín y Díaz, 2009). Por su capacidad de fermentar la lactosa y los productos que se obtienen a partir de esta, este género se acumulan en la etapa de maduración del queso. Estos datos coinciden con lo encontrado por Kaminarides y Anifantakis (1989) en su estudio de la evolución de la microbiota del queso Kopanisti durante la maduración. En este estudio se aislaron e identificaron a *K. lactis* y *K. marxianus*, al inicio y al final de la maduración. Por otro lado, el recuperar ambos microorganismos en las etapas tempranas del proceso producción del queso (cuajada y cuajada-salado) tiene como explicación que en estas etapas se registra la mayor actividad metabólica.

La microbiota es muy específica en cada quesería, esto contribuye al bouquet específico del producto. Por otra parte, se ha documentado que en los quesos donde predominan estas especies del género *Rhodotorula*, *Debaryomyces* y *Yarrowia* podrían producirse sabores indeseables y la generación de una textura desagradable en la apariencia del producto (Orbera 2004). En el caso del queso Cotija se lograron caracterizar levaduras de los géneros *P. guilliermondii*, *G. geotrichum* y *R. mucilaginosa*. Especies del género *Pichia* se han aislado de la salmuera de aceitunas y otros alimentos. *Rhodotorula*, es un aerobio estricto que forma películas en algunos productos, pigmentos rosa a rojo y causa deterioro en algunos quesos, crema,

Por otra parte, Roostita y Fleet (1996) sostienen que las enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas por las levaduras contribuyen al desarrollo del sabor y olor característico del queso durante la maduración. Sin embargo la proteólisis y la lipólisis de los componentes de la leche podrían tener un impacto negativo sobre su calidad, como la promoción de sabor rancio y alteraciones en la textura del producto.

Las levaduras obtenidas en la presente investigación han sido localizadas en otros importantes quesos. Tal es el caso del trabajo de Prillinger *et al.*, (1997) en donde se identificaron 76 aislamientos de levaduras, particularmente de las especies *D. hansenii*, *G.candidum*, *G. geotrichum*, *Issatchenkia orientalis*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*. Lopandic *et al.*, (2006) aislaron de la cuajada del queso fresco; *D. hansenii*, *K. marxianus*, *Yarrowia lipolytica* y *G.candidum*. Mayo y Florez (2004) caracterizaron levaduras de las especies *K. lactis* y *K. marxianus* en el queso español con denominación de origen Cabrales. Yalcin y Ucar (2009) identificaron levaduras de los géneros *Debaryomyces*, *Pichia* (*P. guilliermondii*), *Torulaspora*, *Candida*, *Williopsis*, *Galactomyces*, *Kluyveromyces* (*K. marxianus*) y *Yarrowia* en quesos blancos turcos causando alteraciones en el producto final.

8.2.4. Utilización de las pruebas fenotípicas y genotípicas en la caracterización de microorganismos

En esta investigación se completaron las técnicas basadas en el fenotipo de los aislamientos de bacterias y levaduras del queso cotija reportados por Barrera (2011), además de la utilización de método moleculares de análisis con base en la secuencia del ADNr 16S, para el caso de bacterias y de la secuencia de los genes ribosomales ITS1-ITS2 para la identificación de levaduras, teniendo como resultado la caracterización de la microbiota responsable de la maduración del queso cotija, en la mayoría de los casos hasta el nivel de especie. En general, en este estudio existieron

también han utilizado métodos fisiológicos y moleculares para caracterizar la microbiota láctica de un alimento de destete a base de sorgo fermentado (Kunene *et al.*, 2000), los resultados obtenidos indican el origen de las cepas predominantes mediante el análisis de los resultados de AFLP encontrando que *Lb. plantarum* provenía del polvo de sorgo usado como ingrediente y como las cepas de *Lcoc. mesenteroides* no mostraban un origen común, se sugirió entonces que provenían de las casas donde se preparó el alimento. En el caso del queso Oaxaca, utilizando el sistema Vitek ha sido posible revelar la presencia de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, los cuales han sido descritos entre los géneros más frecuentes en quesos de pasta filata elaborados con leche cruda (Piraino *et al.*, 2005; De Angelis *et al.*, 2006). Por otro lado, Larios, (2007) utilizando el método de Ribotado confirmó la presencia de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* en el queso Oaxaca. En embutidos fermentados se identificaron a nivel de especie aislados de bacterias ácido lácticas, de enterococos y de cocos gram-positivos catalasa-positivos (CGC+). Posteriormente se realizó una tipificación molecular de los mismos mediante RAPD y análisis del perfil plasmídico y se estudiaron las principales características de interés higiénico-sanitario y tecnológico de las cepas. Mediante PCR se identificó a la cepa *Lactobacillus sakei* como la especie predominante (74%), seguida por *Lactobacillus curvatus* (21,2%). La actividad aminoácido-d Descarboxilasa se asoció a la especie *L. curvatus* (Martín, 2005). Adicionalmente, se ha estudiado la maduración del queso Zlatar empleando la combinación de métodos fenotípicos (API 50 CH) y moleculares (rep-PCR). En este estudio fueron identificadas bacterias de los géneros: *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. brevis*, *Lb. lactis* subsp. *lactis*, *Ent. faecium* y *Ent. faecalis* (Terzic *et al.*, 2007). La técnica de RAPD manifestó la presencia de la diversidad microbiana tanto intraespecífica como interespecífica en quesos artesanales elaborados con leche de cabra (Martin-Platero, 2008). La presencia de bacterias ácido lácticas en queso Bukuljac ha sido analizado mediante el uso de un enfoque polifásico incluyendo métodos microbiológicos y moleculares como el rep-PCR con (GTG) 5', reportando como bacteria predominante a *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*. Así mismo, el

métodos como el DGGE y el rep-PCR, la presencia de BAL mesofílicas, incluyendo a *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, *Lactobacillus lactis* subspc *lactis* y *Enterococcus faecalis* en el queso Bukuljac a partir de leche de cabra (Nikolic *et al.*, 2008). Franciosi *et al.*, (2008), determinaron la presencia de *Ent. faecalis*, *Lb. paracasei* ssp *paracasei*, *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus* y *S. thermophilus* en la elaboración del queso Puzzone di moena mediante la identificación genotípica por el método de RAPD-PCR. Otro estudio donde se aislaron, identificaron y caracterización bacterias ácido lácticas empleando métodos fenotípicos y genotípicos durante la elaboración de un queso crema tropical es reportado por Ramos *et al.*, (2009). En este se identificaron cinco especies de *Lb. fermentum* y una especie de *Lb. pentosus*. Finalmente, en el extendido del queso Tosela, se demostró el predominio de *Lactobacillus paracasei* y *S. masedonicus* por medio de la técnica de DGGE considerándose que ambos microorganismos son capaces de persistir durante el almacenamiento (Settani *et al.*, 2011).

8.3. Cultivos iniciadores

La capacidad acidificadora de las cepas en leche es la habilidad de producir ácido láctico a partir de la lactosa de la leche. Esta característica es una de las principales funciones de un cultivo iniciador, ya que participa en la coagulación, en las características organolépticas y también en la inhibición de microorganismos indeseables (Brennan y Reginensi, 2001; Durlu-Ozkaya *et al.*, 2001; Morais, 2004).

Las cepas de BAL pueden ser clasificadas en lentas ó rápidas según su capacidad de crecer en leche a temperatura de fabricación (21 -30⁰C) (Serna y Rodríguez, 2005). Las cepas rápidas son capaces de coagular la leche en 24 horas y las cepas lentas en más de 48 horas. Otro criterio empleado comercialmente indica que las cepas rápidas disminuyen el pH de la leche fresca durante un lapso menor a 8 horas. En este estudio, observando el patrón de coagulación de las muestras y los valores de acidez alcanzados

8.3.1. Capacidad acidificadora

Las cepas de BAL del genero *Lactobacillus* difirieron en su habilidad para reducir el pH de la leche, pero de forma similar a las del género de *Lactococcus* todas presentaron baja actividad acidificante.

A nivel artesanal o industrial se buscan cepas BAL rápidas acidificantes que puedan ser candidatas para ser utilizadas en los procesos de fermentación como microorganismos integrantes de “starters” primarios, mientras que las cepas BAL acidificantes lentas se pueden emplear como cultivos adjuntos dependientes de otras propiedades proteolíticas y auto líticas. Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que la actividad acidificante de las cepas de *Lactobacillus* fue mayor que las otras cepas analizadas y concuerda con lo expuesto en trabajos previos (Ayad *et al.*, 2004; Morais, 2004; Haddadin, 2005). Ramos *et al.*, (2009) realizaron el aislamiento, identificación y caracterización de BAL del queso crema tropical y aislaron cepas del genero *Lactobacillus* presentando el mismo comportamiento que las bacterias de este estudio.

8.3.2. Sensibilidad a antimicrobianos

Al igual que en el presente trabajo; Bayer *et al.*, (1978) en un estudio realizado con 40 cepas de *Lactobacillus* encontraron que todas las cepas eran sensibles a la penicilina con una concentración mínima inhibitoria tan baja como 0.48 µg/ml. Charteris *et al.* (1998) trabajando con 46 cepas de *Lactobacillus* de origen humano y de productos lácteos y ensayando con 44 antibióticos, encontraron tal y como en el caso reportado en el presente trabajo, que todas las cepas fueron resistentes a la Kanamicina (30 µg/ml) pero sensibles a la penicilina, salvo 4 de ellas (3 de origen humano y 1 de

evidencia conclusiva. En otros reportes sobre la susceptibilidad de las BAL a los antibióticos se encontró que ante la penicilina y otros antibióticos que afectan la síntesis de la pared bacteriana, la mayoría de los representantes de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* analizados fueron sensibles a concentraciones entre 0.06 y 16 µg/ml.

Los tratamientos de limpieza con detergentes y combinaciones de ácidos y cloro son frecuentes para eliminar biopelículas en la industria láctea, así en Nueva Zelanda en un ensayo a nivel de laboratorio que reproducía las condiciones de una planta de productos lácteos se encontró que un tratamiento acido-alcalino (ácido nítrico al 0.8% y cloro 200 ppm) reduciría la población bacteriana hasta en dos unidades logarítmicas (Alvarado *et al.*, 2007). En la industria de alimentos y por supuesto en la industria láctea, sobre superficies y utensilios tienden a crearse biopelículas los cuales son un problema serio debido al potencial que representan como contaminantes en los productos alimenticios, lo cual se puede evitar mejorando la calidad en la preparación de los alimentos y con ello evitar un riesgo a la salud del consumidor. Es por ello que se emplean detergentes, desengrasantes, tratamientos ácidos, tratamientos alcalinos, productos a base de sales cuaternarios entre otros, a fin de poder obtener la mayor limpieza posible y disminuir todos los riesgos que pudieran presentarse (Lappaiboon *et al.*, 2012, Morais, 2004; Haddadin, 2005; González, 2010). Sin embargo, muchas veces quedan restos de estos compuestos que pueden afectar la viabilidad y el desempeño de las cepas iniciadoras.

Los niveles de sensibilidad de las cepas empleadas como cultivos iniciadores dependen mucho de cada cepa y la capacidad que presenten a resistir ciertas concentraciones de antimicrobianos, lo cual está relacionado con la presencia de plásmidos en los microorganismos. La adquisición de estos plásmidos depende de la presión a la que haya sido sometido el microorganismo debido a la presencia de antimicrobianos en su hábitat (leche). Las concentraciones de antimicrobianos ensayadas en este trabajo

consideran al menos 0.01 µg/ml, la kanamicina no debe estar presente en la leche debido a las consecuencias que puede ocasionar a la salud del consumidor. Sin embargo, en este estudio se decidió probar concentraciones superiores, ya que existen reportes que señalan que después de administrar en forma parenteral antimicrobianos al ganado, el 0.3 % de la dosis suministrada puede ser detectada en la leche (Ramírez, 2005; Neira, 2006 y Rodríguez *et al.*, 2007).

Las BAL requieren condiciones y medios especiales para crecer, por ello el uso de medios convencionales como el de Muller-Hinton para determinar la susceptibilidad hacia los antimicrobianos puede no ser adecuada. Lo anterior es algo a considerar cuando se hacen los ensayos de susceptibilidad con BAL y que podrían explicar muchos resultados contradictorios (Klare *et al.*, 2001). Siempre genera controversia el escoger una cepa iniciadora entre otras por su resistencia a los antimicrobianos de uso común en ganadería y en la industria láctea, cada vez se encuentran cepas de bacterias ácido lácticas que muestran resistencia a los antimicrobianos, y hay quien justifica este tipo de estudio para evitar la selección de cepas resistentes en los cultivos iniciadores (Florez y Delgado, 2005). Las concentraciones de antibióticos ensayadas en este trabajo fueron muy altas con relación a las concentraciones que normalmente se consideran permisibles en leche (Mora y García, 2007). Dada la variedad de antimicrobianos y concentraciones que pueden ser suministrados al ganado y las diversas formas en que esto puede hacerse es difícil determinar con precisión las cantidades residuales de estos compuestos en leche. Es importante mencionar que estas cepas fueron resistentes incluso a 12µg/l del compuesto clorinado, una concentración de cloro en la cual se ha encontrado sensibilidad para cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Peña, 2007; Mejia *et al.*, 2007).

Cuando se compara la capacidad acidificadora de estas cepas de estudio con la presentada por cepas comerciales Lacto-Labo se observa que el comportamiento es similar, además la acidez producida por los quesos elaborados en el laboratorio (5.06) es equivalente al queso artesanal (pH 5.0) lo que sugiere que las cepas aisladas en el

8.3.3. Análisis sensorial de los quesos elaborados

En el ámbito mundial los mejores quesos se elaboran con leche cruda de alta calidad, lo que explica entre otras cosas por la presencia en ella de una compleja biota que se encuentra perfectamente adaptado a la leche y con su actividad fermentativa proporcionan a esos quesos sus extraordinarias características organolépticas (Alvarado *et al.*, 2007). Al parecer los microorganismos del género *Lactobacillus* son los responsables en proporcionar las características particulares de este queso en estudio. Este trabajo es apenas un estudio preliminar y es necesario continuar ampliando el análisis de estas y otras cepas de BAL presentes en el queso cotija con el fin de caracterizar con más precisión, la biota responsable de proporcionar las características organolépticas de este importante queso artesanal, así como continuar buscando nuevas cepas con mayor capacidad acidificadora y mayor resistencia a antimicrobianos. En este estudio se compararon las características sensoriales de los quesos experimentales producidos a partir de los cultivos iniciadores encontrándose que a este nivel el queso cotija experimental es equivalente al cotija artesanal. Sin embargo, los resultados obtenidos deben tomarse con reserva ya que la metodología aplicada en el presente estudio solo se basó en dos repeticiones aplicadas a 14 productores, lo anterior fue debido a la distancia que existe entre cada rancho de los productores, la disponibilidad de los productores y a los problemas de inseguridad. Al respecto, es importante mencionar que en estudios similares aplicados en el análisis sensorial de quesos, el número de repeticiones ha sido de 20 panelistas en donde se evaluó la producción de quesos de pasta prensada a partir de un cultivo iniciador preparando las siguientes mezclas: mezcla 1: *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* en una proporción del 10% y *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* en un 90%. Otra mezcla fue con cepas de referencias *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* ATCC 19435 y *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* ATCC 19257 la proporción entre ellas fue del 10 y 90% respectivamente.

Lopez, 2000). Hernandez y Oporta (2006) trabajaron con 17 panelistas para la evaluación de un queso crema determinando variables como olor, color, sabor textura a partir de un cultivo láctico CHN-1, los autores concluyen que la incorporación del cultivo iniciador tuvo un efecto en la elaboración del queso demostrándose que el producto final tiene características organolépticas similares al queso que fue elaborado sin la adición del cultivo iniciador. Adicionalmente, un panel de 10 jueces evaluaron las características sensoriales del queso Manchego el cual fue elaborado a partir de 3 lotes diferentes, el lote 1: fue preparado con *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* (80%) + *Leuconostoc mesenteroides* (20%), el lote 2: *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* (80%) + *Leuconostoc mesenteroides* (10%) + *Lactobacillus plantarum* y el lote 3: con un cultivo starter el cual estaba compuesto de *Lactobacillus lactis* y *Streptococcus thermophilus*, observándose que el olor, la calidad del olor y la impresión global fueron mayores para los quesos del lote 1, seguido de los del lote 2, ambos elaborados con cultivos iniciadores definidos, obteniéndose que los quesos del lote 3 fueron los que recibieron las puntuaciones más bajas. Así mismo, Rodríguez *et al.*,(2007) con un panel de 10 personas evaluó sensorialmente la preparación del queso andino a partir de un cultivo iniciador de *Enterococcus* aislados a partir del mismo, teniendo como resultado que el grupo de degustadores tuvieron un porcentaje alto de aceptabilidad con los quesos elaborados en el laboratorio, comparativamente al queso elaborado artesanalmente. Adicionalmente, con el mismo queso andino pero ahumado se trabajó con un panel de 5 personas expertas y familiarizadas con el ahumado andino con dos repeticiones a partir de un cultivo iniciador con bacterias ácido lácticas, considerando atributos como: características de la pasta, textura, aroma, sabor y aceptabilidad. En general, estos autores concluyen que los quesos elaborados son equivalentes al artesanal en cuanto a sabor, aroma y aceptabilidad. En el queso Puzzone di moena se trabajó con 6 panelistas donde se evaluó la adición de un cultivo iniciador observándose que el género de *Lactobacillus* proporciona particularmente el olor y el sabor de este queso (Franciosi *et al.*, 2008). Por otro lado, en el desarrollo de un queso madurado en Costa Rica, se evaluó su aceptabilidad de maduración con 72 personas consumidoras de este

aceptabilidad del sabor y la textura para los quesos sometidos a diferentes tiempos de maduración (Boza *et al.*, 2010). Finalmente, nuestros resultados indican que estos microorganismos tienen un gran potencial para su uso a escala industrial con la leche pasteurizada.

9. CONCLUSIONES

1. El diagnóstico microbiológico realizado en cada una de las explotaciones lecheras de estudio mostró que éstas no cumplían con las especificaciones de la NOM-120-SSA1-1994, principalmente en la etapa I (antes de la aplicación de las BPH). Así mismo, se detectaron puntos críticos que pueden representar un riesgo para la salud del consumidor.
2. Se detectó la presencia de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* en los quesos muestreados, así como recuentos bacterianos elevados de *Staphylococcus aureus*, lo que indica que estos se encuentran contaminados por una deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.
3. La implementación del programa de BPH durante el proceso de elaboración del queso cotija resultó en una limpieza mayor de las áreas de trabajo y en las manos de los trabajadores, lo cual contribuyó a mejorar las condiciones sanitarias, así como, la disminución de grupos indicadores BMA, OCT y OCF.
4. El análisis de la microbiota benéfica del queso cotija mostró que está constituida principalmente por bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, y por levaduras de los géneros *Kluyveromyces*, *Galactomyces*, *Rhodotorula* y *Pichia*.
5. A partir del queso cotija artesanal fue posible obtener cepas de BAL apropiadas para su utilización como cultivos iniciadores. De las 16 cepas, la BCOT-12, fue la de mayor poder y velocidad de acidificación, lo que contribuyó a mejorar las características organolépticas del queso elaborado con leche pasteurizada.
6. Los quesos tipo cotija experimentales elaborados con cultivos iniciadores aislados a partir del queso cotija artesanal, tuvieron buena aceptación para el grupo de degustadores aunque estos resultados deben tomarse con reserva debido al bajo número de muestras y repeticiones empleadas. Estos resultados sugieren que bajo adecuadas condiciones de higiene y utilizando estos cultivos iniciadores se puede elaborar un queso tipo cotija con características organolépticas aceptables y similar a las del queso cotija artesanal genuino.

10. PERSPECTIVAS

1. Se sugiere caracterizar la microbiota presente en el desuerado ya que este sub-producto se desecha y finalmente representa una fuente de contaminación al ambiente.
2. Se sugiere caracterizar la producción de bacteriocinas o metabolitos tóxicos durante el proceso de elaboración del queso cotija.
3. Se sugiere ampliar los experimentos sensoriales en los quesos experimentales para abarcar no solo a productores, si no también estudios de preferencia de consumo con el público en general, así también como incrementar las repeticiones y el tamaño de muestra en dichas pruebas.
4. Se sugiere continuar con la implementación por parte de los productores de las BPH para ajustarse a la NMNX-F-735-COFOCALEC-2011 y de esta forma se pueda contribuir a una denominación de origen, lo cual permitirá que esta región proteja su producto y tenga un mejor costo en el mercado.

11. REFERENCIAS

- AFNOR, 1995. Association Française de Normalisation. Analyse sensorielle. Recherche et sélection de descripteurs pour l'élaboration d'un profil sensoriel, par approche multidimensionnelle. Norme Française NF ISO 11035.
- Agarwal S., Powers JR., Swanson BG., Shen S y Clark S. 2008. Influence of Salt-to-Moisture Ratio on Starter Culture and Calcium Lactate Crystal Formation. **Journal of Dairy Science**. 91: 2967-2980.
- Alais C. 2001. Ciencia de la leche. CECSA. México. pp 95-109.
- Alegría A., Roces C., López B., Delgado S., Mayo B. 2010. Bacteriocins produced wild *Lactococcus lactis* strains isolated from starter-free cheeses made of raw milk. **Journal Food Microbiology** 143:61-66.
- Alvarado R C., Chaco R Z., Otoniel R J., Guerrero C B., López C G. 2007. Aislamiento e identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso Venezolano Ahumado Andino Artesanal. Su uso como cultivo iniciador **Revista Científica FCV-LUZ XVII** (3):301-308
- Álvarez BR., Barragán LE., Chombo MP. 2004. Reglas de uso de la carca olectiva queso cotija, Región de Origen, Zamora, El Colegio de Michoacán. p 20.
- Amores R., Calvo A., Maestre JR., Martínez-Hernández D. 2004. Probióticos. Revisión. **Revista Especializada en Quimioterapia** 17(2):131-139.
- Andrighetto C., Marcazzan A., Lombardi. 2004. Use of RAPD-PCR and TGGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. **Letters in Applied Microbiology** 38:400-405.
- Antonsson M., Molin G., Ardo Y. 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese model system. **Journal of Food Microbiology** 85(1-2):159-169.
- AOAC, 2000. Association Official Analytic Chemistry. Official methods of analysis. Association of Official.
- Arteaga M MR. 2004. Evaluación de la maduración del queso Chanco, elaborado con la adición de suero en polvo. Tesis de maestría en Ciencias Agrícolas y Tecnológica de la leche. pp 5 – 236.
- Arteaga MA., Molina C LA., Pinto CM., Brito C. 2009. Caracterización de queso Chanco enriquecido con suero lácteo en polvo. **Revista Chilena de Nutrición**. 36(1):53-62.
- Aslam Z., Im WT., Ten LN., Lee MJ., Kim KH., Lee ST. 2006. *Lactobacillus siliginis* sp., isolated from wheat sourdough in South Korea. **Journal of Food Microbiology** 56:2209-2213.
- Axelsson LT. 2004. lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: Salmien S., Von Wright.A., Ouwehand A. (Eds) Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Edition Marcel Dekker Inc. New York. pp1- 66.
- Ayad E HE., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H., El-Soda M. 2004. Selection of mild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological Criteria. **Journal Food Microbiology** 21:715-725.
- Azarnia S., Robert N., Lee B. 2006. Biotechnological Methods to Accelerate Cheddar

- Barragán LE., Chávez TM. 1998. El queso Cotija se nos va de las manos en: OIKIÓN, Verónica (Coord) Manufacturas de Michoacán. México, El Colegio de Michoacán/Gobierno del Estado. p 67.
- Barragán LE. 1990. Más allá de los caminos, los rancheros del Potrero de Herrera, Zamora, El Colegio de Michoacán. p 220.
- Barragán LE. 1997. Con un pie en el estribo. Formación y deslizamientos de las sociedades rancheras en la construcción del México moderno. Zamora, El Colegio de Michoacán-Red Neruda. p 297.
- Baruzzi F., Morea M., Matarante A. 2000. Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. **Journal Applied Microbiology** 89:807-814.
- Bauer A., Kirby M., Sherris J., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **America Journal Clinical Pathology**. 45: 493-496.
- Bayer AS., Chow AW., Concepcion N., Guze LB. 1978. Susceptibility of 40 Lactobacilli to six antimicrobial agents' broad gram-positive anaerobic spectra. **America Agents Chemotherapy** 14:720-722.
- Bazaes M. 2004. Características de calidad química y sensorial de Queso Gauda. Tesis presentada para optar al grado de licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. p 86.
- Beresford T., Fitzsimons N., Brennan N., Cogan T. 2001. Recent advances in cheese microbiology. **Journal Dairy Journal** 11: 259-274.
- Beresford T., Williams A. 2004. The microbiology of chesses ripening. In: Chesses chemistry physics and microbiology (3ed). Fox P F., McSweeney P L., Cogan T., M., Guene T., P., (Ed). Amsterdam. **Journal Elservier** 1:287-317.
- Barrera H. 2011. Caracterización molecular de la microbiota asociada al queso cotija. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable. Instituto Politécnico Nacional. p 92.
- Bergey's. 2001. Manual of systematic bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Vol. 1. Michigan State University East Lansing, USA. pp 251 – 254.
- Bolaños LG. 2007. Industrialización del proceso de extracción de la leche bovina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería, Guatemala. pp 34 -56.
- Bolbe G., Lindberg GL., Reutzel LF., Hanigan MD. 2009. Effects of lipid supplementation on the yield and composition of milk from cocus with different beta-lactoglobulin phenotypes. **Journal Dairy Science** 92:197-203.
- Boza E. 2008. Desarrollo de queso madurado adicionado con el cultivo prebiótico *Lactobacillus paracasei* subespecie Paracasei Lc-01. Tesis en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos. San Jose pp 3- 45
- Boza ME., Morales HI., Henderson GM. 2010. Desarrollo de un queso madurado con adición de un cultivo probiotico *Lact. paracasei* subsp *paracasei* LC-01. **Revista Chilena de Nutrición** 37:215-233

- Braun D. 2006. Implementar y medir-claves para obtener leche de calidad más alta **Hoard's Dairyman en español** 12:771-773.
- Brennan E., Reginensi S. 2001. Aislamiento, identificación y estudio de características de interés tecnológico de bacterias ácido lácticas nativas de la leche pertenecientes a la familia *Streptococcaceae*. Facultad de Agronomía. Universidad de Uruguay. pp 5- 67.
- Briones PAJ., Laborda PF. 2008. Valuating the cooperation inter-managerial in small sized firms of the Murci, micro and e-micro projects (2002-2007). Universidad Politécnica de Cartagena (UPVT).pp 23-25.
- Brito C. 2010. Guía de Práctico de Queso Gauda. Asignatura ITCL 326, Laboratorio Tecnología de la leche. Magister en Ciencia y Tecnología de la Leche. Universidad Austral de Chile. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Valdivia.
- Budde BB., Hornbaek T., Jacobsen T., Barkholt V., Koch AG. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification and meat application experiments. **Journal of Food Microbiology** 83: 171-184.
- Burton RW., Jack JR. 2007. The diversity of bacteriocin in Gram positive. Bacteriocins. Ecology and Evolution. pp 45 -90.
- Cabeza HEA. 2006. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo", Universidad Libre, Barranquilla – Colombia, 15 y 16 de septiembre de 2006.
- Cabezas L., Sanchez I., Pomeda JM., Sesenas S., Palop ML. 2007. Comparison of microflora chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheese from two dairies. **Journal Food Control**. 18(1): 11 -17.
- Calderón A., García F., Martínez G. 2006. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia** 11(1):1-16.
- Calderón RA., Rodríguez RV., Vélez RS. 2007. Evaluación de la calidad composicional de leche de cuatro procesadoras de queso en el municipio de Montería, Colombia. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia** 12(1): 912-920.
- Calleja C., Carballo J., Capita P., Bernardo A., García MC. 2002. Changes in the microflora of Valdetoja raw goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening. **Food Science and Technology** 35:222-232.
- Calvinho LF., Canavesio VR., Aguirre NP. 2005. Análisis de leche de tanque de frío: una herramienta para detectar problemas y proponer soluciones. **Publicación Miscelánea del Instituto de Tecnología Agroalimentaria (INTA)** 89:73-73.
- Canchaya C., Claesson MJ., Fitzgerald GF., Van Sinderen D., O'toole PW. 2006. Diversity of genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. **Journal Science Microbiology** 152:3185-3196.

- Carrillo BJ. 2007. Calidad higiénica de la leche y producción limpia en la lechería. Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT). Proyecto Fondef DO3 – 1151. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Chile, Santiago. p 24
- Carrillo IML., Mondragon HFM. 2011. Estudio de vida útil del queso asadero. **Revista de Salud Pública y Nutrición** 12(3):1-8.
- Castellano P., Belfione C., Fadale S., Vignolega G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Review Meat Science** 79(3):483-499.
- Castillo M., Martin-Orur SM., Nofrarias M., Manzanilla EG., Gasa J. 2007. Changes in ceacal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. **Journal Veterinary Microbiology** 124:239-247.
- Castro MR., Villegas GA., Cervantes F. 2001. Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México en FIRA, Boletín informativo, México D.F. XXXIII (317): 317
- Cava R., Sangronis E., Licci E., Woyzechowsky L. 2006. Efecto de la adición de nisina en quesos fresco telita sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. **Anales Venezolanos de Nutrición** (9):1234-1240.
- Cervantes F., Villegas A., Cesin A., Espinoza A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio que debe rescatarse. Mundi Prensa. p 186.
- Cervantes–Escoto F., Villegas–Gante A., Cesin-Vargas A., Espinoza–Ortega A. 2006. Los quesos Mexicanos genuinos: Un Saber- Hacer que se debe rescatar y preservar. III Congreso Internacional de la Red SIAL “Sistemas Agroalimentarios locales” Alimentación y Territorios. Baeza. pp 18-21.
- Chacon RZ., López CG. 2000. Evaluation of cepas de *Lactococcus* strains an starts in the elaboration of passed cheese. **Revista Científica. Universidad de los Andes de Mérida, Venezuela**. X (5):423-428.
- Chamorro MC., Losada M. 2002. Tecnología de alimentos. El análisis sensorial de los quesos AMV Ediciones, Mundi prensa. ISSN 97884847602.
- Chamorro HE. 2010. Determinación de la calidad composicional y de residuos antibióticos betalactámicos en leche cruda expendida en el sector urbano municipio de Ipiales. **Revista Universidad y Salud** 1(2):23-30.
- Charters WP., Kelly PM., Morelli L., Collins JK. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal Food-Protection** 61:1636-1643.
- Chassagne M., Barnouin J., Le Guenic M. 2005. Expert Assessment Study of Milking and Hygiene Practices Characterizing Very Low Somatic. Cell Score Herds in France. **Journal Dairy Science** 88:1909-1916.
- Chombo MP. 2003. Queso Cotija. El queso que busca la certificación de su origen”. Curso-taller sobre los Sistemas Agroindustriales Localizados. p 13.
- Chopard MA., Schmitt E., Perreard JF., Chamba JF. 2001. Aspect qualitative de lactivite proteolytique de *Lactobacillus thermopiles* utiles en fabrication of fromages a pate pressée cutie. **Letter Lait** 8(1-2):83-94

- quesera” perteneciente a la organización Cocihc. Tesis de grado. Riomba, Ecuador. pp 33 – 38.
- Cocolin L., Innocente N., Biasutti M., Comi G. 2004. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. **Journal of Food Microbiology** 90: 83-91.
- Collins CH., Lyne PM., Grang JM. 1991. Microbiological methods 6th edn. Microbiology Academic. Press Inc. (Butterworth and Coeds) Ltd Butterworth Heinkain. Oxford.
- Cogan TM. 2002. Cheese microbiology En: Fundamentals of cheese Science, Eds. P F Fox., T Ginee T McCogan y P L H., Mcsweeny. Gaithersburg: Aspen publishers.
- Cook GM., Sandeman RM. 2000. Source and charatization of spones forming bacteria in raw milk Australian. **Journal of Dairy Technology** 55(3):119-126.
- Coppola R., Nanni M., Iorizzo M., Sorrentino A., Sorrentino E., Chiavari C., Grazia L. 2000. Microbiological characteristics of Parmigiano Regigiano cheese during the cheesemaking and first months of the ripening. **Letter Lait**. 80:479-490.
- Correa CJH. 2005. Prácticas de producción de leche en Colombia. pp 1 – 53.
- Corsetti A., Rossi J., Gobbeti M. 2001. Interaction between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. **Journal of food Microbiology** 69:1-10.
- Crosa MJ., Harispe R., Mussio P., Pelaggio ER., Repiso L., Silvera C. 2009. Comparación de los cambios químicos y microbiológicos en la maduración del queso colonial salado tradicional y por impregnación al vacío. **Revisión del Laboratorio Tecnológico de Uruguay** 4:311-318.
- Crow VL., Curry B., Hayes M. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. **Journal Dairy Science** 11:275-283.
- Dargal BS. 2006. Química de los Alimentos. México, Pearson Educación. ISBN 970-26-0670-5.
- De Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M R., Gobbetti, M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. **Applied and Environmental Microbiology** 67:2011-2020.
- De Angelis M., Candis D., Cagno R., Mcsweeny PLH., Gobbetti M. 2006. Microbiology and biochemistry of traditional Mozzarella cheese. Australian **Journal of Dairy Technology** 61:128-131.
- De Vos WM. 2001. Advances in genomics for microbial food fermentations and safety. **Current Opinion in Biotechnology** 12:493-498.
- Del Valle M. 2007 “Sistema de innovación y transformaciones socioeconómicas de la agroindustria de los quesos en México” en VII con queso ACASRU.
- Delgado AT., Quijada G., López V., Marchan M., Morros C., Sánchez C. 2009. En la búsqueda de una mejor calidad de vida y un mejor futuro más seguro. **Revista Agroecología** 25(2):29-32.
- Delgado S., Mayo B. 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and

- Dellagio F., Torriani S., Felis GE. 2004. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. **Journal System Evolution Microbiology** 54:809-812.
- Di Marzo L., Centi C., Cinque B., Masci S., Giuliani M., Arcieri A., Zicari L., De Simone C., Cifone MG. 2003. Department of drugs Science. University G.D. Annunzio. **Chieti Scalo, Italy** 12(5):615-620.
- Díaz JR., Peris C., Rodríguez M., Molina MP., Fernández N. 2004. Effect of milking pipeline height on Machine milking efficiency and milk quality in sheep. **Journal Dairy Science** 87:1675- 1683.
- Díaz CM. 2007. Operación sanitaria, Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios. Disponibles en: <http://www.cofepris.gob.mx>.
- Díaz RG., Wachter RC. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. **Revista Latinoamericana de Microbiología** 45(1-2):30-40.
- Duran F. 2006. Manual del Ingeniero de Alimentos. Microbiología de Alimentos. **Tecnología de Alimentos** 1(76):289-296.
- Durlu-Ozkaya F., Xanthopoulos V., Tunail N., Litopoulou T., Zanetaki E. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyez cheeses made from raw. **Journal Applied Microbiology** 91(5):861-870.
- Dzidic A., Macuhova J., Bruckmaier R. 2004. Effects of Cleaning Duration and Water Temperature on Oxytocin Release and Milk Removal in an Automatic Milking System. **Journal Dairy Science** 87:4163-4169.
- El Soda M., Madkor SA., Tong PS. 2000. Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. **Journal Dairy Science** 83:609-619.
- Elmoslemanya A., Keefe G., Dohoa I., Wichtela J., Stryhna H., Dingwelle R. 2010. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine** (Irlanda) 95:32-40.
- Ercolini D., Hill PJ., Dodd CER. 2003. Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 3540-3548
- Estévez JNR., Botero JER., Ruiz-Cortez ZT. 2011. Detección de riesgos de contaminación de microbios ambientales en un sistema de ordeño mecánico de un hato lechero del norte de Antioquia. **Revista Lasallista de Investigación** 8(121):8-15.
- Estrada A., Gutiérrez L., Montoya O. 2005. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *lactobacillus* spp contra *Salmonella* spp y *Escherichia coli*. **Revista FCA LVII** pp 2601-2609.
- Etayo I., Perez-Elortondo F I., Gil PF., Albisu M., Virto M., Condes S. 2006. Hygienic quality, lipolysis and sensory properties of spanish proceses manufactured with lamb rennet paste. *Lait*. 86(6):415-434.
- Fadul PL., Quecano PM. 2005. Evaluación de la flora microbiana del queso Paipa durante diferentes periodos de maduración. Tesis de licenciatura. Universidad

- fomento y capacitación en lechería de la FAO para América Latina. Santiago, Chile. p 132.
- Farkye NY. 2004. Cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**. 57(2/3): 91-98.
- Felis G., Dellaglio F. 2007. Taxonomy of *Lactobacilli* and bacteria. **Curren issues Intestinal Microbiology** 8:44-61.
- Felis GE., Dellaglio F., Torrani S. 2009. Taxonomy of probiotics microorganisms. Prebiotics and probiotics science and technology. 1st Ed. Springer. pp 591 – 637.
- Feria CPF. 2007. Aislamiento y caracterización de Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis de Maestría en Biotecnología Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellin, Colombia p 84.
- Fernandez EE. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. “Lacteos”. pp 590 – 592.
- Fernández M., Gómez M., Martin J. 2009. Proteolytic activity, micotoxins and andrastin in *Penicillium* Roquefort: strains isolated from cabrales valdeon an Bejes- tresviso local varieties of blu- veined cheeses. **Journal of food Microbiology** 136:18-25.
- Ferreira EO., Ocampo LC. 2008. *Salmonella*. In: Trubulis LR., Alterthum F., Editores Microbiología. 5^{ta} edición. Sao Paulo New. pp 329 – 338.
- Fischett VA., Novick RP., Ferretti JJ., Pontnoy DA., Rood JI. 2000. Gram Positive pathogens. ASM: Press. ISBN.T-55581-166-3.
- Fitzsimons NA., Cogan TM., Condon S., Beresford T. 2001. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. **Journal Applied Microbiological** 90:600-608.
- Florez AB., Delgado S., Mayo B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. **Canadian Journal of Microbiology** 51:51-58.
- Florez AB., Mayo B. 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR–DGGE. **International Journal Food Microbial** 110:165–171.
- Florez A., Álvarez-Martin P., López-Dogan T., Mayo B. 2007. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. **International Dairy Journal** 17:350-357.
- Flores E. 2008. Evolución de la Maduración de Queso Gauda Semidescremado con Adición de Cultivo Probiótico *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei* y del Prebiótico Inulina. Memoria de título presentada para optar al grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. p 82.
- Fox PE, Guinee TB, Cogan TM, McSweeney PLM. 2000. Microbiology of cheese

- Fox PF., McSweeney PLH. 2003. Proteins in Advanced. **Journal Dairy Chemistry 1**: ISBN 03064727-6
- Franciosi E., Settanni L., Cartin S., Carvazza A., Poznanski. 2008. A factory-scales application of secondary adjunct cultures selected from lactic acid bacteria during Pozzone di moena cheese ripening. **Journal of Dairy Science**. 91:2981-2991.
- Gálvez A., Abriouel H., López R., Ben Oma A. 2007. Bacteriocin based strategies for food biopreservation. **Journal Food Microbiology** 120:51-70.
- Gaviria B. 2007. Calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda. En: Buenas Prácticas de Producción de Leche. Ed. Biogénesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. p189.
- Gerasimor A., Dolmator A., Osledkin L., Kochetkov VV. 2001. Aroma-Forming Substances from a culture of the Mold fungus *Penicillium roqueforti* grown on curd. **Applied Biochemistry and Microbiology** 37(5);528-533.
- Giraffa G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology reviews** 28:251-260.
- González M. 2002. Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo, yogurt, Veragras, Ranamana.
- Gonzalo C., Carriedo JA., García-Jimeno MC., Pérez-Bilbao M., De la Fuente LF. 2010. Factors influencing variation of bulk milk antibiotic residue occurrence, somatic cell count and total bacterial count in dairy sheep flocks. **Journal Dairy Science** 93:1587-1595.
- Granados C., Gonzalo G., Acevedo D. 2010. Tecnificación, caracterización fisicoquímica y microbiológica del queso de capa de Mompox, Colombia. **Revista de Biotecnología Agroindustrial** 8:440-588.
- Guardado R., Asersi V., Torres J., Pérez F., Blanco A., Maradona J., Carton J. 2006. Post-surgical enterococcal meningitis: clinical and epidemiological study of 20 cases. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases** 38(8):584-588.
- Guerrero MY., Ruiz MFA., Castel GJM., Ligeró M., Casquet O. 2008. Análisis de la viabilidad Técnico-Económica de explotaciones caprinas de la raza Popoya y propuestas de Mejora. **FEAGAS**.2:143-149.
- Guinee TP. 2004. Salting and the role of salt in cheese. **Journal of Dairy Science**. 86:60-69.
- Guinee TP y Fox PF. 2004. Chemistry, Physics and Microbiology. **In**: P.F. Fox. London. Elsevier. pp 182 – 197
- Gutiérrez A. 2005. Las Practicas sociales: una introducción a Pierre Bourdieu. Ed. Ferreyra.
- Haddadin JK. 2005. Kinetic studies and sensorial analysis of lactic acid bacteria isolated from white cheese made from sheep raw milk. Park. **Journal Nutrition** 4(12):78-84.
- Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser** 41:95-98

- Hardie J., Whiley RA. 2006. The genus *Streptococcus* oral Prokaryotes, 3^{er} Ed. Springer. 4:76-107.
- Harrington D., Sutcliffe I., Chanter N. 2002. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbes and Infection** 4(4):501-510.
- Hassan AN., Frank JF. 2001. Starter cultures and their use. In: **Applied Dairy Microbiology** 123:345-350.
- Hayes MC., Ralyea RD., Murphy SC., Carey NR., Scarlett JM., Boor KJ. 2001. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. **Journal Dairy Science** 84:292-298.
- Hermida BJ. 2000. Principios fundamentales agroalimentarios del Diseño de procesos. España: Mundi Prensa. pp 13-15 ISBN 84-7114-913-3.
- Hemme D., Foucaud-Scheunemann C. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **Journal Dairy**14: 467-494. Costa Rica. **Emerging Infectious Diseases** 14:1430-1433.
- Hernández TD., Oporta RE. 2006. Efecto del cultivo láctico CHN-1 en la elaboración del queso crema con leche de cabra de forma artesanal en la hacienda Santa Rosa. Universidad Nacional Autónoma de Managua. Tesis de Licenciatura. pp 2 – 49.
- Hogeveen H., Ouweltjes W. 2003. Sensors and management support in high-technology milking. **Journal Animal Science** 81 (suppl.31): 1-10.
- Hoopster H., Bruckmaier R., Van der Werf., Kortjes S., Macuhoa J., Horte-Buows G., Van Reenen C. 2002. Stress Responses during Milking Comparing Conventional and Automatic Milking in Primiparous Dairy Cows. **Journal Dairy Science** 85:3206-3216.
- Hovinen M., Aisla A., Pyo S. 2005. Visual of Technical Success and Effectiveness of teat cleaning in two automatic milking systems. **Journal Dairy Science** 88:3354-3362.
- Huang YC., Adams M. 2004. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal Food Microbiology** 91:253-260.
- Hurt R., Qiu X., Wu L., Roh Y., Palumbo A., Tiedje J. Zhou J. 2001. Simultaneous Recovery of RNA and DNA from soils and sediments. **Applied and Environmental Microbiology** 67:4595-4503.
- Inocente N., Pittia P., Stefanuto O., Corradini C. 2002. Correlation among instrumental texture, chemical composition and presence of characteristic holes in a semi-hard Italian cheese. *Milchwissenschaft*. 57(4):204-211.
- Izquierdo E., Marchioni E., Aqude-Werner., Hasselmann C., Ennahar S. 2009. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81 a multi bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. **Journal Food Microbiology** 26(1):16-20.
- Jukes TH., Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. In Muro HN, editor. *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York. pp. 21 – 131.
- Kaminarides SE, Anifantakis EM. 1989. Evolution of the microflora of Kopenisti

- Klaenhammer TR., Barrangou BL., Buck MA., Azcarate PAE. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria, effecting bioprocessing and health. **Review Microbiology** 29:393-409.
- Klare I., Werner G., White W. 2001. Enterococci. Habitats infections virulence factors, residences to antibiotics, transfer of resistance determinants. **A review Contribution Microbiological** 8:108-122.
- Konig H., Frohlich J. 2009. Lactic acid bacteria. Biology of microorganism on grapes. In must and inivine. 1stEd.Ed. Springer 3-30.
- Konstantinov SR., Awati AA., Williams BA., Miller BG., Jones P., Stokes CR., Akkermans AD., Smiidt H., de Vos WM. 2006. Post-natal development of microbiota compositum and activities. **Journal Environmental Microbiological** 8:1191-1199.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I., Nei M. 2001. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. **Bioinformatics** 17:1244-1250.
- Kunene NF., Geormaras I., Von Holy A., Husting JW. 2000. Characterization and determination of origin of Lactic acid bacteria from sorghum based fermented waning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. **Journal Applied Environmental Microbiology** 66:1084-1092.
- Lamontagne J., Butler H., Cahves-Olarte E., Hunter J., Schirm M., Paquet C., Tian M., Kaerney P., Hamaidi L., Chelsky D., Moriyon I., Moreno E., Paramithiotis E. 2007. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. **Journal of Proteorne Research** 6:1519-1529.
- Laopaiboon L., Hall SJ., Smith RN. 2002. The effect of quaternary ammonium biocide on the performance and characteristics of laboratory. **Journal of Applied Microbiology** 93(6):1051-8.
- Larios CE. 2007. Caracterización de la microflora del queso tipoOaxaca y su capacidad antimicrobiana. Tesis de licenciatura. Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. pp 1 – 84.
- Lawlor J., Delahunty C., Wilkinson M y Sheehan J. 2003. Swiss-type and Swiss-Cheddar hybrid type cheeses: effects of manufacture on sensory character and compositional constituents. **Journal of Dairy Technology**. 56: 39-51.
- Leverrier P., Dimova D., Dichereo V., Aufray Y., Boyaval P., Juan G. 2004. Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation navels both common and response pathways in *Propionibacterium freudenreichu*. **Archives of Microbiology** 181:215-230.
- Lima C., Fontes L., Blanco K., Contreras J. 2009. Response surface optimization of D(-) lactic acid production from *Lactobacillus* SMI8 yeast autolysis as nitrogen sources. **Journal Africans of Food Science** 3(9): 257-261.
- Lin WH., Yu B., Jang SH., Tsen HY. 2007. Different probiotic proprieties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*. pp 107-113.
- Linares S.M., Salís C.F. 2001. Identificación de levaduras. **Revista Iberoamericana**

- Little CL., Rhoades JR., Sagoo SK., Harris J., Greenwood M., Mithani V. 2008. Microbial quality of retail cheese made from raw, thermised or pasteurized milk in UK. **Journal Food Microbiology** 25:304-312.
- Lopandic K., Zaegers, Banzky L., Eliskases Lediner F., Prillinger H. 2006. Identification of yeast associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Journal Food Microbiology** 23: 341-350.
- López B., Domingo D. 2007. Antibioticoterapia con probióticos. **Revista Española de Quimioterapia** XX: 170-181.
- López C., Braird-Bion V., Menard O., Rousseu F., Pradel P., Besle JM. 2008. Phospholipids sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk globule membrane are modified by diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56:5226-5236.
- López 2011. Nivel optimo de energía neta en el consumo de alimento y producción de leche en el micro de la lactancia de vacas Holstein. Fersan en confiamento. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias** 2(1):101-116.
- Lyhs U. 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki. p 9 – 10.
- Mackey A., Flores M., Sosa M. 1984. Evaluacion sensorial de los alimentos. digan M., Martinico J. 2005. Brok Biology of microorganism. 1 the ed. Prentice Hall. ISBN 0131443291.
- Maldonado R y Llana L. 2008. Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio de Grardot, estado de Aragua. Venezuela. **Revista Científica Maracaibo**. 18(4): 234-244.
- Martin JB. 2005. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Tesis doctoral. Universidad de Girona. pp 3 – 209.
- Martin PAM. 2008. Estudio Polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. p. 317.
- Martin-Platero AM. 2008. Estudio Polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. p. 317.
- Mazorca M., Marucci P., Sica M., Álvarez E. 2004. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de la Bahía Blanca, Argentina. **Revista de Microbiología** 36:179-181.
- Maubis J. 1989. Whey its biotechnological significantion. **Biotechnology** 2: 814-824.
- Mayo B., Florez AB. 2004. Mohos y levaduras en productos lácteos: funcionales e interacción con otros microorganismos. **Alimentación, Equipos y Tecnología** 188: 51-55.
- McGee H. 2004. On food and cooking. The Science and lore of the kitchen Ed

- McSweeney PLH., Sousa MJ. 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening. A review. **Letter Lait** 80:293-324.
- Medina R., Katz M., Gonzalez S., Oliver G. 2001. Characterization of lactic acid bacteria in-vivo milk and cheese from northwest Argentina. **Journal Food Protection** 64:559-563.
- Mejía J., Chacón Z., Otoniel J. 2007. Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. **Revista Científica FCV-LUZ** 17:175-185.
- Mendoza C y Oyon R. 2002. Estudio comparativo de dos coberturas para queso llanero madurado. **Revista Agronomica (Maracay)** 28(1):1 – 11.
- Michanie S. 2004. *Listeria monocytogenes*: La bacteria emergente de los 80s. Ganados & Carne. Buenos Aires, Argentina. pp 1-8.
- Mishra V., Prasad DN. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* as potential probiotics. **Journal of Food Microbiology** 103:109-115.
- Moellem M., Arieli A., Lehrer H. 2007. Effects of peripartium propylene glycol or fats differing in fatty acid profiles on feed intake, productivity and plasma metabolites in dairy cows. **Journal Dairy Science** 90:3846-3856.
- Monardes H., Banria N. 2008. Recuento de células Somáticas y Mastitis. Artículos técnicos. **Revista Technology Veterinary** ISSN 0718-1817.
- Mora PN., García GA. 2007. Susceptibilidad de bacterias Ácido Lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de Licenciatura de Químico en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. pp 67 – 78.
- Morais J. 2004. Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. pp 67-109.
- Naser SM., Vancanneyt M., Graef E., Devriese L A., Snauwater K., Hoste P., Svec A., Decostere F., Haesebrouck J., Swing. 2005. *Enterococci canintestini* sp, nov, from faecal samples of healthy. **Journal System Evolution Microbiology** 55:2177-2182.
- Navarrete C. 2007. Efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* subs. *paracasei* sobre la maduración de gauda reducido en grasa. Tesis presentada para optar al grado de licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. p 80.
- Neira BE. 2006. Elaboración artesanal de productos lácteos. Universidad de la Sallé. ISBN 19006187. 500:25.
- Nevecherga KI., Shestakov MV., Mazae TV., Shlepnina GT. 2005. Survival rate of pathogenic bacteria and viruses in ground water. **Water Resources** 32:209-214.
- Nikolic M., Teyzic-Vidojevic A., Joucic B., Begovic J., Golic N., Topisirovic L. 2008. Characterization of lactic bacteria isolated from Bukuljaca homemade goat's milk cheese. **Journal Food Microbiology** 122(1-2):162-170.
- Nitzan B., Bruckental I., Shira Z., Meltz E., Halachmi I. 2006. Stochastic Models for

- NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema Producto Leche. Guía para el muestreo de leche y derivados. Métodos rápidos. pp 1 – 6.
- NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema producto-leche-alimentos-lácteos-alimento lácteo regional-queso Cotija Artesanal Maduro-Denominación Especificaciones y Métodos de Pruebas. pp 1 – 17.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en placa. pp 1 – 20.
- NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en alimentos. pp. 1 – 6.
- NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de Organismos Coliformes. Técnica del Número Más Probable. pp 1 -14.
- NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes en placa. pp 1- 21.
- NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. pp 1- 34.
- NOM-115-SSA1-1991. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. pp 1- 6.
- NOM-120-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Practicas de Higiene y Sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas. pp 1- 45.
- NOM-155-SCFI-2003. 2003. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. México. pp 1 - 46.
- Nomanno G., Salandra G., Dambroso A. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Journal Food Microbiology** 1154:229-296.
- Noriega LMR., Ibañez SV., Gonzalez PA., Yamamoto MC., Austillo JD., Gonzalez MV., Riveros RK., Lira FC., Larcoti AS., Perez JG., Thompson LM., Darza MFP., Espinoza MI., Pinochet CV., Uial DAC. 2008. *Listeria monocytogenes*: Infecciones de un aumento de casos de mujeres embarazadas y revisión de la literatura. **Revista Chilena de Infectología** 25(5):342-349.
- O'Sullivan L., Ross RP., Hill C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie** 84:593-604.
- Olivera M., Di-Lorenzo G. 2011. Identificación por PCR de *Brucella canis* en sangre y leche canina. Un reporte de un caso Archivos. **Revista Veterinaria** 3(3):275-298.
- Oliveira M y Brito C. 2006. Brined cheeses and analogues of Latin American origin. In: Tamime, A.Y. Brined Cheeses. (Ed). Blackwell. Singapore. p 324.
- Orbera RT. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. **Revista cubana de Salud Publica** p 30.
- Osawa CL., González L., Ragazzi S. 2007. Determination of hydroperoxides in oils and fats using kits. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 87(9):1659-1666.
- Osorio T, JE, Civo V, HS, Mejia P, LG. 2004. Caracterización textural y física del

- Oslon D., Aryana K. 2008. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* incubation level in yogurt lowers product quality during storage. **LWT**. 40: 911-918.
- Padin GC., Díaz FM. 2009. Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. **Revista de la Sociedad Venezolana en Microbiología** 29 (2): 110-116.
- Pan Y., Breidt F., Kathariou S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environmental. **Journal Applied and Environmental Microbiology** 72(2):771-7717.
- Parra RA. 2010. Bacterias Acido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. **Revista Biotecnología Agropecuaria** 8(1):94-105.
- Patrick RM., Rosenthal K., Pfaller MA. 2009. Cap. 22: *Streptococcus*. En Patrick R. Murray, Microbiología Medica (6^{ta} edición). España El sevier. Mosby. ISBN 978-84-8086-465-7. pp 225-242
- Peña AS. 2007. Flora intestinal, probióticos, prebióticos, simbióticos y alimentos novedosas. **Revista Española de Especialidades de Enfermedades Digestivas** 99:653-658.
- Pérez A. 2001. Determinación de rendimiento y calidad en quesos semimaduros (andino y tilsit) al utilizar la leche de vacas Holstein Friesian, Jersey y Brown swiss. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp 26-35.
- Perry PS. 2004. Quesos: aspectos químicos bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova** 27:293-300.
- Persic D., Jonavic L. 2005. Microbiological study of frees white cheese. **Applied Ecology and Environmental Research** 4(1):129-134.
- Pfaller M. 1999. Molecular epidemiology in the care of patients. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*. 124:1007-1010.
- Piñar G., Sterflinger K. 2009. Microbes and buildings materials *Building Materials*. Chapter 4. ISBN 978-60741-082-9.
- Piñeros G., Téllez I., Cubillos A. 2005. La calidad como factor de competitividad en la cadena láctea. Caso: Cuenca lechera del Alto Chicamocha (Boyacá). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Colombia. pp 23-25.
- Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., Parente E. 2005. Discrimination of comercial caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of *Lactobacillus sp*. **Journal Food Microbiology** 23(5):345-352.
- Poméon T., Cervantes F. 2010. El sector lechero y quesero en México de 1999 a 2009 entre lo global y local. (89): 1-47.
- Poméon T. 2007. El queso Cotija, México. Un producto con marca colectiva queso “Región de Origen” en proceso de una Denominación de Origen. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 11 -28.
- Ponce P. 2009. Composición láctica y sus interrelaciones: Expresión genética, nutricional y metabólica de la lactación en condiciones del trópico. **Revista Salud Animal** 31(2):69-76.

- Ponce P. 2010. Programa integral para la mejora de la producción y calidad de la leche Procal. **Revista de Salud Animal** 32:23-31.
- Pontes SD., Lima-Bitterncourt IC., Chartone-Souza E., Amaral-Nacimiento AM. 2007. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 34:463-473.
- Posadas AS., Loaiza ET., Restrepo JE., Olivera M. 2010. Caracterización del ordeño manual e identificación de puntos críticos de control para la calidad higiénica de la leche en una finca del norte de Antioquia. **Revista Lasallista Investigación** 7(2):35-46.
- Poveda C JM. 2007. Efecto de la utilización de distintos cultivos iniciadores en la proteólisis del queso Manchego. Otros aspectos de la maduración. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. Facultad de Química Analítica y Tecnología de Alimentos. pp 1 – 290.
- Powell JM., Jackson-Smith DB., Satter LD., Bundy LG. 2002. Manejo integral del fósforo en los establecimientos lecheros. **Novedades lácteas** 9:1-12.
- Prillinger H., Schweigkofler W., Breitenbach M., Briza P., Staudacher E., Lopandic K. 1997. Phytopathogenic filamentous (*Ashbya Eremothecium*) with needle-shaped ascospores as new members within the *Sacharomycetacea*. **Yeast** 13:945-960.
- Quiberoni A., Guglielmoh, D M., Reinheimer J A. 2004. Nuevas y Clásicas Bacterias causantes de defectos gasógenos en quesos blandos y semiduros argentinos. **Revista Argentina de lactología** 23:19-31.
- Quiberoni A., Guglielmotti D., Reinheimer J. 2005. Nuevas y clásicas bacterias causantes de defectos gasógenos en quesos blandos. **Revista Argentina de Lactología** 23:19-32.
- Raede U., Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letter Applied Microbiology** 1:17-20.
- Raltray FP. 2002. Secondary cultures. In: Encyclopedia of Dairy Sciences. Roginsky H., Fuquay J., Fox R., F. (Eds). London. Academic Press. pp. 275-281.
- Ramírez CMS. 2005. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras en alimentos. Tesis de Licenciatura en el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Pachuca de Soto, Hidalgo. pp 3 -53.
- Ramos IB., Glindo BA., Bautista MC., Aranda IE., Izquierdo RF. 2011. Aislamiento e identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración del queso crema tropical. **Universidad y Ciencia** 25(2):159-171.
- Ramos IB., Bucio GA., Bautista MC., Aranda IE., Izquierdo RF. 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacteria ácido lácticas para la elaboración de un queso crema tropical. **Universidad y Ciencia** 25:159-171.
- Randazzo CL., Pitino I., Ribbera A., Caggia C. 2010. Pecorino crotones cheese: study of bacterial population and flavor compounds. **Journal Food Microbiology** 27(3) 363-374.
- Randazzo CL., Pitmo I., Reluca S., Scif GO., Caggia C. 2008. Effect of wild strains used as starts culture and adiunct cultures on the volatile compounds of the

- Randazzo CL., Vaughan EE., Caggia C. 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR–DGGE analyses. **Journal of Food Microbiology** 109:1-8.
- Ray B. 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as biopreservatives an overview. In: Food biopreservatives and microbial origin. Ray B., Daeschel M., A. (Eds). Florida. CRC Press, Inc Boca Raton. pp. 177-205.
- Reid L., O'Donnell C., Docuney G. 2006. Recent Technological Advances for the Determination of Food Authenticity **Trends in food science & Technology** 17:344-353.
- Revelli GR., Sbodio OA., Tercero EJ. 2011. Estudio y evolución de la calidad de la leche cruda en tambos de la zona noroeste de Santa Fe, y Sur de Santiago del Estero, Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias** ISSN 1669-231437. 37(2):128-139.
- Robinson RK., Wilbey RA. Scott R. 2002. Fabricación de quesos. Zaragoza Acribia. España editorial Acribia pp 67-80.
- Rodríguez E., Calzada J., Arqes J. Rodríguez J. Núñez M., Medina M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin – producing *Lactococcus lactis* on *Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.0157H.7 in cheese. **Journal Dairy Science** 15:51-57.
- Rodríguez J., Martínez ML., Horn N., Dodd HM. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Journal Food Microbiology** 80:101-116.
- Rodríguez LVM. 2010. Impacto social del consumo de queso procedente de una explotación certificada de buenas prácticas de producción. Tesis de Licenciatura. Universidad de Michoacán de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. pp 23 -67.
- Rodríguez ME., Chacón RZ., Guerrero CB., Otoniel RJ., López CG. 2007. Selección y elaboración de un cultivo iniciador a partir de cepas aisladas de *Enterococcus* aisladas de un queso Venezuela ahumado andino. **Revista Científica FCV-LUZ**. XVII (6):641-646.
- Rojas W. 2005. Evaluación del efecto de diferentes proporciones de leche de vaca y leche de cabra sobre las características físicas y sensoriales de un yogurt batido de fresa. Tesis de grado de licenciatura en Tecnología de alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José Universidad de Costa Rica. p 23.
- Rojas-Herrera R., Narváez-Zapata J A., Zamudio-Maya M., Mena-Martínez M E. 2008. A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. **Molecular Biotechnology** 40:13-17.
- Roostita R., Fleet GH. 1996. The occurrence and growth of yeast in Camembert and Blue veined cheeses. **Journal Food Microbiology** 28:393-404.
- RT. 2007. Reglamento técnico RTCR 407: para quesos N° 34922-MEIC-MAG-S.p 345.
- Ruvalcaba S., Noa M., Pérez G. 2009. Ciencia de la leche. Libro de texto. Universidad de Guadalajara, México.
- Buíz CT, Orozco S, Rodríguez JS, Idarraga J, Oliviera M. 2012. Factores que

- Ryan KS., Ray CG. 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed. Edition) McGraw-Hill. ISBN 0-8385-8529-95.
- Saito H., Tomioka H y Nagashimak. 1987. Protective and therapeutic efficacy of *Lactobacillus casei* against experimental murine infections due to *Mycobacterium fortuitum* complex. **Review Microbiology** 133(1):2843-2851.
- Sambrook J., Russell DW. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Savichtcheva O., Okabe S. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators. Current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research** 40:2463-2476.
- Savijoki K., Inginer H., Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology** 71(4):394 -406.
- Secretaría de Salud 1989. Ley General de Salud. México, 5^a edición, Editorial Porrúa S. A.
- Serna L., Rodríguez A. 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. **Ciencia y Tecnología de Alimentos** 5(19):54-65.
- Serna L., Rodríguez, A. 2007. Lactic Acid Fermentative Production using Waste from the Harvest of Green Sugar Cane as a Substrate. **Interciencia** 32(005): 328-332.
- Settanni L., Franciosi E., Cavazza A., Cocconcelli PS y Poznanski E. 2011. Extension of Tosela cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. **Journal Food Microbiology** 28(5):883-890.
- Sihufe G., Zorrilla S y Rubiolo A. 2003. Casein degradation of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. **Journal Food Chemistry and Toxicology** 68(1):117-123.
- Sinigaglia M., Bevilacqua A., Corbo RM., Pati S., Del Nobile AM. 2008. Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese. **Journal Dairy** 18(6):624-630.
- Stone H., Sidel JL., Oliver S., Woolsey A., Singleton RC. 1974. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology** 28:24-34.
- Strom K., Sjogren J., Broberg A., Schnurer J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides Cyclo (L-Phe-L-Pro) and Cyclo (L-Phetrans- 4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied Environmental Microbiology** 68:4322-4327.
- Suarez MH., Francisco A., Beirao L. 2008. Influencia de bacterias producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de cachama piarasctus brachypomus por colossoma macroponum empacado al vacío. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica** 15(19):32-40.
- Taborda IJE. 2011. Acompañamiento en el mejoramiento y calidad de la leche y en el proceso de certificación de hatos lecheros proveedores de la cooperativa Colanta. Con base al decreto 616 del 2006. Tesis de Licenciatura. Corporación Universitaria Lasallista Facultad de Ciencias Administrativas y Agronegocios.

- Resúmenes de Conferencias y Mesas Redondas. Rafaela, Santa Fe, Argentina. 57-60.
- Teczic-Vidojevic., Vukasinovic M., Veljovic K, Ostojic M., Topisivovic L. 2007. Characterization of microflora in home-made semi-hard-white cheese. **Journal Food Microbiology** 114:36-42.
- Tempel TV., Jakobsen M. 1998. Yeast associated with Danablu. **Journal Dairy Science** 8:25-31.
- Tercero S C. 2005. Desverado de coágulos de leche formados por enzima coagulante y glucagon. **Ciencia y Tecnología Alimentaria** 5(1):35-41
- Teuber M., Gris A. 2006. The genus *Lactococcus*. Prokaryotes, 3rd Ed. Ed. Springer. 4:205-228.
- Thompson JD., Higgins DG., Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22:4673-4680.
- Topisirovic L., Kojic M., Fira D., Golic N., Strahimic I., Lozo J. 2006. Potential of acid lactic bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **Journal of Food Microbiology** 112:230-325.
- Tunger A., Aydemir S., Ulver S., Cilli. 2004. In vitro activity of linezolid quinupristin/dalfopristin against Gram positive cocci. **Indiana Journal Medicine Research** 12(6):546-552.
- Vargas CA., Fernández A M., Ramírez VB., Herrera H G., Martínez C D. 2007. Ganadería lechera familiar y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuac en el estado de Tlaxcala, Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias** 45(1):61 – 76.
- USDA, 2005. Food CGMP- A focus on food Safety. Food CMGP Modernization working group Center for Food Safety and Applied Nutrition U.S. Food Drug Administration.
- Valvuená E., Castro G., Lima K., Acosta W., Briñez W., Tovar A. 2005. Calidad Microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizadas distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la leche. pp 23 -34.
- Veljovic K., Terzic-Vidojevic M., Vukasinovic I., Stralinies J., Begovic J., Lozo M., Ostojic L. Topisirovic. 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. **Journal of Applied Microbiology** 103:2142-2152.
- Vermeiren L., Devlieghere F., Debvere J. 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Journal Food Additives and Contaminants**. 19:163-171.
- Versalovic J., Lupski R. 2002. Molecular detection and genotyping of pathogens; more accurate and rapid answers. **Trends in Microbiology** 31:205-219.
- Vilar M., Rodríguez O J., Sanjuan M., Diéguez F., Varela M., Yus M. 2011. Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality. **Trends Journal Food Science (UK)** 20:1-9.

- Villegas de Gante A. 2004. Tecnología Quesera. Editorial Trillas. México.
- Villegas A., Santos M A., Hernández A. 2009. “Los quesos Mexicanos genuinos: Contribución a su rescate a través de la Vinculación. Universidad Productora” Claridades Agropecuarias. N 191PP29-35.
- Volloch A. 2010. Buenas Prácticas Agropecuarias para la producción de leche: Sus objetivos y relación con los códigos de higiene. Revista de Salud Animal. ISSN 0253-570X.
- Walstra P., Geurts TJ., Normen A., Jellema A., Van Boekel MAJS. 2001. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Editorial Acriba S.A. España. p 730.
- Wayne WD. 1990. Bioestadística, Noeriga eds. pp 305.
- WHO/FAO, 2008. Codex Alimentarius. Animal food production. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Witting E. 1982. Evaluación sensorial, una metodología actual para tecnología de Alimentos. Gráficos USACH. Santiago, Chile.
- Wilches F AM. 2005. Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (EPS). Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. ISSN 0120-4211. 3 (2):12-18.
- Yalcin HT., Ucas FB. 2009. Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish White cheeses. **Annals of Microbiology** 59(3):477-483.
- Zago M., Fornasari M E., Carminati D., Burns P., Suarez V., Vinderola G., Reinheimer J., Giraffa G. 2008. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from sheeps. **Journal Food Microbiology** 30:123(3):212-219.
- Zaidi N., Konstantinou K., Zerous M. 2003. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 127: 1098-1105.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

- Bruno J., Hayes M R., Lin Y. 2009. Foro Internacional Electrónico. Producción, Aplicación y Acción de los Cultivos Lácteos. Primera parte. Disponible en: www.Fepale.com junio 25 de 2009.
- CFR-21-110.1-110-110. Prácticas de Buena Manufactura, Manufactura, Empaque o Almacenaje de los Alimentos para seres humanos. pp 2-14. <http://www.cfsan.fda.gov/lrd/scfr119.html>.
- FAO. 2007. Codex Alimentarius, Directrices Sobre la Aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Salmonella* sp en los Alimentos. (Disponible en: <http://www.codezalimentarius.net/search/advanced.do?lang=es>, consultado el 04/05/2009)

- Salvador A., Abner J. 2005. Mastitis en ganado bovino. Consultado en: <http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/24jul04/Mastitis%20en20%Ganado%Bovino.doc>.
- Serrano G. 2004. Sistema de precios, calidad y funcionamiento de los mercados lácteos en Colombia. Disponible en: http://www.agrocadenas.gov.co/eventos/ponencias/Presentacion_CNL.pps
- SIAP 2008. Boletín de leche. México, octubre–diciembre, SIAP–SAGARPA. [En línea] Consultado el 15 de febrero del 2009. http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Dinámica/Estadística/E_Derivada/ar_regbollech.html Publica
- Trujillo J. 2002. Lineamientos para el reconocimiento de las buenas prácticas en producción de leche caprina. Consultado en: http://64.233.187.104/search?q=cache:ILqy5ULsQi8J:www.senasica.sagarpa.gob.mx/web/propuestas_web/221204/inocuidad_agroalimentaria/Lineamientos.
- Urdaneta J. 2005. ¿Como obtener leche de calidad en estos tiempos? Disponible en: <http://www.pcca.com.ve./vb/articulos/vb67vb68>.
- Urquilla A. 2005. Reported de Inteligencia Competitive. FDA. In: Issues Health Advisory about certain soft cheeses made from raw milk 14. Disponible en: <http://www.conamype.gob.sv/noticias/29060> 5 pdfUrquilla%2C%20A%202005.
- USAID, SESA, 2010. United State Agricultural International Development y Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria. Guía sobre Buenas Prácticas Pecuarias. Disponible en: <http://www.iica.int/Esp/regiones/Central/Honduras>

ANEXO I

Cuestionario a productores de queso Cotija

ENCUESTA A PRODUCTORES QUESO COTIJA ARTESANAL MADURADO

Fecha: _____

Nombre del productor: _____

Domicilio: _____

Localidad y Municipio: _____

I. PERSONAL

1. Número de personas que participan en los procesos de producción y obtención de leche, y de fabricación del queso Cotija artesanal madurado: _____
2. ¿Recibe atención médica? _____ ¿De qué tipo? _____
3. ¿Conoce su estado de salud actual? _____
4. ¿El personal conoce y aplica las buenas prácticas de higiene? _____
¿Cuáles? _____

II. INSTALACIONES

5. ¿Su unidad de producción cuenta con las siguientes áreas de forma independiente?
 - Corral de manejo: _____
 - Lugar de ordeño: _____
 - Cuarto para la elaboración del queso: _____
 - Cuarto para la elaboración del queso: _____
 - Servicios sanitarios para el personal: _____
6. ¿Dichos lugares, con excepción del corral de manejo, se encuentran protegidos de la intemperie y cuenta con piso estabilizado (no de tierra)?

7. ¿Cuenta con servicio de electricidad? _____
8. ¿Cuenta con agua potable y en cantidad suficiente? _____
¿Cuál es la fuente? _____
9. ¿Almacena agua potable? _____ Forma: _____
10. ¿Las diferentes áreas del establo y lugares de fabricación y maduración del queso se mantienen limpias y ordenadas? _____
11. ¿Cuenta con control de plagas o fauna nociva? _____
¿Cómo? _____

III. GANADO

13. Raza del ganado: _____
14. ¿Están identificados los animales? _____
¿De qué manera? _____
15. ¿Cuenta con un programa de vacunación y desparasitación? _____
16. ¿Su ganado ha tenido problemas reproductivos?
a) Poca fertilidad b) Exudado vaginal prolongado c) Aborto d) Orquitis e) Ninguno
17. ¿Su ganado ha tenido problemas respiratorios?
a) Tos seca por mucho tiempo b) Pérdida de peso (muy flacas) c) Ninguno}
18. ¿Participa en el control oficial para el control de brucella y tuberculosis? _____
19. ¿Cuándo se realizó el último estudio para el control de brucella y tuberculosis?
a) Hace 5 años b) Hace 3 años c) Hace 2 años d) Hace un año e) Nunca
20. ¿Cuenta con certificado de hato libre de brucella y tuberculosis?
21. ¿El ganado tiene problemas de mastitis? ¿Con que frecuencia?
¿Cómo lo controla?.
22. ¿Separa la leche de los animales tratados con medicamentos respetando los tiempos establecidos por el fabricante y/o indicados en la etiqueta del medicamento?_____
23. ¿De qué forma monitorea que la leche se encuentra libre de antimicrobianos?

24. ¿Cuenta con la asistencia de un médico veterinario, público o privado?_____

IV. EQUIPO

25. ¿Cuenta con equipo de ordeño mecánico? _____
26. ¿Cuenta con servicio de mantenimiento de equipo de ordeño?

27. ¿Qué tipo de sustancias utiliza para la desinfección de equipo, superficies y utensilios?

28. ¿Con que frecuencia desinfecta las superficies, equipo y utensilios?
29. ¿Los materiales y utensilios usados para obtener la leche y elaborar el queso son de uso exclusivo para éstas tareas?

V. PROCESO

30. Tipo de ordeño: _____

31. ¿Limpia y seca los pezones antes del ordeño? _____

¿Cómo? _____

32. ¿Realiza el presello y sellado de los cuartos de los animales? _____

33. ¿Tiempo transcurrido entre la obtención de leche y el inicio de elaboración del queso?

34. Tipo de sal usada en la elaboración del queso: _____

35. Tipo de cuajo que emplea para la elaboración del queso: _____

36. ¿Lleva algún control en el proceso? _____ ¿Cuál? _____

37. Tiempo de maduración del queso: _____

38. ¿Identifica su producto? _____ ¿Cómo? _____

Anexo II. Productos obtenidos

De la presente tesis doctoral se obtuvieron los siguientes productos:

- **Revista con arbitraje no JCR:**

Aplicación de Buenas Prácticas de Higiene para la leche cruda entera con la que se elabora el queso Cotija. Revista: Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Volumen 27, Numero 2, Año: 2010

- **Revista indexada JCR:**

Characterization of Microbial Traits Involved with the Elaboration of the Cotija Cheese. Food Sci. Biotechnology 4:997-1003. 2011.

- **Convenios:**

Acreditación de las pruebas correspondientes a la NMX-F-735-COFOCALEC-2009. Año: 2010.

Determinación de la inocuidad microbiana del queso cotija artesanal madurado que se produce en la zona geográfica de origen. Año: 2011.

- **Artículos en proceso:**

Elaboración de un cultivo iniciador a partir de cepas aisladas del queso cotija.

Residualidad de antimicrobianos en leche cruda.