

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas
Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y
FISICOQUÍMICA DEL QUESO DE OJOS NEGROS, B.C.
MÉXICO CON RESPECTO A LA MADURACIÓN EN DOS
PERIODOS ESTACIONALES**

T E S I S
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA
LAURA ELENA SILVA PAZ

DIRECTOR
DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

Mexicali, Baja California, México

Junio, 2019

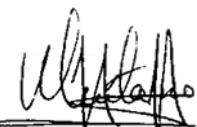
La presente tesis “**Caracterización Microbiológica y Fisicoquímica del queso de Ojos Negros, B.C. México con respecto a la maduración en dos periodos estacionales**” realizada por **Laura Elena Silva Paz** dirigido por el **Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité Particular



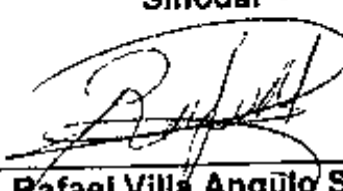
Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Director de Tesis



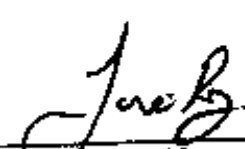
Dr. Martin Francisco Montaña Gómez
Secretario



Dr. Gilberto López Valencia
Sinodal



Dr. Rafael Villa Angulo Sinodal
Sinodal



Dr. José Carlóman Herrera Ramírez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Con esta tesis Doctoral se cierra una etapa importante en mi vida como estudiante de postgrado llena de alegrías, dificultades, pero en definitiva llena de un aprendizaje que me aportó una experiencia tremendamente positiva, que me hace sentir orgullosa del esfuerzo y trabajos realizados; sobre todo brindándome la oportunidad de incorporarme al ámbito de la investigación, buscando su contribución a la generación de soluciones haciendo uso de los recursos más importantes: el conocimiento, el trabajo en equipo y el desarrollo humano.

Este trabajo se origina de las experiencias vividas como extensionista rural en la región de Ojos Negros. Del cual le agradezco al M.C. Ramón Valenzuela Padilla, quien me impulsó a decidirme a colaborar en esta modalidad de proyectos, gracias por su apoyo, colaboración y amistad. De la misma manera agradecer a los extensionistas: MC, Luz del Carmen Gastelúm, por compartir experiencias e información de gran valor con respecto a los queseros de Ojos Negros, y al Dr. Alejandro Martínez Partida por sus consejos, infinitamente agradecida.

Muy agradecida con las unidades de producción de queso de la región de Ojos Negros que me abrieron sus puertas facilitándome el desarrollo de este trabajo, y de quienes me quedo con buenas experiencias en la elaboración y gusto por los quesos, gracias.

De la presente tesis, un agradecimiento a mi comité particular del Doctorado, quienes son los auténticos responsables de mi formación científica y que través de su paciencia y sinceridad permitieron finalizar esta tarea. Sobre todo agradecer por su dedicación y tiempo brindado a los Doctores Gerardo Medina Basulto y Gilberto López Valencia quienes fueron mis maestros y guías cercanamente al conocimiento, aportando comentarios certeros y necesarios, y de quienes aprendí el complejo desarrollo de los escritos científicos, y a no desmotivarme en ello, infinitamente agradecida.

A mis compañeros Cesar Alejandro Alday, Ana Laura González, Fernando Inzunza, Karen Gutiérrez, Gerardo Felipe que transitaron en mi ayuda, cuyas conversaciones me acompañaron durante estos años, gracias.

A la Dra. Alejandra López Soto, quien desinteresadamente me brindó su apoyo en la realización de los análisis de calidad en muestras de queso, gracias

No menos importante es la Universidad Autónoma de Baja California, a la cual le agradezco el apoyo brindado a través del Sindicato Único de Trabajadores Universitarios, al Laboratorio de Biología Molecular y Laboratorio de Calidad de Leche del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias por brindar instalaciones y equipamiento.

DEDICATORIA

A mi compañero en la vida, que siempre está ahí, apoyándome. Quiero decirte que con esta tesis, hemos descubierto algo nuevo con ella, y por esto tenerte a mi lado al final de esta etapa es aún más especial. Gracias por los consejos, escucharme en los momentos buenos, malos y confiar en mis decisiones, no sabes lo importante que has sido para llegar hasta aquí.

A mis padres: Mamá me ha visto crecer, doy gracias por tu paciencia y comprensión para salir adelante y culminar esta etapa más en mi vida, mi mayor gratitud. Papá† me dejaste un buen ejemplo de superación, de constancia, de generosidad, de un hombre cabal y honrado, gracias por haberme guiado mis pasos desde el cielo, seguro te hubiera gustado trabajar en este proyecto.

A mis hijas Marianela, Ana Laura y Fátima quienes vivieron de cerca este trabajo, gracias por su comprensión y ser parte de la inspiración que me hace ser mejor persona, quiero que sepan que este trabajo es de ustedes.

A mis hermanas Julia y Natalia por la motivación que cada una me ha brindado, y con quienes compartí anécdotas acerca del queso.

Gracias a toda mi familia y a amigos que muy probablemente estoy obviando, puedo decirles que fueron parte de mi motivación, sobre todo a los que me brindaron su ayuda, consejos y hacer menos difícil este trayecto.

Finalmente puedo decir que los sueños existen, si los hacemos realidad, y se disfrutan más cuando generan beneficios.

CONTENIDO

RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA Y BIBLIOGRAFIA CITADA	4
2.1 Antecedentes sobre la producción de queso en México.....	5
2.1.1 Calidad de una buena la leche para queso.....	5
2.1.1.1 Características fisicoquímicas de la leche.....	7
2.1.1.2 Características microbiológicas de la leche.....	9
2.1.1.3 Inocuidad en la elaboración de quesos.....	12
2.2 Maduración del queso.....	14
2.2.1 Clasificación de los quesos madurados.....	16
2.2.2 Queso de Ojos Negros en B.C.....	21
2.2.2.1 Descripción del queso del Ojos Negros.....	23
2.2.2.2 Descripción tecnológica del queso de Ojos Negros..	25
2.3 Microorganismos en los quesos.....	31
2.3.1 Bacterias contaminantes.....	33
2.3.2 Bacterias acido lácticas (BAL)	34
2.3.3 Consorcio de BAL en la industria quesera.....	37
2.4 Bibliografía Citada.....	43
CAPITULO 3. ARTICULOS CORRESPONDIENTES.....	54
3.1 Caracterización de la leche y queso artesanal de la región de Ojos Negros Baja California, México.....	55
3.2 Identificación de bacterias lácticas aisladas del queso artesanal de Ojos Negros por secuenciación del gen bacteriano ARNr 16S.	68
CAPITULO 4. CONCLUSIONES GENERALES.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de unidades de producción de leche y queso en diferentes localidades de la región de Ojos Negros, municipio de Baja Ensenada Baja California México.....	21
Figura 2. Secuencia genérica del proceso de elaboración del queso prensado de ojos negros.....	27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Referencia nacional de la calidad fisicoquímica de la leche cruda.....	8
Cuadro 2.	Calidad fisicoquímica de la leche cruda para la elaboración de algunos Quesos Mexicanos en diferentes épocas del año.....	10
Cuadro 3.	Especificaciones sanitarias para leche cruda de vaca contempladas en normas.....	11
Cuadro 4.	Condiciones de maduración de diversos tipos de quesos.....	16
Cuadro 5.	Condiciones ambientales de maduración de los quesos reportados en referencias.....	17
Cuadro 6.	Tiempo de maduración mínima para cada tipo de queso.....	19
Cuadro 7.	Denominación del queso según sus características de consistencia y maduración.....	20
Cuadro 8.	Clasificación del contenido de grasa.....	20
Cuadro 9.	Especificaciones sanitarias normativas de referencia microbiológica para productos fermentados y queso en México..	32
Cuadro10.	Características importantes de los géneros de bacterias ácido lácticas (BAL) encontradas en quesos tipo artesanales.....	36

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la calidad microbiológica, física y química de la leche cruda de vaca y del queso en 22 unidades de producción de la región de Ojos Negros. Posteriormente en tres de estas unidades, se logró identificar 43 aislados de bacterias ácido lácticas (BAL) en diferentes tiempos de maduración en dos estaciones del año. Se tomaron muestras de queso y leche de las unidades de producción para realizar análisis de proteína, grasas y lactosa utilizando un analizador LACTOSCAN-S. Los resultados de la leche mostraron un contenido de proteína (33,11 g/l) y grasa (39,89 g/l) dentro de los parámetros de la normatividad. Para la calidad microbiológica de la leche, los resultados del recuento de mesófilos aeróbicos mostraron un cumplimiento del 64% con las regulaciones; sin embargo, el mismo conteo de mesófilos aeróbicos en las muestras de queso resultó en solo el 4% cumpliendo con las regulaciones. No hubo detección de *Salmonella spp* o *Listeria monocytogenes* en cualquiera de las muestras de leche o de queso probadas. En cuanto a la identificación de los aislados de BAL, esta fue realizada por amplificación del gen bacteriano ARNr 16S por PCR y secuenciación. Las especies *Enterococcus faecalis* (27.9%) y *Lactobacillus plantarum* (32.6%) se encontraron durante todo el periodo de maduración en los quesos en invierno, en tanto en verano solo *L. plantarum* prevaleció durante todo el proceso de maduración. *Enterococcus faecium* (11.7%) y *Lactococcus lactis subsp. Lactis* (14%) perduro en ambas estaciones en diferentes tiempos de maduración. *Weisella paramesenteroides* (2.3%) se encontró solo durante el periodo invernal, en tanto en verano se encontraron *Lactobacillus paracasei* (2.3%), *Lactobacillus rhamnosus* (2.3%), *L. lactis subsp. Lactis bv. diacetylactis* (2.3%) y *Weisella viridescens* (11%). Las buenas prácticas de higiene deben aplicarse estrictamente durante la obtención de la leche y postproducción en queso, especialmente con el objetivo de mejorar indicadores fuera de norma y apegarse a una estandarización de los procesos de maduración del queso para lograr uniformidad en los aspectos organolépticos y de seguridad entre los diferentes productores todo el año, para asegurar su subsistencia y proteger el patrimonio cultural de este queso.

ABSTRACT

In this study, the microbiological, physical and chemical quality of raw cow's milk and cheese was evaluated in 22 artisanal cheese dairies located in Ojos Negros. Subsequently, in three of these dairies, 43 isolates of lactic acid bacteria (LAB) were identified in different day's cheese maturation in two seasons of the year. Cheese and milk samples were taken from the production units to perform protein, fat and lactose analyzes using a LACTOSCAN-S analyzer. The results of the milk showed a content of protein (33.11 g / l) and fat (39.89 g / l) within the parameters of the regulations. For the microbiological quality of the milk, the results of the aerobic mesophil count showed a 64% compliance with the regulations; however, the same count of aerobic mesophiles in the cheese samples resulted in only 4% complying with the regulations. There was no detection of *Salmonella spp.* or *Listeria monocytogenes* in any of the samples of milk or cheese tested. Regarding the identification of the BAL isolates, this was carried out by amplification of the 16S rRNA bacterial gene by PCR and sequencing. The species *Enterococcus faecalis* (27.9%) and *Lactobacillus plantarum* (32.6%) were found throughout the maturation period in the cheeses in winter, while in summer only *L. plantarum* prevailed during the whole maturation process. *Enterococcus faecium* (11.7%) and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (14%) persisted in both seasons at different maturation times. *Weisella paramesenteroides* (2.3%) was found only during the winter period, while in summer *Lactobacillus paracasei* (2.3%), *Lactobacillus rhamnosus* (2.3%), *L. lactis* subsp. *Lactis* bv. *Diacetylactis* (2.3%) and *Weisella viridescens* (11%). Good manufacturing hygiene practices and manufacturing procedures at artisanal cheese dairies should be strictly applied during the production of milk and post-production in cheese, especially with the aim of improving non-standard indicators and adhering to a standardization of cheese ripening processes to achieve uniformity in the organoleptic aspects and security among the different producers throughout the year, to ensure their subsistence and protect the cultural heritage of this cheese.

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

En la delegación Real del Castillo en Baja California, se ubica la región de Ojos Negros un poblado que produce cerca de 30 toneladas mensuales de un queso prensado llamado queso de Ojos Negros, un producto muy aceptado, entre consumidores nacionales y extranjeros por sus características sensoriales que degustan a través de la ruta del vino un pasaje turístico que promueve el gobierno del Estado de Baja California para acercarlos al consumidor, permitiéndoles ser localizados por la unidad de producción que los elabora. (Gastelúm et al., 2013). Los quesos de esta región son desarrollados a menor escala por pequeños productores, usando leche de vaca sin pasteurizar y técnicas tradicionales que incluye una acidificación natural por bacterias nativas presentes en la leche aún desconocidas, y la acción de un cuajo comercial, posterior desuerado, salado, prensado y oreado (Gastelúm et al., 2013; Silva et al., 2013). La leche entera como materia prima es un medio nutritivo óptimo, en el cual residen microorganismos peligrosos que representan riesgos a la salud pública; por lo que su seguridad reside en procesos que garanticen su inocuidad desde la obtención hasta su transformación en queso. Siendo las recomendaciones de la Federal Drugs Administration por sus siglas en Estados Unidos de América (FDA., 2012), y la Secretaria de Salud en México, en su NOM-243-SSA1-2010, los señalamientos en inocuidad a seguir para elaborar quesos a partir de leche cruda, estableciendo que estos, deban permanecer en maduración por un periodo de 60 días o más como tecnología para reducir el riesgo de microorganismos patógenos. Regla que se basa en la suposición de que los microorganismos patógenos incluso inicialmente presentes en la leche y en la cuajada a mayor periodo de maduración, se inhiben, debido a la competencia a la que se somete el queso en ambientes con pH bajo, pérdida de humedad (agua), niveles altos de sal, tiempo y cantidad de ácido láctico producido por bacterias ácido lácticas (BAL) (Reyne et al., 2011; Nada et al., 2012; Brooks et al., 2012; González et al., 2016; Yohan et al., 2016; Ispirili et al., 2017). Diversos estudios de BAL en quesos se han realizado con fines de conocer su participan sobre las características de sabor y textura que requieren los diferentes tipo queso y su contribución funcional a prolongar su vida

en anaquel y sobretodo dar seguridad a los alimentos; siendo estas reconocidas en la leche de vaca utilizada en la industria quesera y artesanal por tradición en países como España, Inglaterra y México entre otros (Sánchez et al., 2006; Nieto et al 2010; Aydemir et al., 2015; Mazzeo et al., 2009; Reyne et al., 2011; Gamboa et al., 2012; González y Franco, 2015; Chombo et al., 2016; Torres et al., 2006; Fortino et al., 2017).

En un intento de suponer estándares de calidad para una comercialización más segura para los queseros de Ojos Negros, este estudio tiene como objetivo caracterizar la calidad fisicoquímica, microbiológica e identificación de las principales bacterias ácido láctico que se desarrollan en el queso tradicional Real del Castillo Ojos Negros, en las diferentes etapas de maduración en dos periodos estacionales.

2. REVISIÓN DE LITERATURA Y BIBLIOGRAFIA CITADA

2.1 Antecedentes sobre la producción de queso en México

En México se estima que el 25% del total de la producción de queso la establecen los medianos y pequeños productores, constituyendo una de las principales fuentes de ingresos a pesar de la baja rentabilidad de su actividad (Alejo et al., 2015; González et al., 2016).

Sin embargo, la información estadística ofrecida por la SAGARPA en el periodo de enero a agosto 2017, reporto un volumen por arriba de 763 mil toneladas de leche de los cuales el 34.6% de la producción se destinó a la industria de quesos; con una obtención por arriba del 13% en queso tipo panela y fresco, contra el 9% para diferentes tipos de queso de pasta dura, semidura, madurados y prensados como son los tipos Chihuahua, Manchego, Amarillo, Oaxaca y otros. En Baja California las cifras de leche obtenida en este mismo periodo alcanzaron una producción de 234, 086,542 litros de leche, de los cuales 15% se destinaron a la elaboración de queso (SIAP, 2017). Por otro lado, desafortunadamente la cantidad que reportan los prestadores de servicios profesionales activos en la región de Baja California, señalan un mercado informal, donde el 60% de la leche que producen los pequeños productores se destina a la industria lechera; mientras que el 40% de la producción en traspatio no se registra y se vende para hacer queso artesanal; obedeciendo a una mejor fluidez en su paga (Martínez, 2014).

2.1.1 Calidad de una buena leche para queso

Los brotes de enfermedades de transmisión alimentaria han tenido consecuencias sanitarias y económicas importantes en países tanto desarrollados como en desarrollo, donde uno de los alimentos naturales más preciados y básicos para el consumo humano es la leche. Cuando estos no son obtenidos en las debidas condiciones de higiene durante la ordeña, almacenamiento y transporte pueden ser vulnerables a la contaminación por la presencia de microorganismos indicadores de alteración, de higiene y patógenos, merced a su

alto contenido en agua, su pH cercano a la neutralidad y su gran variedad de nutrientes, que en conjunto se relacionan como medios de cultivo y representar riesgos para la salud.

Sin embargo en la actualidad la materia prima esencial en la elaboración de quesos tradicionales en México, sin duda es la "leche cruda", prohibir su uso es fomentar su desaparición, como lo declaran Villegas et al., (2016) quienes sostienen que la leche cruda no es mala por sí misma cuando proviene de animales sanos, y es posible garantizar la inocuidad de los quesos con opciones diferentes a la pasteurización, como son la fermentación láctica, el empleo de agua caliente en el proceso y la maduración. Por otra parte Murphy et al. (2016) señalan que una leche para consumo debe poseer una calidad adecuada basada en el conocimiento de su composición (p. ej., proteína y niveles de grasa dentro de la norma); (2) libre de sabores desagradables y olores; (3) libre de residuos de drogas detectables, agregado agua u otros adulterantes; (4) tener bajas cantidades de bacterias totales y (5) tener bajo conteo de células somáticas (SCC). Los mismos autores señalan que por lo general el primer factor que impacta en la productividad del queso, es la calidad sanitaria de la leche como materia prima, donde recuentos de bacterias totales por encima de $6 \log_{10}$ UFC / mL, y/o niveles por arriba de 400,000 de células somáticas / mL en leche cruda, son suficientes para impactar en su seguridad y causar defectos en la textura y sabor en el queso u otros productos (Murphy et al., 2016). Al respecto Juárez et al (2016) mencionan que la producción de leche en México se caracteriza por su heterogeneidad a nivel estructural, tecnológico y de manejo, ocasionando que existan diferencias muy marcadas entre unidades de producción de leche, incluso en una misma zona, causando variabilidad en sus características de calidad. Sin embargo, señalan que conocer las características fisicoquímicas y microbiológicas de la leche les permitirá a los productores tomar decisiones y reorientar medidas preventivas o correctivas a fin de mejorar la calidad en sus sistemas lecheros, lo que significa que deben realizar pruebas a la leche y comparar sus resultados con normas de referencia, para mayor seguridad.

2.1.1.1. Características fisicoquímicas de la leche: la calidad de la leche cruda como materia prima en la elaboración de quesos no está estudiada ampliamente en México; se conoce un tanto la de la leche de los sistemas intensivos, sobre todo, leche pasteurizada y UHT. Sin embargo, se han dado a conocer datos sobre leches crudas de los sistemas familiar (de traspatio) y extensivo, con doble propósito que fundamentalmente abastecen a la quesería tradicional; en los cuales se ha explorado su calidad fisicoquímica (que incluye la composicional) y la calidad microbiológica dentro de las especificaciones normativas en México, como lo hacen saber Álvarez et al. (2012), Silva et al. (2014), Villegas et al. (2016).

La leche cruda como alimento contiene cuatro componentes básicos que confieren aptitud para satisfacer las necesidades implícitas para su uso y consumo: agua (87.3%), grasa (38%), proteína (47%), lactosa (47%) (Noa y Ruvalcaba., 2011). Obviamente, la composición de la leche, especialmente su contenido de proteínas y grasa, tienen un papel fundamental en la definición del rendimiento (Tornadijo et al., 1998). Aproximadamente el 60% de estos constituyentes lácteos varían por diversos factores, como son no nutricionales donde la raza lechera y su genética (Pardo-Suizo, Jersey, Holstein y de cruza entre ganado Cebú y ganado Europeo) son hoy uno de los factores más relevantes a considerar en la composición de la leche, puesto que la grasa y proteína son caracteres genéticos con alta heredabilidad; por otra parte el estado de lactación que no solo afecta la producción de leche sino también su composición con disminución en los porcentajes de grasa y proteína; el estado de la salud de la ubre (mastitis y RCS) es otro factor que incurre en cambios en la composición de la proteína en la leche, modificando los valores de lactosa y pH. El 40% de los constituyentes restantes pueden variar por factores nutricionales y ambientales como alimentación del ganado (disponibilidad y calidad de las pasturas), influencia estacional (época de lluvia contra época secas) y estación del año (invierno a primavera y verano a otoño) entre otros. (Noa y Ruvalcaba., 2011). Para el ganadero estos factores son importantes para su economía y rendimiento lechero, sin embargo, otros aspectos externos a la producción impactan en la

aptitud de la leche para la elaboración de queso, que sin duda marca la diferencia entre las características de la leche entre ganaderos, como es el cumplimiento aceptable de las condiciones de infraestructura durante las prácticas de ordeña, ya sean de forma rusticas o tecnológicas. Por esto mismo, es requerido proteger las condiciones que favorezcan a la comercialización de la leche sin contaminación y de mejor calidad nutrimental; siendo los lecheros los protagonistas en el cumplimiento de los nutrientes esenciales para la alimentación, sin representar riesgos para la salud pública por presentar microorganismos indeseables. Es así que, en México para conocer y estimar la composición química y valores mínimos de calidad para una leche cruda de vaca, los lecheros debe cumplir con los estándares de la norma mexicana NMX-700-COFOCALEC-2012, (Cuadro 1).

Cuadro 1.
Referencia nacional de la calidad fisicoquímica de la leche cruda

Indicador	*Referencia nacional g/L
Proteína g/L	Clase A deseable ≥ 31 Clase B mínimo 30 -30.9 Clase C mínimo 28 a 28.9
Grasa g/L	Clase A deseable $\geq 32^a$ Clase B mínimo 31 Clase C mínimo 30
Lactosa g/L	43 a 50
Ácido láctico g/L	1.3 a 1.6
Densidad g/L	1,029 min
Crioscopia °C	-0.530 a -0.560

*NMX-F-700-COFOCALEC-2012

En ese sentido, en el cuadro 2 se presenta información sobre la evaluación en la composición de la calidad de la leche de sistemas extensivo y familiar, utilizadas en la elaboración de cinco tipos de quesos tradicionales en México: el queso crema de Chiapas, el queso bola de Ocosingo, el queso adobera de Jalisco, el queso asadero de Aguascalientes reportados por Villegas et al., (2016) y del queso prensado de Ojos Negros Real del Castillo por Silva et al, (2014). A través de este cuadro se mencionan las cifras correspondientes a la composición

fisicoquímica de la leche cruda utilizada para la elaboración de los Quesos Mexicanos antes mencionados, en diferentes épocas del año. Las diferencias más significativas entre las leches, desde el punto de vista sanitario, están dadas por sus contenidos en acidez ácido láctico, que son valores mucho más elevados que la normativa correspondiente, obviamente dados probablemente por la naturaleza en su tecnología de obtención y conservación de la leche.

Por otra parte es interesante mencionar lo que Álvarez et al., (2012), Villegas et al., (2016), Murphy et al., (2016), exponen sobre la importancia de conocer los valores de los componentes en la leche como materia prima en la elaboración de queso, como son proteína, grasa y sólidos totales, los cuales como atributos contribuyen en el rendimiento del producto final, y que por su alto contenido en estas propiedades influirán no solo en el sabor del queso, sino además en su textura a través de su maduración.

2.1.1.2 Características microbiológicas de la leche: en el cuadro 3 se describen los valores de referencia que establece el Sistema Producto Leche en México que por sus siglas COFOCALEC significan Consejo para el fomento de la calidad de la leche y que por su norma NMX-F-700-COFOCALEC-2012, promueven la calidad de la Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba, especificando primordialmente el conteo de bacterias mesófilas aerobias consideradas como microorganismos indicadores de alteraciones. Así como los indicadores de higiene que la Secretaría de Salud con NOM-243-SSA-2010 en Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias, constituyen el control de coliformes totales y microorganismos patógenos como *Samonella spp* y *Listeria monocytogenes*.

Cuadro 2
Calidad fisicoquímica de la leche cruda para la elaboración de algunos Quesos Mexicanos en diferentes épocas del año

Nombre del queso	Época	MG g/L	Proteína g/L	SNG g/L	Densidad g/mL	pH	Acidez g/L	Referencias
Queso crema de Chiapas	Lluvias	34.56±5.85	34.16±1.51	88.28±2.49	1.030±0.002	--	1.61±0.09	Godínez, 2011 y Serrano, 2011
	Secas	35.71±8.32	33.90±1.87	89.86±2.77	1.031±0.002	--	1.56±0.70	
Queso bola de Ocosingo	Lluvias	41.6±1.8	32.8±0.7	86.37±1.85	1.031±0.0008	6.6±0.07	1.64	López, 2013
	Secas	39.1±1.3	33.1±0.6	86.3±1.6	1.043±0.003	6.56±0.04	1.61	
Queso adobera de Atengo, Jalisco	Lluvias	41.3±3.14	34.18±0.5	90.02±1.36	1.032±0.012	6.58±0.58	1.90±0.03	Sánchez, 2012
	Secas	36.66±3.14	33.28±0.46	87.42±1.02	1.033±0.006	6.78±0.18	1.75±0.030	
Queso asadero de Aguascalientes	Lluvias	34.62±0.22	32.75±0.2	85.1±0.47	1.031±0	6.74±0.02	1.80±0.052	Salas, 2013
	Secas	33.42±0.2	32.5±0.1	84.57±0.25	1.032±0	6.48±0.05	2.02±0.058	
Queso ojos negros del Real de Castillo, Ensenada B.C	Lluvias	--	--	--	--	--	--	Silva et al, 2014
	Secas	30.6 ± 6.95	30.6 ± 2.00	--	1.029±0.0028	6.7±0.26	1.92 ± .289	
Especificaciones de la NMX-700-COFOCALEC-2004	--	30, 31, y >32	28-29.9, 30-30.9 y > 31	> = 83	> = 1.0295	No especificada	1.3 a 1.5	

FUENTE: Villegas de Gante et al., 2016; modificado por Silva, P. Laura., 2018.

Cuadro 3.
Especificaciones sanitarias para leche cruda de vaca contempladas en normas.

Indicador	Valores de referencia (UFC/mL) (log ₁₀ CFU/ mL ⁻¹)
¹ Cuenta mesófilos aerobios /mL	
Clase 1	≤100,000 UFC/ml (≤5.0)
Clase 2	101,000-300.000 (5.1 – 5.47)
Clase 3	≥301,000 – 599,000 (≥5.48 – 5.77)
Clase 4	≥600,000 – 1,200,000 (≥5.78)
² Coliformes UFC/MI	≤10 UFC/mL (≤ 1)
² <i>Salmonella spp</i> 25g	Ausencia
² <i>Listeria monocytogenes</i> 25g	Ausencia

¹NMX-F-700-COFOCALEC-2012

²NOM-243-SSA1-2010. Métodos de prueba: coliformes totales

La leche contiene normalmente cantidades elevadas de microorganismos que juegan un papel significativo en la calidad sanitaria de esta, impactando su presencia en el desarrollo del queso y su proceso de maduración. La presencia de los microorganismos en el queso va a depender por supuesto de la contaminación de la leche y del mismo durante su elaboración, las condiciones intrínsecas del queso (concentración de microorganismos fermentadores, humedad, cantidades de sal, presencia de ácidos orgánicos como el ácido láctico, pH y disposición de nutrientes como proteína, lactosa y grasa), así como de las extrínsecas del proceso y conservación (tiempo, temperatura, oxígeno, humedad relativa, e higiene) (Parra, 2010; Losito et al., 2014).

2.1.1.3 Inocuidad en la elaboración de quesos: la industria alimentaria tiene una responsabilidad especial en cuanto al mejoramiento de la calidad. Aunque la calidad es siempre multidimensional, en la industria alimentaria hay un atributo particular de calidad que es indispensable: la inocuidad. Es decir que los quesos no representen un riesgo para la salud de los consumidores. Donde Leche de bovino como materia prima en la elaboración del Queso de Ojos Negros, debe cumplir la disposición del punto 6.1.5 de la norma actual NOM-243-SSA-2010, que refieren a no presentar materias extrañas, conservadores ni sustancias neutralizantes, no coagular por ebullición, presentar prueba de alcohol al 68% negativa (sólo para leche de bovino). Y someterse a un tratamiento térmico con un tiempo y temperatura determinados que garantice su inocuidad, independientemente del uso que se le dé posteriormente, partir de ser una leche libre de contaminantes.

Para leche que se utilice en la elaboración de quesos que por las características de éstos no pueda ser sometida a tratamiento térmico, deben cumplir entonces con tener implementado un sistema HACCP para su proceso de elaboración en queso, conforme a lo establecido en el apéndice A de la NOM-251-SSA1-2009. Al igual el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios de la Secretaría de Salud en México, indica en su apéndice III.5, que la leche que se utilice en la elaboración de quesos deberá ser pasteurizada o de hatos libres de tuberculosis y brucelosis, para los que se apliquen sistemas de control del proceso y que demuestren mediante análisis microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales que es apta para consumo humano, sin perjuicio de las demás disposiciones aplicables. Por consiguiente la reciente publicación de la NOM-223-SCFI/SAGARPA-2017, Queso-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba, en el DOF en Octubre 2018; establece que para quesos con o sin corteza sometidos a un proceso de maduración cumplan con mantenerse bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en estos los cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que permite prolongar su vida de anaquel, pudiendo o no requerir condiciones de refrigeración. En este sentido la Administración de Alimentos y Medicamentos de E.U.A (FDA, por sus siglas en ingles) en su Código Federal de

Regulación (21-CFR-133-2018) y señalamiento de inocuidad en quesos elaborados a partir de leche cruda, establece que estos, deban someterse a una temperatura de maduración no menos de 35 ° F (1.666°C), por un periodo de al menos 60 días o más como tecnología alternativa a su pasteurización para reducir el riesgo microbiológico, invariablemente bajo el control de las BPM e higiene, HACCP y control de las características físico-químicas. Regla que se basa en la suposición de que los microorganismos patógenos incluso inicialmente presentes en la leche y en la cuajada a mayor periodo de maduración, se inhiben, debido a la competencia a la que se somete el queso en ambientes con pH bajo, pérdida de agua (humedad), niveles altos de sal, velocidad y cantidad de ácido láctico desarrollado por las diversas bacterias ácido lácticas (BAL), que desafían una biodiversidad de metabolitos producto de los microorganismos presentes en el queso, cuyo resultados se han reportado con certeza en diversos estudios por Reyne et al. (2011), Domínguez et al. (2011), Nada et al. (2012), Brooks et al. (2012), Longaray et al. (2012), Losito et al. (2014), González et al. (2016), Yohan et al. (2016) y Ispirili et al. (2017) en diferentes tipos de quesos.

Con respecto al impacto en la Salud Pública por el consumo de alimentos, en el año 2017, el boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica registro en la República Mexicana 1, 380, 630 de casos de infecciones intestinales, representando para el estado de Baja California el 2.6% de los casos, siendo el 0.035% por Salmonelosis, el 0.02% por *Staphylococcus aureus* y el 0.0003% por *Shigelosis*. (SINAVE/Salud, 2018). Los productos lácteos han sido reconocidos por ser susceptibles a la contaminación por microorganismos patógenos en queso principalmente de tipo artesanal en un 29% en el mundo (Gould et al., 2014).

2.2 Maduración del queso

La maduración corresponde a la fase en que la pasta del queso cambiará sus características, que, de una pasta blanquecina, algo insípida, más o menos consistente, pasará a tener nuevas características en su estructura como aspecto, consistencia, color y composición, al mismo tiempo que el olor y el gusto adquieren nuevos matices y se acentúan. Todo esto ocurre porque la pasta del queso está poblada de microorganismos que, con sus enzimas, junto a los propios de la leche y los añadidos para su coagulación, llevarán a cabo transformaciones bioquímicas, físicas y microbiológicas (Villegas et al., 2016). Es así que las modificaciones principales durante el envejecimiento o maduración del queso son: pérdida de humedad, destrucción de lactosa, neutralización o desaparición parcial del ácido láctico, elevación del pH, hidrólisis de la proteína, y grasa. Acontecimientos que influirán en cierta forma en los cambios bioquímicos en la matriz del queso y su corteza, los cuales pudiesen afectar la constante evolución de los distintos grupos microbianos a lo largo de la maduración con impacto en la pérdida de las propiedades sensoriales del producto si no se tiene control en ello.

Las reacciones proteolíticas requieren que previamente haya ocurrido un desdoblamiento del ácido láctico debida al acompañamiento de BAL mayormente homofermentadoras. A medida que va desacidificándose la pasta del queso, va avanzado la proteólisis debido a la riqueza en enzimas proteolíticas que subsisten en los *Lactococcus* a nivel de proteólisis primaria, ejercida durante el cuajado mientras que otros como *Lactobacillus* de metabolismo heterofermentador actúan durante trascurren los días en su fermentación o maduración. Aun así, esta fase del proceso de elaboración es uno de los más importantes que influye no nada más en el sabor y olor del queso sino también en su textura (Panizzolo et al., 2011; Álvarez, 2012).

La población microbiana que se desarrolla en la pasta quesera evoluciona durante su afinación, la cual puede ser superficial o en el interior de los quesos. Los quesos de pasta blanda maduran de fuera para dentro; los quesos de pasta

dura y los quesos de pasta firme maduran homogéneamente en toda la masa. En la superficial la flora microbiana se desarrolla y las enzimas secretadas migran hacia el interior de los quesos provocando los cambios bioquímicos deseados. La maduración en el interior se da principalmente por flora anaerobia. Algunas especies de BAL se multiplican, mientras que otras tienden a desaparecer; no existe un equilibrio microbiano estable, sino más bien una sucesión de poblaciones microbianas (González et al., 2016).

Es así que el término de maduración en este trabajo se dirigirá solo a los quesos de pasta semidura y dura de acuerdo al contenido de humedad como lo señalan FAO/OMS, (2008) y González et al., (2016). La maduración puede desarrollarse en periodos que puede durar algunos pocos días a varios meses e incluso un año o más, en el cual los quesos permanecen almacenados bajo ciertas condiciones naturales en las cámaras de maduración con respecto a controlar la temperatura y humedad según el tipo de queso, con el fin de permitir el desarrollo de productos provenientes del metabolismo de la grasa, proteínas y lactosa por la acción de las enzimas microbianas naturales o añadidas.

Con respecto a la evolución de las condiciones ambientales de maduración indispensables en las cámaras o cavas que garanticen la calidad óptima necesaria en el queso, el trabajo de Villegas et al., (2016), describen las características de almacenamiento en la maduración de ocho diferentes tipos de queso, en los cuales utilizaron una o dos etapas de temperatura, tiempo y humedad (cuadro 4). Donde se observa que en la mayoría de los quesos utilizaron en su primera fase de inicio un incremento promedio de temperatura de $11.0 \pm 1.85^{\circ}\text{C}$ ($10 - 16^{\circ}\text{C}$) con una humedad relativa promedio de 80.7% (65 - 90%), dependiendo de que sean quesos pasta dura, prensada y corteza seca; no considerado en este grupo el queso Roquefort por ser madurados con mohos, sin embargo, se mencionan. Este incremento de temperatura lo considera un proceso alternativo, para acelerar el proceso de maduración, siendo una condición observada en el resto de las siete variedades de quesos, en el mismo cuadro 4.

Cuadro 4.
Condiciones de maduración de diversos tipos de quesos

Tipo de queso	Primera Fase			Segunda Fase		
	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Humedad Relativa (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Humedad Relativa (%)
Edam	12-14	20-30	-	10-15	1-3	-
Gouda	14-15	30-45	-	10-12	6-12	-
Cheddar	12-16	30-44	65-70	5-10	4-12	-
Roquefort	8-10	18-25	-	5-10	en cuevas	95
Brie	10-14	28-30	80-85	8-10	4-5	-
Camembert	10-12	10-12	-	4	hasta la venta	-
Emmental	10-15	10-14	90	20-24	0.5-1.5	80-85
Manchego	12-14	10-14	85-90	5-12	1-6	70-85

FUENTE: Villegas et al., (2016)

A la vez otros trabajos han reportado incrementar la temperatura de almacenamiento para el queso al inicio de la maduración, con el propósito de que este alcance su seguridad requerida, manteniendo aun sus características de apariencia y sabor conocido por los productores consumidores (cuadro 5).

2.2.1 Clasificación de los quesos madurados

El queso es un producto resultante de la concentración de una parte de la materia seca de la leche, o de fluidos de origen lácteo mediante la renina, presente en el cuajo, o por enzimas similares; que después de la coagulación se separan del suero por corte, obteniendo la cuajada resultante; logrando preservar los principales elementos nutricionales como proteínas, grasa, calcio, fósforo y vitaminas de la leche (Ramírez et al., 2012; Villegas et al., 2016).

Cuadro 5.

Condiciones ambientales de maduración de los quesos reportados en referencias

Nombre del queso*	Temperatura	HR	Tiempo	Consistencia	Referencias
Cheedar	8 a 12°C	80 a 82%	< 6 meses	Duro, pasta semicocida	Ong y Shay (2008)
Reggianito	11 a 13°C	80 a 82%	< 6 meses	Duro, pasta cocida y prensada	Ceruti et al. (2014)
Minas de Brasil (estación seca)	23± 2°C	62%	17 días -35	Semiduro, pasta	Martins et al. (2015)
Minas de Brasil (estación lluvia)	27± 2°C	68%			
Cotija artesanal	28 °C	80 a 95%,	3 meses	Pasta prensada, textura dura	NMX-F-735-COFOCALEC-2011

*Quesos artesanales elaborados a base de leche cruda de vaca

En cuanto a la definición que plantean el CODEX para queso (FAO/OMS. 2008) lo precisa como “el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado”, y que puede estar recubierto, con una proporción entre proteínas de suero y la caseína no superior a la de la leche, obtenido por coagulación de la leche u otros productos lácteos (nata, leche parcialmente desnatada, nata de suero o la mezcla de varios de ellos), con separación del suero.

En este mismo sentido considerando el marco legal del Producto en México, la norma oficial NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteo; menciona que un queso como producto debe basarse en su elaboración a partir de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento

ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado. Entendiendo por queso Madurado - aquellos de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

Criterios de clasificación: Las numerosas clases de queso pueden agruparse en general de acuerdo con los siguientes juicios de valorización según trabajo de González y Franco, (2015) basado en las condiciones de proceso o características fisicoquímicas del tipo de queso como:

1. **Procedencia de la leche:** vaca, cabra, oveja, mezcla o búfala,
2. **Tratamiento de la leche** (leche cruda o de leche pasteurizada): en la primera, la fermentación láctica se realiza con las bacterias del entorno. Los quesos elaborados mediante este método no pueden consumirse antes de los dos meses. Por el contrario, los realizados a partir de leche pasteurizada se pueden consumir tras su elaboración.
3. **Tiempo de maduración** (entre quesos tiernos, semicurados, curados, viejos y añejos. (Cuadro 6)

Cuadro 6.
Tiempo de maduración mínima para cada tipo de queso

Tamaño (kg)	Maduración mínima (días)	
	<1,5 kg.	>1,5 kg.
Tierno (fresco)	---	7
Semimadurado	20	35
Madurado	45	105
Viejo	100	150
Añejo		270

4. Por su proceso de elaboración para diferentes tipos de quesos, en el cual no corresponda una denominación de origen, la FAO/OMS, (2008) señala que en caso de que el producto no se designe con el nombre de una variedad, sino solamente con el nombre “queso”, esta designación puede ser acompañada por cualquiera de los dos términos descriptivos del cuadro 7, que correspondan a su consistencia dada por su contenido de humedad sin materia grasa y características de manufactura que correspondan para la denominación del queso de Ojos Negros como queso mexicano, según características de consistencia y maduración, y por tratarse de un producto artesanal elaborado con leche cruda entera de vaca, que aún no ha sido identificado en norma, se utilizara la denominación de queso mexicanos en término de su porcentaje de humedad y características de manufactura.

Cuadro 7.
Denominación del queso según sus características de consistencia y maduración

Según su consistencia: termino 1		Según las principales características de manufactura: termino 2 ¹
HSMG %^{1,2}	Denominación	Madurado
< 51	Extraduro	Madurado por mohos
49-56	Duro	No madurado/fresco
54-69	Firme/semiduro	En salmuera
61-69	Semiblando	
> 67	Blando	

¹La HSMG equivale al porcentaje de humedad sin materia grasa. (FAO/OMS. 2008)

²NMX-F-713-COFOCALEC-2014-Sistema producto leche-alimento-lácteos-queso-queso suero. Denominaciones-Especificaciones y Métodos de Prueba.

5. Por su declaración de Contenido de Grasa de la leche (%GES)

Deberá declararse en forma aceptable el contenido de la grasa de la leche en el país en que se vende al consumidor final, bien sea, i) como porcentaje por masa, ii) como porcentaje de grasa en el extracto seco o iii) en gramos por ración cuantificada en la etiqueta, siempre que se indique el número de raciones. Siendo esto representado en el Cuadro 8, donde la expresión de grasa en el extracto seco, según especificaciones de la NMX-713-COFOCALEC-2014 es la más adecuada por la situación comercial. Sin embargo, existen una variedad de quesos, también considerados como típicos.

Cuadro 8.
Clasificación del contenido de grasa

Expresiones utilizadas ¹	% GES
Rico en grasa	Superior o igual a 60% (≥60)
Extra-graso	Superior o igual a 45% (59 -45)
Semi graso	Superior o igual a 25% (44-25)
Bajo en grasa	Superior o igual a 10% (24-10)
Sin grasa	< 10

¹NMX-F-713-COFOCALEC-2014-Sistema producto leche-alimento-lácteos-queso-queso suero. Denominaciones-Especificaciones y Métodos de Prueba.

La escasez de datos y contradicciones sobre la composición y calidad de este u otros tipos o variedades de queso mexicano, hace que no esté bien caracterizado lo que, a su vez, determina que posiblemente no existan figuras o marcas de calidad diferenciada, que amparen su calidad artesanal. Prueba de ello son los pocos trabajos existentes sobre la caracterización de quesos mexicanos como lo mencionan Solís et al., (2013) quienes estudiaron el queso artesanal Ranchero del Centro de México y González et al., (2016) al recopilar una revisión de las principales características de quesos artesanales más representativos en México. En este sentido, el trabajo de Caro et al., (2013) ha constatado que dentro de un mismo tipo de quesos existe una amplia heterogeneidad, tanto en sus propiedades fisicoquímicas como en su calidad microbiológica.

2.2.2 Queso de Ojos Negros en B.C.

Baja California cuenta con un mercado de quesos artesanales con gran potencial específicamente para el Valle de Ojos Negros por su desarrollo agropecuario y actividad agroindustrial con la producción de leche y quesos. El queso que se elabora en Ojos Negros es un producto artesanalmente tradicional que se inició en la antigua región Real de Castillo, del Valle de Ojos Negros, Municipio de Ensenada, Baja California México (31 °54' y 41.11' latitud norte y 116°16' y 26.07' longitud oeste) (Figura 1).

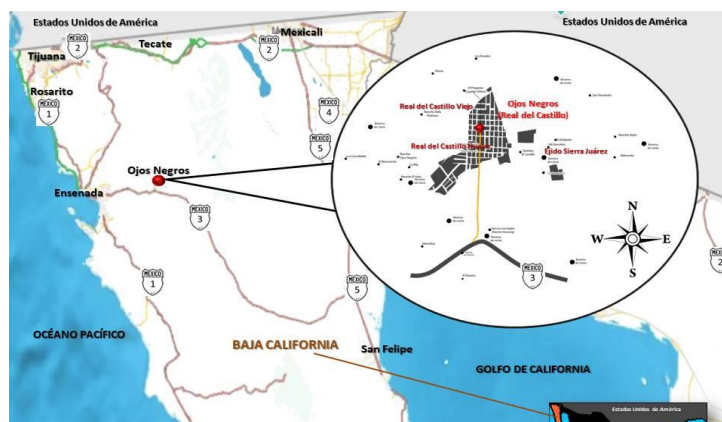


Figura 1. Ubicación de unidades de producción de leche y queso en diferentes localidades de la región de Ojos Negros, municipio de Baja Ensenada Baja California México.
Elaborado por Silva P.L, 2018

La parte norte de este Valle posee una raíz histórica que se remota a la localidad del Real del Castillo desde 1870 con el descubrimiento de yacimientos de oro y con ello una oleada de emigrantes a la región procedentes del interior de la república mexicana y de países extranjeros, estableciéndose así familias nativas de las regiones de Suiza, Italia, Alemania, Irlanda, quienes inician la producción artesanal del queso tradicional, con estilo europeo.

Actualmente la porción sur de Real del Castillo es precisamente Ojos Negros, quedando solo unos cuantos productores, viviendo del ganado, de las chivas, de las vacas y su queso; cuyo origen se pierde en el tiempo desde su llegada y la aplicación del conocimiento (saber hacer), cuyo proceso es el propio de la región y cuya técnica de elaboración poco modificadas permanecen utilizando como materia prima el 100% de la leche cruda de vaca, siendo el distintivo de la región desde 1890. Al respecto Villegas et al (2016), argumentan que un queso tradicional es un queso anclado en su historia y en su lugar de origen en pequeña escala con tecnología tradicional.

La región de Ojos Negros producen aproximadamente un volumen de 591,360mL de leche cruda al mes procedentes de vaca razas Holstein, Jersey, Pardo Suiza y sus cruza; los cuales son destinados a la elaboración de queso, cuyo proceso han ido tomando importancia en el aspecto de vigilar y controlar su calidad para no solo limitarse a un mercado regional, que después del 2012 se nombrara a esta región "la ruta del queso" el pasaje turístico que le dio un realce en el mercado externo (Gastelúm, 2013).

Sin embargo, de este queso poco se sabe de sus características sensoriales y microbiológicas, no existe información documentada de su calidad fisicoquímica y sobretodo microbiológico con respecto al tipo de bacterias nativa precursoras de la fermentación natural y su maduración.

Es así que durante los periodos de 2013 al 2015, se trabajaron tres programas de Extensionismo Rural con productores de leche y queso, para atender sus

inquietudes en garantizar la higiene en la obtención de su leche y su caracterización; fabricación del queso bajo buenas prácticas de manufactura e higiene, evitando pérdidas de su tipicidad, e interés por cumplir con la Norma Oficial Mexicana, NOM-243-SSA1-2010, normativa que regula el uso de leche cruda siempre y cuando se promuevan las prácticas de manufactura estandarizadas bajo el HACCP, y se conozcan las características finales del producto después de una comprensiva e integrada caracterización de los perfiles químicos, microbiológicos y sensoriales (Silva et al., 2014).

Lo que llevo a Hernández, (2015) señalar en un estudio efectuado en los quesos Real del Castillo, que estos pueden ser clasificados conforme a la estación del año en que se producen, debido a que los elementos en estos como la proteína y grasa varían conforme el clima cambia y el año pasa; y que la composición del queso, puede verse afectada por diversas circunstancias ambientales como incremento de temperatura en los recintos de almacenamiento de los quesos tendiendo a deshidratarlos, al proceso de cuajado, al bajo rendimiento quesero asociado al descenso en el porcentaje de sólidos totales en la leche a causa de pastizales que no contienen los nutrientes necesarios para que el ganado produzca leche con alto contenido de grasa y proteína.

Otro estudio realizado en la zona Real del Castillo de Ojos Negros por Silva et al, (2017), informaron de los primeros indicios de bacterias ácido lácticas (BAL) en muestras de queso de Ojos Negros, las que fueron tipificadas molecularmente mediante PCR-16S, señalando la presencia de especies de interés tecnológico a lo largo de su maduración, y demostrando la existencia de cultivos naturales sobretodo del tipo acidofila y proteolítica como *Lactobacillus* y *Enterococcus*, iniciadores principales de la cuajada, y cuyos atributos probablemente confieren las características únicas que distinguen a cada unidad de queso artesanal en función a una maduración por 63 días.

2.2.2.2 Descripción del queso de Ojos Negros: el queso de Ojos Negros debido a su singular elaboración, entre unidades de producción de la misma

región, puede ser descrito como un producto a partir de leche cruda de vaca, sin la adición de cultivos iniciadores y la fermentación ocurre por un proceso natural; la cuajada se obtiene a partir de la adición de un cuajo proteico comercial, calentándola a temperatura de 37°C por 50 minutos, desuerando la cuajada, agregándole sal, moldeándolo, prensando la pasta obtenida por 15 a 24 horas, y posteriormente desmontándolo para su conservación, ya sea en refrigeradores o cavas en la cual los productores consideran la temperaturas adecuada, pero carentes de evidencia en su registro (Silva et al., 2014). La mayor parte de los quesos desarrollan medianos agujeros distribuidos irregularmente consecuencia de la actividad metabólica probable de coliformes y de bacterias ácido lácticas (BAL) endémicas en la leche cruda, nativas de cada quesería, las cuales permanecerán en el proceso de fabricación del queso acidificando y jugando un papel importante en la protólisis durante la maduración (González et al., 2016; Martínez et al., 2016).

Ya finalizado este producto, se conoce como queso blanco (sin especies) prensado y oreado Real del Castillo, Ensenada B.C. Distinguiéndose su pasta por una textura semidura y consistencia cremosa a rechinante, con un intenso olor y sabor a leche, algo amargo y fuerte; con una corteza delgada, algo uniforme y semi suave de color amarillo pálido o color paja, el cual con el tiempo se va tornando blanca conforme se desarrollan mohos en su superficie (Sociedad de Productores Lácteos de Ojos Negros, 2014; Hernández, 2015).

El proceso de elaboración de este queso lo hace parecer como perteneciente a la familia de quesos, del tipo madurados prensados, de pasta semidura o blanda, con o sin corteza; a excepción de su corta maduración u oreo (NOM-243-SSA1-2010). Su consumo ocurre después de un corto periodo de oreado por lo general menor de 15 o 21 días de acuerdo a la demanda de su comercialización y sin maduración de al menos 60 días antes de su consumo como medida de seguridad en quesos elaborados con leche cruda.

2.2.2.2 Descripción tecnológica del queso de Ojos Negros: el procedimiento que siguen las unidades de producción en la elaboración del queso prensado Ojos Negros se esquematiza en 10 pasos de elaboración, figura 2. Las cuales muestran coincidencias con las mismas operaciones y condiciones de infraestructura, temperatura ambiental, tamaño de las piezas, sin embargo, existiendo diferencias en los tiempos de proceso (temperatura, pH, acidez y tiempo), tipo de utensilios utilizados, almacenamiento de agua potable, seguimiento de controles, cantidad de leche producida y personal laborando (Martínez et al., 2017).

2.2.2.2.1 Recepción de la leche y filtrado: el abastecimiento de la leche es de “autoconsumo” es decir los productores que elaboran el queso utilizan la leche de vaca procedente de sus establos lecheros. *Como estrategia para disminuir la contaminación de la leche en la recepción, estas tres unidades cuentan con ganado libre de tuberculosis y brucelosis. Solo una (66%) unidad de producción, practica con buenas prácticas de ordeña y buenas prácticas en su almacenamiento. La leche, se obtiene de forma natural, entera y sin adulteraciones. Dos unidades en estudio (66%) colectan la leche directamente de la de la sala de ordeña hacia la quesera a través de tubería de acero inoxidable la cual depositan en tinas de cuajado del mismo material, y el resto (33%) colecta la leche en tambos o quenás de acero inoxidable trasladándola en carro a la quesera sin refrigeración en un tiempo no mayor de 40 minutos. Una vez que la leche llega a la quesera es filtrada, generalmente por medio de mantas como cedazos, para eliminar impurezas insolubles como pelo, moscas y heces, con lo cual demuestran que la leche es apta, para su almacenamiento, registrado este control en sus bitácoras.*

2.2.2.2.2 Almacenamiento de la leche: el 66% de las unidades cuentan con dos ordeños al día, recibiendo dos veces por día la leche; y su almacenamiento se describe en dos momentos, el primero al queso que se elabora por la mañana, la leche filtrada se deja en reposo aproximadamente 1 a 1.5 h (tiempo en el que generalmente se termina de ordeñar todas las vacas),

durante este tiempo la temperatura de la leche se acondiciona hasta unos 30 – 32 °C de temperatura para posteriormente adicionar el cuajo. La leche de la ordeña de la tarde, sigue el mismo procedimiento de recepción y filtrado como el de la mañana, la tina de recepción se cubre con una manta para evitar exponer la leche al polvo e insectos y su conservación es sin refrigeración manteniéndose en reposo a temperatura ambiente hasta su proceso de transformación en queso al día siguiente en el cual transcurre un tiempo menor a 12 hrs, lapso que es controlado midiendo su temperatura ya que puede significar un riesgo de crecimiento microbiano debido al mayor tiempo de adaptación por arriba de los 7 °C. *100% de los productores registran este valor.*

Los productores de queso de la región en estudio dicen que la leche se acidifica mejor y afloran los microorganismos buenos que ayudan a que el cuajo se incorpore mucho mejor. *Factor clave del cual el 100% de las unidades no le presta atención*, porque vistos por separados sobre el rendimiento son modestos, cayendo en la creencia errónea de que se trata de una acidificación idónea para elaborar quesos. Irónicamente este factor lleva al incremento de la población microbiana después de unas cuantas horas de almacenada en ambientes no fríos >18 °C, luego que cesa la actividad protectora del sistema de la enzima lactoperoxidasa naturalmente presente en la leche, lo que permite que proliferen aún más microorganismos.

2.2.2.2.3 Aplicación del cuajo: fue complicado conocer exactamente la cantidad de cuajo que adicionan debido a que no siguen las instrucciones del fabricante. Algunos de los productores lo diluyen en agua, estimando su propia medida basados en su experiencia, sin importar la proporción de leche, el 33% *al menos utilizan agua de garrafón para diluir el reactivo.*

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACION DE QUESO ARTESANAL DE OJOS NEGROS

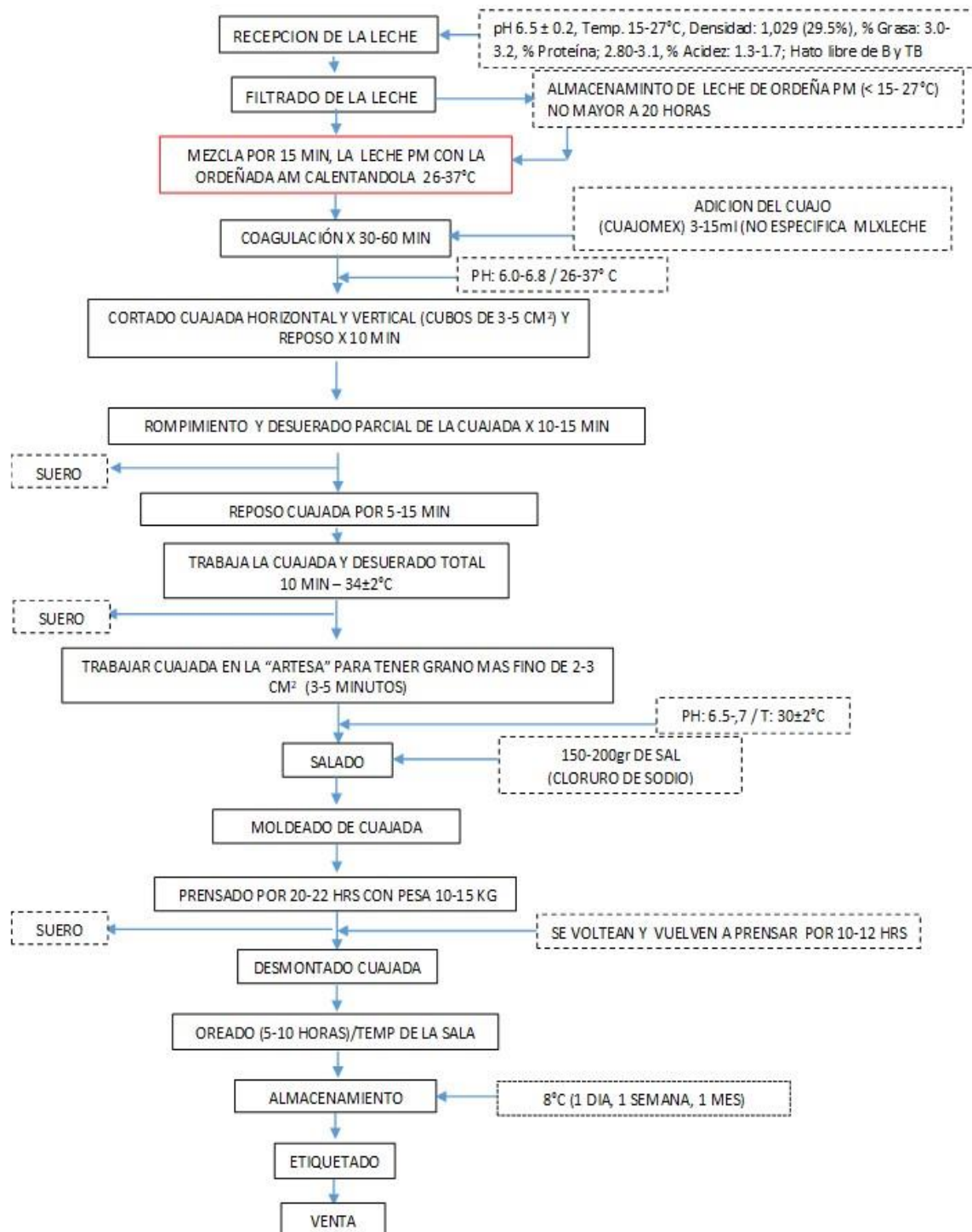


Figura 2. Secuencia genérica del proceso de elaboración del queso prensado de Ojos Negros

Todos los productores utilizan la misma marca de cuajo CUADUMEX. El producto se aplica una vez que la temperatura de la leche se fija en 30 a 32 °C. Se aplican 10 mL de cuajo en 100 mL de agua potable fría por cada 100 Lt de leche; se agita lentamente la leche para distribuirlo bien y se deja reposar, debe medirse el grado de acidez previo a su incorporación en la leche, esta práctica no la realizan y controlan. Se deja actuar el cuajo aproximadamente entre 30 a 40 min dependiendo del volumen de leche, para posteriormente cortar la cuajada.

2.2.2.2.4 Corte de la cuajada: para determinar el momento óptimo de cuajado se introduce un cuchillo en la cuajada; si el cuchillo sale totalmente limpio, la cuajada está lista para cortarse. *En este proceso 66% de los productores utilizan sus manos y solo 33% lo realiza con palas o liras.* No se observó una homogeneidad entre los productores en el corte de la cuajada ni el tamaño de los trozos obtenidos. Obteniéndose una cuajada al corte en forma de cubitos de 1 cm tamaño al que llaman "*grano*". En esta fase se obtienen dos productos: el grano y el suero.

2.2.2.2.5 Tratamiento de la cuajada: después de cortada, se deja reposar de 5 a 10 min. En esta etapa se realizan movimientos suaves sobre la cuajada con ayuda de una pala quesera de acero inoxidable o sus manos, para así ayudar al desuerado durante 10 min. *El 33% de los productores utiliza un cuchillo especial y el resto lo hace con la mano.* Se agita 5 min muy suavemente y se inicia el calentamiento hasta 38 °C lentamente: lo ideal sería 1°C cada 5 min., para ayudar a una mejor textura. Después se deja reposar 5 min más. El rendimiento de queso es aproximadamente de 12 - 15 Kg por cada 100 Lt. de leche tratada.

El reposo permite que el suero ascienda a la superficie y facilite la formación de la cuajada. Se realizan 2 a 3 reposos y cada uno tiene una duración aproximada de 5 min. Después del segundo reposo algunos productores realizan el lavado de la cuajada adicionando agua caliente a 50 °C – 55 °C.

2.2.2.2.6 Desuerado-escurrido: la mayoría de los queseros dejan reposar por media hora aproximadamente la cuajada en el mismo recipiente, para que se

lleve a cabo el desuerado. En esta etapa se elimina al exterior el suero obtenido utilizando una malla para evitar la pérdida de gránulos hasta un nivel aproximado de 1/3 de la tina. Durante la segunda media hora se maneja la cuajada, pasándola con vasos o jarras plásticas a un cedazo de manta o tela de algodón, hasta la eliminación del suero, permitiendo que la cuaja quede en el fondo, para posteriormente recolectarla. Se termina de desuerar la cuajada en la manta aplicando poca presión por algunos queseros.

Segunda Agitación: en esta etapa la agitación es más enérgica que la primera debido a que tiene la finalidad de conseguir la firmeza adecuada de la cuajada. Esta etapa tiene una duración de 10 min. Esta variación de prácticas puede tener un efecto sobre la iniciación de la fermentación láctica, por lo que recomendamos que el tiempo de desuerado sea de una hora. Esta fase los productores no la registran.

2.2.2.2.7 Salado: la sal influye en el sabor del queso, elimina suero, regula la humedad, acidez, y controla el desarrollo de microorganismos durante la maduración. En esta fase se utiliza cloruro de sodio (ClNa), conocido como sal refinada, no yodada en una proporción de 1 - 10 %, este dato fue también difícil de conocer entre los productores ya que utilizan criterios diferentes para hacerlo por tradición *donde el 33% utiliza una taza de café, y 66% de ellos vacían el contenido de 1 o 2 bolsas de aproximadamente 1 kilo de sal.* Mencionando utilizar proporción de 9 g de sal por litro de leche. Se incorpora la sal a la cuajada ya desuerada o escurrida en una artesa. Inmediatamente se procede a moler la cuajada con la mano y para incorporar la sal antes de pasar al molde, aproximadamente este trabajo dura 15 min.

2.2.2.2.8 Moldeado y Prensado: este proceso da la forma final al producto ya que elimina el excedente de humedad del queso y compacta la cuajada. Ayuda a desuerar más, si quedan restos de suero en el interior (bolsas de suero) se favorecerá el desarrollar de flora indeseable que altera el producto. *El moldeo lo realizan manualmente, donde el 66% de los productores toma una porción de*

cuajada de la tina quesera con un cucharón y el 33% utiliza un recipiente limpio, haciendo colocar la cuajada en los moldes de material de fácil limpieza, a los cuales se le pone un pedazo de paño prescindibles para seguir desuerando al momento de su prensado y evitar la fuga de cuajada por los agujeros y/o se rompa la cuajada. Los moldes son cilindros elaborados a partir de tubos de PVC con agujeros, los hay de acero inoxidable también. Los tamaños de los cilindros fluctúan entre grandes de aproximadamente 5 kg, como también los hay de 500 g hasta 1.5 kg, de formas cilíndricas, cuadradas hasta en forma de corazón. Posteriormente el operario coloca los cilindros o moldes en una superficie epóxica o mesa de acero inoxidable donde se encarga de ejercer presión de la cuajada sobre el molde tapando esta para luego colocarles las prensas y pesas.

Las prensas tienen diferentes pesos y están hechas de materiales nobles como cilindros de PVC rellenos de cemento y cubiertos de pintura epóxica, los hay de acero inoxidable también y al parecer no son exactas en su peso. Solo pocos de los productores siguen utilizando blocks u piedras como pesos para las prensas. Los pesos oscilan entre 10 a 15 kg, el tiempo que permanecen los cilindros prensados oscila entre 7 a 15 horas antes de su 2do volteo y permanecen prensados hasta por 18 a 24 horas, para posteriormente sacarlos a orear más tarde.

2.2.2.2.9 Almacenamiento y maduración: el queso solo se airea a temperatura ambiente en la sala de elaboración para que se forme la corteza en su superficie, posteriormente se guardan en cuarto refrigerado o refrigeradores industriales entre temperaturas de $< 8 -12^{\circ} \text{C}$. *Por un lapso no mayor de 21 días en verano y <7 días en invierno* según su demanda en el mercado. Razón por la cual el queso no se somete a una maduración como tal. En el área de almacenamiento del queso en tres de las unidades en estudio, se registraron las condiciones de temperatura y humedad en su interior, obteniendo en promedio durante los periodos del estudio dentro de los recintos de almacenamiento, valores de temperatura en invierno de $16.7 / \text{DS} \pm 1.86^{\circ} \text{C}$ y humedad relativa $80 \% / \text{DS} \pm 6.45 \%$, y en verano se obtuvo promedios de $13.6 / \text{DS} \pm 2.53^{\circ} \text{C}$ de temperatura, con $67.6 \% / \text{DS} \pm 20.6 \%$ de HR.

En el entendido de que madurar los quesos por espacio de 60 días o más es la alternativa para que los microorganismos BAL produzcan ácido láctico, CO₂, péptidos y otros compuestos bio-funcionales que inhibirán o matarán a las bacterias patógenas (Chombo et al., 2016), tecnológicamente madurar el queso, es la opción jurídica o normativa que evitará la pasteurización en aquellos productos quesos y derivados que no se sometan a tratamiento térmico y en su elaboración se utilice “leche bronca”. Este proceso es parte de los objetivos que se estudian en este trabajo de tesis doctoral.

2.2.2.2.10 Envasado y etiquetado: en esta etapa solo 33% de las unidades en estudio estampan a sus quesos su marca de identificación como quesero utilizando tinta vegetal de color azul para identificar el lote de producción y la unidad que lo produce. Los quesos se expenden en la localidad sin envoltura, salvo aquellos que por razones de valor agregado en ferias o exhibiciones se empaacan al vacío y se les colocan ya sea dentro del empaques de plástico o adherido fuera del envoltorio etiqueta nutrimental con los datos del producto de acuerdo con Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria.

2.3 Microorganismos en los quesos

En México la regulación y control para los microorganismos indicadores de alteración, higiene y patógenos de mayor importancia en la industria quesera son regulados por la Secretaría de Salud en productos lácteos y queso para su comercialización, siendo estos referidos en el Cuadro 9.

El crecimiento de los microorganismos deseables y la calidad de los quesos son influenciados por la composición y calidad de la leche empleada en el proceso de fermentación, estos pueden presentarse en forma natural o como contaminante

Cuadro 9
Especificaciones sanitarias normativas de referencia microbiológica para productos fermentados y queso en México

Indicador	Valores de referencia	Norma
Coliformes totales UFC*		
Producto lácteo acidificado ¹	≤10 UFC (≤1 log ₁₀)	NOM-185-SSA1-2002.
Queso madurado/g	50 NMP (1.7 log ₁₀)	NOM-121-SSA1-1994.
Queso de suero/g	100 UFC (2 log ₁₀)	NOM-243- SSA1-2010.
Mesofilos aerobios totales UFC		
Quesos procesados obtenidos de leche pasteurizada	100,000 UFC (5 log ₁₀)	NMX-F-092-1970.
Hongos y Levaduras (H.L) UFC*		
Queso frescos, madurados y quesos de suero/g	≤500 UFC (≤2.7 log ₁₀)	NOM-243- SSA1-2010.
<i>Salmonella spp</i>		
Quesos frescos, madurados y procesados; quesos de suero.	Ausente en 25g	NOM-243- SSA1-2010.
<i>Listeria monocytogenes</i>		
Queso y queso de suero	Ausente en 25g	
<i>Lactobacillus spp</i>		
Productos fermentados ¹	10 ⁷ (7 log ₁₀)	NOM-181-SCFI-2010.
<i>Cultivos lácticos alternativos</i>		
	10 ⁶ (6 log ₁₀)	

¹ Los productos lácteos fermentados y los productos lácteos acidificados deben tener una acidez titulable de no menos de 0.5% expresada como ácido láctico y su pH debe ser máximo de 4.4

*El valor de referencia informado de microorganismo transformado en logarítmico de 10
Elaborado por Silva P. Laura. 2018

Los microorganismos naturales y en cierta forma amigables o buenos que predomina en los productos lácteos fermentados como; queso, yogur, mantequilla, crema agria, kéfir, kumis, dahi de la india y leche acidificada), son bacterias ácido lácticas (BAL) (Martínez et al., 2016).

2.3.1 Bacterias contaminantes

Los microorganismos que afectan el queso durante su maduración son bacterias esporuladas bacilos gram positivos, que se encuentran en el medio ambiente y en la sala de ordeña, fuertemente vinculadas con forrajes y cereales brindados a los animales durante las prácticas de ordeña. Asociadas usualmente a la formación de gas por especies de *Clostridium*; ocasionando lo que se conoce como hinchazón tardía en los quesos, un defecto que ocurre después de varias semanas de su elaboración, como consecuencia de la fermentación del lactato a acetato, butirato, hidrogeno y bióxido de carbono (Noa y Ruvalcaba., 2011).

Los Hongos y levaduras, pueden crecer en pH desde 3.2 hasta 6.5, siendo el óptimo entre 4.5 y 5.5. Su presencia ocasiona defectos en su apariencia como manchas pigmentadas y colonias visibles de moho, hasta generar olores atípicos como aroma y sabor o posible producción de micotoxinas por hongos filamentosos que pueden convertirse en un riesgo de la salud (Alejo et al., 2015; Marin et al., 2015). La función de estos microorganismos es secundaria, su presencia se debe a factores en el almacenamiento en particular humedad y por el estado de maduración del queso ocasionado por condiciones ambientales acidas, pérdida de humedad e incremento en su concentración osmótica (Marin et al., 2015).

Las bacterias psicótrofas gram negativas tienen una facilidad de desarrollarse entre temperaturas frías y templadas entre estas se encuentran *Pseudomona*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*; estos géneros están presentes en la leche cruda y son responsable de la alteración de los quesos frescos, también se pueden desarrollar sobre la superficie de los quesos en su primera fase de

maduración. En la leche ocasionan defectos con aparición de malos olores y pérdida del rendimiento de la leche para utilizarse en la elaboración de queso, debido principalmente al metabolismo proteolíticos y lipolíticos de estas bacterias asociadas a su crecimiento (Simões et al, 2014).

El grupo de coliformes como bacterias gram negativas contaminan la leche, no sobreviven a la pasteurización por lo que se utilizan como indicadores de contaminación post-pasteurización; este grupo fermenta la lactosa y son psicótrofas también. La fermentación de la lactosa puede producir hinchazón en el queso, conocido como hinchazón temprana, aun cuando el queso está en prensado, generando aromas atípicos en los productos. Este grupo de bacterias también acidifican la pasta y desarrollan una proteólisis no muy buena en el queso. Se ha reportado que el nivel de bacterias coliformes gradualmente decrecen durante la maduración del queso, que en consecuencia se debe a la acidez progresiva (producción de ácido láctico y reducción del pH) que desarrollan las BAL y los mismos coliformes durante la maduración, ocasionando inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes, convirtiendo al queso en un substrato hostil para las poblaciones ácido-sensibles como son coliformes y enteropatógenos, con muy pocas posibilidades de sobrevivir a pH por debajo de 5.0 (Simões et al, 2014; Villegas et al., 2016; Cortes et al., 2015).

2.3.2 Bacterias Acido Lácticas (BAL)

Las bacterias del ácido láctico (LAB) son microorganismos que se asocian naturalmente con hábitats ricos en nutrientes como la leche y el queso de diferentes especies de mamíferos (vaca, cabra, oveja y búfala), carne, bebidas y verduras. Logrando también ser aisladas del suelo, lagos y el tracto intestinal de animales y humanos (Partovi et al., 2015). Las BAL, han sido utilizadas en la producción de alimentos durante mucho tiempo a través de la fermentación de carbohidratos que facilitan su conservación y duración en anaquel (González et al., 2016; Domingos et al., 2017). Se emplean con éxito como cultivos iniciadores

en la fabricación de productos lácteos, cárnicos, de panadería, vino y vegetales (El Soda et al., 2003).

Los productos de la fermentación de los carbohidratos de la mayoría de BAL son ácidos láctico, fórmico, propionico, butírico y acético, además de otros compuestos como H_2O_2 , acetona, acetaldehídos, diacetyl, CO_2 y bacteriocinas; que promueven indeseables cambios en el medio de crecimiento inhibiendo microorganismos responsables del deterioro y desarrollo de patógenos en los alimentos como *L.monocytogenes*, *S.aureus*, *B.cereus*, *Cl botulinum*, *Salmonella* (Kongo, 2013; Lorrunguan et al., 2014; Cortez et al., 2015)

La mayor parte de estas bacterias lácticas comparten el hecho de ser microorganismos Gram-positivos, catalasa y oxidasa negativos, anaerobios facultativos, microaerofilos o aerotolerantes, no esporulados, no patógenas, no toxígenas, y fermentadores de carbohidratos en ácido láctico y no reducen los nitratos a nitritos, además de compartir características morfológicas entre la diversidad de miembros de estas bacterias, en formas de bacilos delgados y largos o cortos, aunque también de formas de cocos de 0.5 a 0.8 micras; produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional, (cuadro 10) (Sánchez y Tromps, 2014, Milani et al., 2017; Cortez et al., 2015).

Estos grupos de microorganismos ácido lácticos mayormente comparten otros rasgos comunes como crecer a un pH de 4 a 4.5, siendo la temperatura el factor clave para su desarrollo como mesófilos (20-30°C) o termófilos (37-45°C) (Parra, 2010). Siendo el crecimiento óptimo de 30° y 42 °C, respectivamente. Temperaturas que se alcanzan en la tina de cuajado, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos deseado de forma rápida. Es así que durante la maduración del queso la temperatura debe ser inferior (12 °C) de forma que no se favorezca el crecimiento de los microorganismos no deseados, pero si se puedan dar las condiciones para el desarrollo de las BAL en forma lenta y con ello sus reacciones enzimáticas durante la maduración del queso (Parra, 2010; Cortez et al., 2015).

Cuadro 10. Características importantes de los géneros de bacterias ácido lácticas (BAL) encontradas en quesos tipo artesanales

Característica	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Lactococcus spp</i>	<i>Leuconostoc spp</i>	<i>Pediococcus spp</i>	<i>Enterococcus Spp</i>	<i>Weissella Spp</i>
Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	positivo
Forma	bacilo, se encuentran solos en parejas o en cadenas largas 0,5-1.5mm	cocos en cadenas no tétradas 0,5-1.5mm	cocos en cadenas cortas no tétradas	cocos en pares y tétradas	cocos en parejas (diplococos) no tétradas	cocobacilos formas bacilo y
Catalasa	Negativo	negativo	Negativo	Negativo	negativo	negativo
Desarrollo CO ₂ a partir de glucosa	*+/-	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo
Tolerancia ClNa 1.8%	+/-	negativo	Positivo	Negativo	negativo	negativo
Tolerancia ClNa 6.5%	Positivo	negativo	+/-	+/-	Positivo	+/-
Tipo de metabolismo ^a	He y Ho	Ho	He	Ho	Ho y He	He

*Respuesta variable según especie (+/-)

^a Homo o heterofermentación de la glucosa: (ho) y (he) indican homofermentación o heterofermentación, respectivamente Manolopoulou et al., (2003), Abdi and Soleimani, 2006; Forouhandeh et al., 2010.

En función a su metabolismo de fermentación de los carbohidratos (glucosa), las BAL se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas, donde el primer grupo su principal producto es ácido láctico (90-97%) a partir de la glucosa y galactosa como producto principal de la fermentación de las hexosas, no fermentando las pentosas ni el gluconato, ya que su vía es a través de la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP); mientras que el segundo grupo producen 50% del ácido láctico, debido a que carece de la presencia de la enzima aldolasa isomerasa, y la fermentación de las hexosa en pentosa se lleva a cabo por medio de la ruta ácido-6-fosfogluconico; produciendo diferentes compuestos como ácido propionico, acetatos, succinatos, etanol y dióxido de carbono (CO₂) (Mandigan et al., 2004; Ortiz, 2006; Parra, 2010; Cortez et al., 2015).

2.3.3 Consorcio de BAL en la industria quesera

En la industria quesera el desarrollo de ácido como medida de seguridad es el resultado de la distribución y consorcio entre las numerosas especies autóctonas de BAL presentes, pues a medida que se desarrolla más ácido en la cuajada (es decir, pH más bajo), los patógenos no crecen tan rápido y lo interesante es que las bacterias lácticas también mueren. Siendo las comunidades microbianas de BAL, las reconocidas en la leche de vaca utilizada en la industria quesera y artesanal por tradición en países como La Mancha en España con el conocido queso Manchego (Sánchez et al., 2006; Nieto et al 2010), en Somerset Inglaterra en la elaboración del queso Cheddar (Aydemir et al., 2015; Mazzeo et al., 2009). En este mismo sentido en México, las variedades de quesos que mayormente se mencionan en diferentes estudios científicos son el tipo Chihuahua (Reyne et al., 2011; Sánchez et al., 2018), Oaxaca (Villanueva et al., 2012; González y Franco, 2015), Cotija (Barrera, 2010; Chombo et al., 2016) y Panela artesanal (Torres et al., 2006; Fortino et al., 2017). Los géneros de interés y por su importancia en la industria del queso y mayormente estudiados son los grupos de:

Lactobacillus (Lb): estos son bacterias Gram positivas con forma de bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos, integrado por alrededor de 124 especies (Forouhandeh et al., 2010) que incluyen grupos homofermentativas obligadas, 21 heterofermentativos facultativos y heterofermentativas obligadas. Utilizan la glucosa como fuente de carbono. Se encuentran una gran variedad de ambientes ricos en carbohidratos, se han aislado de mucosas humanas y animales, productos vegetales, cárnicos y lácteos principalmente. Las especies homofermentativas están asociadas con el hombre y animales, correspondiendo a: *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii sbs. Delbrueckii*; mientras que las heterofermentativas se asocian con alimentos, en los cuales llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente bajo refrigeración en productos empacados, y la conforman las especies *Lb. plantarum*, *Lb. ramosus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. kéfir*, *Lb. reuteri* (Castañeda y Zepeda, 2016). Estas especies son naturalmente encontradas en leche cruda y especialmente a lo largo del plazo de la maduración del queso, jugando un importante rol en el desarrollo del aroma (Avnikirmaci et al., 2016; Stefanovic et al., 2018).

Importancia en la Industria – El 82% de los lactobacilos producen diacetilo, cuyos niveles bajos de diacetilo Diacetyl son responsables de las distintas propiedades y calidad de aromas. Las especies que mayor cantidad de diacetil desarrollan son en mayoría *Lb. paracasei subsp. paracasei*, *Lb. plantarum* (Domingos et al., 2017). Las especies *Lb. paracasei ssp. paracasei* y *Lb. plantarum* son denominados población láctica secundaria o iniciadora atípica, llamada NSLAB por sus siglas en inglés (non starter lactic acid bacteria) de importancia alimentaria industrialmente ya que tienen el generalmente reconocido estado de ser seguros (GRAS) (Colombo et al., 2009). Además de su capacidad acidificante, también pueden contribuir al desarrollo de sabores en alimentos fermentados mediante la producción de compuestos aromáticos a través de la actividad proteolítica (Domingo et al., 2017).

Lactococcus (Lc): se presentan en forma de cocos, dispuestos en pares o en cadena de longitud variable. Son bacterias Gram positivas, no esporulados, sin

flagelo, homofermentativos, que producen sólo ácido láctico, anaerobias facultativas y microaerófilas. Su temperatura óptima de crecimiento es cerca a los 30°C, son termosensibles, no pueden crecer a concentraciones de ClNa de 6.5% o cuando el pH es superior a 9.6, siendo tolerante a concentraciones < 4% (Terzic et al., 2014). Se encuentran en productos como leche y cremas fermentadas, en los quesos donde es la microflora predominante y en los cuales desempeñan un papel irremplazable contribuyendo a la textura, sabor, y asegurando la conservación de los quesos. Este género tiene varias especies y subespecies, de las cuales los cuatro tipos siguientes son utilizados en la elaboración de quesos: *Lc. sbp. Lactis*, *Lc. lactis sbp. Cremoris* y *Lc. lactis sbp. Lactis biovar. Diacetylactis*, *Lc. garvieae* (Castañeda y Zepeda, 2016).

Estas especies de microorganismo se desarrollan naturalmente en la leche cruda de animales como bovino, ovino y caprino, sobretudo en leches que son almacenadas a temperatura ambiente como predominantes bacterias mesófilas. Cepas de *Lactococcus garvieae*, también han sido aisladas de lecherías, ambientes marinos (peces) y su presencia en el queso se puede deber a los niveles altos de uso de sal, sobretudo de sal marina en la preparación de salmuera, por lo que se considera una bacteria muy tolerante e importante papel durante el proceso de maduración del queso. Teniendo un efecto específico en el desarrollo de los sabores (Avnikirmaci et al., 2016).

Importancia en la Industria - *Lactococcus lactis* es la especie más utilizadas en la producción de quesos frescos, de pasta dura, prensada semi o no cocida, quesos de pasta hilada y otros productos fermentados. Siendo una especie considerada segura para el consumo humano a sabiendas de formar compuestos secundarios como la bacteriocina “nisina” al biodegradarse en el tracto intestinal (Heredia et al., 2017). Presentando además un sistema proteolítico complejo que junto con otras enzimas convierten a la caseína en péptidos y aminoácidos; siendo estos últimos los principales precursores de compuestos volátiles, metabolizados a aldehídos, cetonas, aminas y alcoholes (Gutiérrez et al., 2008). La cepa *Lc lactis* es un iniciador mayormente utilizado como cultivo de inicio desarrollando una acidez muy pronunciada (homofermentativa), es una especie muy considerada para la

producción del añejamiento del queso Cheddar de pasta semi dura a dura (Reyne et al., 2011; Reale et al., 2016).

Enterococcus (E): comprende un aproximado de 30 especies de bacterias que fueron separadas del género *Streptococcus* al encontrar diferencias genéticas significativas entre las cepas; especialmente las mayormente encontradas en productos lácteos como: *E. casseli*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*. Son bacterias Gram positivas, células esféricas, dispuestas individualmente, en pares o cadenas cortas, catalasas negativas, no esporuladas, algunas cepas presentan movilidad. Tienen una capacidad de crecer en la amplia gama de temperaturas entre 10 y 45°C y concentraciones altas de sal (ClNa) de 6.5%, y bajo pH (3.5 a 9.5). Son bacterias anaerobias facultativas, heterofermentativas facultativas produciendo como compuesto principal ácido láctico (Duygu et al., 2014; Castañeda y Zepeda, 2016).

Las diferentes especies de *Enterococcus* aparecen cuando las condiciones en el ordeño y pasos del procedimiento de elaboración del queso son antihigiénicas, siendo el punto de lanza para que estos microorganismos entren a la leche por diferentes vías de contaminación como son principalmente por agua contaminada, equipo de ordeño, y tanque de almacenamiento de la leche (Avnikirmaci et al., 2016; Ispirli et al., 2017)

Importancia en la Industria – Dentro del grupo BAL, *Enterococcus* es el más controvertido género. El uso de este grupo en los alimentos ha sido cuestionado, debido a los posibles problemas de salud asociados en enfermedades nosocomiales. A pesar de estas consideraciones, esta especie se encuentra en altas densidades en muchos quesos de leche cruda, teniendo efectos beneficiosos sobre el desarrollo de aroma y sabores durante la maduración de muchos tipos de queso (Domingos et al., 2017). *E. faecalis*, es común encontrarla en alimentos fermentados y fuertemente asociados a la producción de bacteriocinas lo que pudiera contribuir con su característica de seguridad (Chombo et al., 2016; Heredia et al., 2017).

Estas especies principalmente se encuentra como población en el queso, teniendo un rol importante en el desarrollo del sabor, aroma y textura según Avnikirmaci et al., (2016). Son microorganismos proteolíticos que degradan la caseína, teniendo por objetivo el desarrollo de la textura del queso. Además, algunos péptidos contribuyen a la formación de un buen sabor, sin embargo esta proteína puede aportar un sabor amargo indeseable en el producto final, debido a la degradación secundaria de los aminoácidos con gran impacto en el desarrollo del sabor del queso.

El 92% de los *Enterococos* producen diacetilo, y la especie que mayor cantidad de diacetil producen es la cepa *E. faecalis*, la cual presentan mucho más actividad proteolítica que *E. faecium* metabolizando mucho mejor el citrato el cual contribuye a desarrollar distintas propiedades y calidad en aromas y sabores (Domingos et al., 2017). Otros compuestos que desarrollan las distintas especies y que se relacionan con el olor, es la producción de acetaldehído, acetoina, y otros importantes compuestos volátiles (Duygu et al., 2014).

En quesos europeos se utiliza la cepa de *Enterococcus spp* como un cultivo iniciador adjunto empleado para elaborar quesos del tipo Feta, Morzzarella y Cabreiro por su actividad proteolítica y lipolítica (Avnikirmaci et al., 2016). En el queso Cotija Mexicano *E. faecalis* prevalece como cultivo nativo hasta por 90 días de maduración, seguido por *E. faecium* en menor proporción (Chombo et al., 2016).

Weissella (W): este género comprende ser bacterias heterofermentativas obligadas, en forma de barras pequeñas o cocobacilos en pares o cadenas, se han confundido a menudo con *Lactobacillus spp*. Gram positivas, catalasa negativa, anaerobia facultativa. La temperatura de crecimiento óptima es 18-24 °C, pero muchas cepas también crecen a 30 °C. La bacteria produce ácido a través de la fermentación de la galactosa, maltosa, melibdiosa, sacarosa. El linaje de estas especies fue separado del género *Leuconostoc mesenterioide* por diferencias genéticas sobre todo que *Weissella* son más tolerantes al ClNa que *L. mesenteroides* y puede crecer en los medios con un pH inicial por debajo de 5. Hasta la fecha, se

han identificado diecinueve especies de *Weissella*, a saber, entre las importantes en productos lácteos son: *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis* y *W. viridescens* (Björkroth et al., 2002; Castañeda y Zepeda, 2016).

Weissella habita en una variedad de nichos naturales como vegetales frescos, alimentos fermentados, productos cárnicos, lodo de máquinas de ordeño, leche, sedimentos y peces de estuario de bahías y rumen bovino; así como tracto urogenital y gastrointestinal de humanos y muchos animales (Fusco et al., 2015). En algunos estudios, especies de *Weissella* han sido analizadas para actividad antimicrobiana, y en lo que respecta *W. paramesenteroides* posee esta actividad ya que produce compuestos que actúan como bacteriocinas (Serna et al., 2010; Emerenini et al., 2014; Fusco et al., 2015). *W. viridescens* se ha aislado a partir de muestras clínicas humanas y considerado un patógeno oportunista (Kamal et al., 2015).

Importancia en la Industria – La persistencia de *Weissella* como BAL no ha sido señalada población dominante en quesos madurados, sin embargo *W. paramesenteroides* es conocida en queso Cotija, como la especie que caracteriza al queso madurado de origen que se elabora en la Sierra de Jalmich entre Jalisco y Michoacán (Escobar et al., 2016). El género *Weissella* es una bacteria de interés en el ámbito de derivados lácteos en especial leches acidas, y que por su cualidad no se utilizada en el control de los defectos sensoriales en quesos; teniendo una aptitud de adaptación y persistencia en entornos de un queso duro, con capacidad proteolítica y lipolítica que no afecta significativamente a las características de sabor y aroma del queso como lo mencionan Lynch et al. (2014) en quesos Cheddar elaborados artesanalmente. Sin embargo, este género presenta capacidad de contribuir a la textura del queso, además de tener un potencial efecto promotor de la salud desarrollando funciones bioactivas en contra de patógenos como *Listeria spp* (Serna et al., 2010).

2.4. Bibliografía Citada

- Abdi, R., M.Sheikh-Zeinoddin and S. Soleimanian-Zad. 2006. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iranian Lighvan Cheese. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9:99-103.
- Alejo, M. K., Ortiz, H. M., Recino, M. B., González, C. N., & Jiménez, V. R. Tiempo de maduración y perfil microbiológico del queso de poro artesanal. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2: 15-24 (2015).
- Álvarez, F.G., Herrera, H.J., Alonso, B.G., Barreras, S.A. Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de Ciudad de México. *Arch Med Vet*, 44: 237-242 (2012).
- Avnikirmaci H, Hamdiozer B, Akcelik M, Akcelik N. 2016. Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. *International Journal of Dairy Tecnology*. 69: 301 – 307.
- Aydemir O, Harth H, Weckx S, Dervisoglu M, Vuyst L. (2015). Microbial communities involved in Kasar cheese ripening. *Food Microbiology*, 46: 587-595.
- Barrera CH.H. 2010. Caracterización molecular de la microbiota asociada al queso Cotija. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán Mexico.
- Björkroth,K.J., Schillinger U.,Geisen, R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel, W.H., Korkeala H., Vandamme, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov.,detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:141–148 (2002).
- Brooks J.C., Martinez B, Stratton J, Bianchini A, Krokstrom R, Hutkins R. Survery of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology* 31: 154-158 (2012)
- Caraffa I, Nardin T, Larcher R, Viola R, Tuohy K, Franciosi E. 2015. Identification and characterization of wild *Lactobacilli* and *Pediococci* from spontaneously fermented Mountain Cheese. *Food Microbiology* 48: 123-132.

- Caro I, Mateo J, Sandoval MH, Soto S, Garcia-Armesto MR, Castro JM. 2013. Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci* 96: 3461–3470.
- Castañeda A.F y Zepeda D.VJ. 2016. Identificación bioquímica de BAL aisladas de queso Crema Artesanal de Chiapas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez Chiapas México
- Chiodi A, Rivero J, Bruschi J. Variación del proceso tecnológico de queso Pategrás Argentino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias, 2017
- Chombo M.M.P, Kirchmayr M, Gschaedler A, Lugo C.E, Villanueva R.S. 2016. Effects of controlling ripening on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE, LWT. *Food Science and Technology*. 6: 1153 – 1161.
- Colombo F., Borgo F., Fortina M.G. Genotypic characterization of nonstarter lactic acid bacteria involved in the ripening of artisanal Bitto PDO cheese. *Journal of Basic Microbiology*, 49: 521-530 (2009)
- Cortes S.A de J, Días R.M, Sánchez M. M de L, Hernández A.A.J, Barrón S.L.R. 2015. Foodborne Diseases, Probiotics and Health. *Asiam Jr. Of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* Vol 17: 763 – 774
- Cuevas, G.P., Heredia, C.P., Méndez, R.J., Hernández, M.A., Reyes, D.R., Vallejo, C.B and González, C.A. (2017). Artisanal Sonoran cheese (Cocido cheese): an exploration of its production process, chemical composition, and microbiological quality. *J Sci Food Agric*, 97 4459 - 4466 (2017).
- Domínguez, L.A, A. Villanueva, C.M. Arriaga, A. Espinoza. 2011. Alimentos Artesanales y tradicionales: el queso Oaxaca como un caso de estudio del Centro de México. *Estudios Sociales*. 19:165-193.
- Domingos L. M.F.P, Stanton C. Ros P.R, Dapkevicius M.L.E, Silva C.C.G. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*. 63: 178 – 190.

- Duygu Ercan, Figen Korel, Hand Ors Ahin. 2014. Microbiological quality of artisanal Sepet cheese. *International Journal of Dairy Technology*. Vol 67: 384-396.
- Escobar ZA, Sánchez FA, Quirasco BM. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology* 2016; 57: 116–127.
- El Soda M, Ahmed N, Omran N, Osman G, Morsi A. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *J. Agric. Sci* 15: 51-71 (2003)
- Emerenini, E.C, Afolabi, O.R, Okolie, P.I, Akintokun, A.K. In vitro studies on antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from fresh vegetables for biocontrol of tomato pathogens. *Brit. Microbiol. Res. J.* 4: 351–359 (2014).
- Escobar ZA, Sánchez FA, Quirasco BM. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology* 2016; 57: 116–127.
- FAO/OMS. 2008. Leche y Productos Lácteos. 2da edición. Norma general del CODEX para el queso. CODEX Stan 283-1978. Revisión 1999, Enmienda 2006.
- Federal Drugs Administration (FDA) en Estados Unidos de América. 2012. Código 21 (CFR) 133, - Cheeses and Related Cheese Products. Ch. I (4-1-12 Edition)
- Forouhandeh, H, S.Z. Vahed and M.S. Hejazi. 2010. Isolation and Phenotypic Characterization of *Lactobacillus* Species from Various Dairy Products. *Current Research in Bacteriology*. 3:84-88.
- Fortino R.J, Villegas A, Mirnd R.L.A, García C.J.L. Identificación de bacterias ácido lácticas antagónicas de *Salmonella* entérica ver: *Typhimurium* aisladas de queso artesanal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 785-797 (2017).
- Francisosi, E.L. Settanni, A. Cavazza, E. Poznanski. Biodiversity and technological potential of wild lactic bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*. 19: 3-11 (2009).
- Fusco V, Quero G.M, Cho G.S, Kabisch J, Meske D, Neve H, et al. *The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front. Microbiol.* 6:155, p.1-22 (2015)

Gamboa, J.G, D. Rojas y E.J. Ramírez. 2012. Calidad fisicoquímica y sensorial de queso tipo Manchego durante la maduración. Revista Científica UDO Agrícola. 12:929-938.

Gastelum L, Silva PL, Muñoz del Real G, Martínez PJA, Beyliss CLA. Producción de Quesos Artesanales “Real del Castillo” en el Valle de Ojos Negros, Municipio de Ensenada, Baja California. In Presentation of the poster session at the meeting of V Seminario Córdoba. Alternativas para el Desarrollo Territorial 2013; octubre 10-12; Sistema Agroalimentarios Localizados en México, Red Científica–Red SIAL, Montecillos, Texcoco, Estado de México; 2013. p.224-228.

Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology 88: 215 – 222.

González M.L, y Franco F.M. Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. Braz. J. Food Technol, 18: 250-257 (2015).

González, C.A.F., Yescas, C., Ortiz, E.A.M., De la Rosa, A.M., Hernández, M.A., Vallejo, C.B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. J. Dairy Sci. 99, 3250–3262.

Gutierrez M.N., Vallejo C.B., Gonzalez C.A.F., Nevarez M.G.V., Rivera Ch.B. Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. J. Dairy Sci. 91(1): 49–57 (2008)

Heredia C.P.Y., Hernández M.A., González C.A.F., Vallejo C.B. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismo de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. Interciencia, 42 (6), 340-346 (2017).

Hernández, S. A. (2015). Caracterización del Queso Real del Castillo en Valle de Ojos Negros, Baja California. Tesis disertación Maestría. Available at: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=INDUSTRIAL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=006090> (Accesed on October 2017). UACH. Departamento de Ingeniería Agroindustrial.

Ispirili H, Denirbas F, Dertli E. Characterization of functional properties of *Enterococcus spp.* Isolated Turkish white cheese. Food Science and Technology, 75: 358-365 (2017).

- Kamal Kamboj, Amber Vasquez and Joan-Miquel Balada-Llasat. 2015. Identification and significance of *Weissella* species infections. *Front Microbiol* 6: 1204. (2015)
- Kongo, J.M. 2013. Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. Chapter 1. Lactic Acid Bacteria - R&D for Food, Health and Licesstock Purposes. 1a Edition. INTECHOPEN.COM. Rijeka, Croatia. p. 3-22.
- Longaray, D.A.P., Conte, P.A.C., Mandelli, F., Chequeller, R. and Echeverrigaray, S. (2012). Microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics of Serrano, an artisanal Brazilian cheese. *Food and Nutrition Sciences*, 3: 1068- 1075.
- Lorrungruang, C, K. Sinma, P. Pantagrud, S. Wannasirisuk, K. Mahabanha and K. Khucharoenphaisan. 2014. Red Cheese Production from Soymilk by *Monascus purpureus* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Sciences*. 14:2819-2824.
- Losito F, Arienzo A, Bottini G, Romana P.F, Mari A, Giovanni A. 2014. Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. *J. Dairy Sci*. 97:46-55.
- Lynch KML, McSweeney PLH, Arendt EK, Lowe TU, Galle S, Coffey A. Isolation and characterization of expolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. 2014. *Intenational Dairy Journal* 34: 125-134.
- Martínez, A. 2014. Elementos para la generación de propuestas de políticas públicas para la conformación del Plan Estatal de Ganadería Lechera de Baja California. Informe de Asesoría Técnica a Consejos de Desarrollo Rural Sustentable en Baja California. INCA, SAGARPA, SeFoA. Gobierno del Estado de B.C.
- Martínez LV, Moral VST, Sachman RB, Ramírez CLP, García GM. 2016. Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido-lácticas en lactosuero fermentado. *Revista Electrónica Nova Scientia [on line]* 8: 326-339
- Martínez, A.C.A., Silva, P.L.E., López, V.G., Medina, B.G*, Herrera, R.J.C., Monge, N.F., González, S.A., Inzunza, F (2017 october). Desarrollo del HACCP en la producción de queso artesanal en Ojos Negros, Baja California. In: Presentation of the XXVII Reunión internacional sobre producción carne y leche en climas cálidos, Ciencias Agrícolas UABC, 2017; Mexicali Baja California, México; p. 322-325

- Martins, J.M, E, Galinari, N.P. Pimentel-Filho, J. I. Ribeiro, M.M.Furtado, C.L.Ferreira. 2015. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46:219-230.
- Mandigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 2004. Phylum 2: Bacteria Gram Positivas, En: *Brock Biología de los Microorganismos*. 10a Edición Pearson Prentice Hall. España. p. 398-403.
- Manolopoulou, E, P. Sarantinopoulos, E. Zoidou, A. Aktypis, E. Moschopoulou, I.G. Kandarakis, and E.M. Anifantakis. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 82:153-161
- Marin P., Palmero D., Jurado M. Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International journal Dairy Technology*, 68: 565-571 (2015).
- Mazzeo M.M.H., Díaz A.F., Pérez B.L.E., León A.L., Castaño V.A.P., Jaramillo G.A.L. (2009). Desarrollo de procesos productivos de quesos madurados en tres municipios del departamento de Caldas Developing ripened cheese production in three municipalities in the Caldas department of Colombia. *Revista de Ingeniería e Investigación*. 29: 42-47.
- Milani E, Shahidi F, Mortazavi S.A, Saeedi M. 2017. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Kurdish Cheese During Ripening Using 16S RRNA Gene Sequence Analysis. *Journal Food Processing and Preservation* 41:1-8.
- Murphy, S, N.H. Martin, D.M, Barbano, and M. Wiedmann. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J. Dairy Sci*. 99:10128–10149
- Nada S., Djekic I, Tomasevic I, Miocinovic J, Gvozdenovic R. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. *Food Control* 25: 728-731 (2012).
- Nam HeeKim, Na YoungLee, Min GyuKim, Hye WonKim, Tae JinCho, In SunJoo, Eun JungHeo, Min SukRhee, Microbial criteria and ecology of commercially available processed cheese according to the product specification and physicochemical characteristics. *Food Research International* 106:468-474 (2018).

- Nieto, P, S. Seseña, J. M. Poveda, Ll. Palop and L. Cabezas. 2010. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. J. Food Microbiology. 27:85-93.
- Noa, P.M, Ruvalcaba B.S. 2011. Ciencia de la Leche. Una visión integral para México. Capítulo 1. Propiedades fisicoquímicas de la leche. 1ª Edición, Editorial Universitaria, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. p. 1-76.
- Norma Mexicana NMX-F-700-COFOCALEC. 2004. Sistema producto leche-Alimento lácteo cruda de vaca. Especificaciones fisicoquímicas y sanitarias y métodos de prueba. México (DF): Consejo para el fomento de la calidad de la leche y sus derivados. 2005.
- Norma Mexicana NMX-713-COFOCALEC. 2014. Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Quesos y Queso de Suero-Denominaciones, Especificaciones y Métodos de Prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA-2002. Secretaria de Salud. Productos y servicios. Leche, formula láctea y producto combinado. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243- SSA1-2010. Secretaria de Salud. Productos y Servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de Prueba. Diario Oficial de la Federación. 27/09/2010.
- Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Secretaria de Economía/Secretaria de Salud. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria. Diario Oficial de la Federación. 05/04/2010.
- Norma Oficial Mexicana NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018. Secretaria de Economía/ Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Queso-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba
- Ong, L and Shah, N.P. Influence of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on Proteolysis, Organic Acid Profiles, and ACE. Inhibitory Activity of cheddar Cheeses Ripened at 4, 8, and 12 °C, Journal of Food Science 73: M111-M120 (2008).

- Ortiz, 2006. Identificación Bioquímica de Bacterias Acido Lácticas Aisladas a partir de Productos Lácteos en el Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Instituto en Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, Hidalgo., México.
- Panizzolo, L.A., Araujo, A.C., Taroco, L.V., Rodríguez, A., Schopf G. Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos Danbo elaborados con distintos cultivos iniciadores. Innotec 6: 24-27 (2011).
- Parra, R. A. 2010. Review. Bacterias Acido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. Facultad en Ciencias Agropecuarias. 8:93-105.
- Ramírez, C y J.F. Vélez. 2012. Quesos Frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 6:131-148.
- Reyne J.J.A, Somkuti G.A, Van Hekken D.L, and Guerrero P.V.M. J. Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. J. Dairy Sci, 94: 3311-3315 (2011).
- Partovi H., Hassan Gandomi., Afshin A.B., Negin N., Gholamreza N.B., Mina Kargozari. Microbiological and Chemical properties Ofsiahmazgi Cheese, and Iranian artisanal cheese: isolation and identification of dominant lactic acid Bacteria. Journal of Food Processing and Preservation, 39: 871-880 (2015)
- Reale A, Di Renzo.T, Zotta T, Prezioso M, Boscaino F, Ianniello R, Storti .V, Tremonte P, Coppola R. Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. LWT- Food Science and Technology. 73:622-629 (2016)
- Reyne J.J.A, Somkuti G.A, Van Hekken D.L, and Guerrero P.V.M. J. Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. J. Dairy Sci, 94: 3311-3315 (2011).
- Sánchez, I, S. Seseña, J.M. Poveda, L. Cabezas, L.L. Palop. 2006. Genetic Diversity dynamics and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. Int. J. Food. Microbiol. 107: 265-273.
- Sánchez, L y J. Tromps. 2014. Caracterización In vitro de bacterias ácido-lácticas con potencial prebiótico. Rev. Salud Anim. 36:124-129.

Sánchez G.C., Hicks P.L., Gutierrez M.N., Heredia N., Garcia S., Nevarez M.GV. Microbiological Changes during Ripening of Chihuahua Cheese Manufactured with Raw Milk and Its Seasonal Variations. *Foods*, 7, 153 (2018)

Serna CL, Valencia HLJ, Campos G.R. Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 2010; 55: 55-65.

SIAP “Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera”, (2018). Panorama de la Lechería en México: boletín de leche diciembre 2017. Available at: <https://www.gob.mx/siap/es/prensa/boletin-de-leche-155932?idiom=es> fecha 04/05/2018 (Accessed on May 20/6/2018). . Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México.

Silva, P.L. 2013. Informe de Servicio de Extensionismo: Sanidad e Inocuidad en la Producción de Queso en Ojos Negros Ensenada, B.C. Documento Técnico. Programa de Desarrollo de Capacidades, Innovación Tecnológica y Extensionismo Rural – FOFAEBC-UABC. Mexicali Baja California.

Silva, P.L., Chávez, C.L., Lerma, Ch.T., González, S.A., Gómez, M.D., Camacho, G.K., Valenzuela, P.R., Venegas, S.G., Flores, R.C., Gastélum, L., Trillo, T.C., Espinosa, V.J (2014, noviembre). Calidad Fisicoquímica, Nutricional e Higiénica de la Leche Cruda en Unidades de Producción Familiar de Queso, en el Valle de Ojos Negros, Ensenada, B.C. México. In: Presentation of the poster session at the meeting of the XVI Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos and of the XXXI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos, Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

Silva, P.L., López V.G, Medina B.G., Montañó G.M., Herrera R.J., Villa A.R., Alday M.C., González S.A., Inzunza F., López S.A., Felipe G.G. Dinámica poblacional y tipificación de bacterias ácido-lácticas en la maduración del queso de ojos negros, Ensenada B.C, México (resultados preliminares). In: Presentation of the poster session at the meeting of the XXVII Reunión internacional sobre producción carne y leche en climas cálidos, Ciencias Agrícolas UABC, 2017; october 5-6; Mexicali Baja California, México; p. 326-330.

Simões, M.G., Portal, R.E., Rabelo, J.G., Ferreira, L.F. Seasonal Variations Affect the Physicochemical Composition of Buffalo Milk and Artisanal Cheeses Produced in Marajó Island (Pa, Brazil). *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6:81-91 (2014).

- Sociedad e Productores Lácteos de Ojos Negros S.A de C.V. 2015. Propuesta de Intervención de Innovación y Extensionismo (PIIEX). Documento técnico. Ensenada Baja California.
- Solís, M.A.D., Estrada F.J.G., Castelan, O.O.A. A study on the texture diversity of the Artisan Ranchero Cheese from Central Mexico. *International Journal of Dairy Technology*. 66:37-44 (2013).
- Stefanovic E, Kilcawley K.N, Roces C , Rea C.M, O'Sullivan M, Sheehan J.J, McAuliffe O. Evaluation of the Potential of *Lactobacillus paracasei* Adjuncts for Flavor Compounds Development and Diversification in Short-Aged Cheddar Cheese. *Frontiers in Microbiology* 9: 1-12 (2018).
- Terzic V.A, Mihajlovic S, Uzelac G, Veljovic K, Tolinacki M, Nikolic M, Topisirovic L, Kojic M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik Young cheeses, sweet cream and sweet kajmaks over four seasons. *Food Microbiology*, 39: 27-38 (2014)
- Torres, M.J, B. Vallejo, M.E, Díaz, M.A, Mazorra, A.F, Gonzalez. 2006. Characterization of natural microflora of artisanal Mexican Fresco Cheese. *Food Control*. 17:683-690.
- Tornadijo, M. E., Marra, A. I.; García F.M.C., Prieto, B.2; Carballo, J.1998. Calidad de la Leche destinada a la fabricación de Queso: Calidad química. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2: 79-91.
- Vega, C.H, I. A. Trujillo, E.I. Alvizo, G. Jiménez, L.M. Anaya, R.E. Lara, H. Ramírez y M.D. Méndez. 2013. Producción de Inhibidores Bacterianos por Cepas de Bacterias Acido Lácticas Aisladas a partir de Leche Cruda. XV. Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos., Guadalajara Jal. P.315-318.
- Villanueva C.A., Esteban Ch.M., Espinosa O.A., Arriaga J.C.M., Domínguez L.A. Oaxaca cheese: flavour, texture and their interaction in a Mexican traditional pasta filata type cheese. *CyTA - Journal of Food*. 10: 63-70 (2012).
- Villegas de Gante, A., Santos M. A. & Cervantes, E. F. (2016). Los Quesos Mexicanos Tradicionales (1ª ed). Juan Pablos Editor, (Capítulo 2). Available at: <https://www.researchgate.net/publication/31420697> (Accessed on March 3, 2018).

Yohan, Y., Somin, L. & Kyoung, H. C. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. Food Control, 63: 201-215 (2016).

3. ARTÍCULOS CORRESPONDIENTES

3.1. Artículo aceptado para publicación:

Revista Mexicana en Ciencias Pecuarias

**Caracterización de la leche y queso artesanal de la región de Ojos Negros Baja
California, México**

**Characterization of milk and artisanal cheese from the Ojos Negros region of Baja
California, Mexico**

Laura Elena Silva-Paz^a, Gerardo Enrique Medina-Basulto^a, Gilberto López-Valencia^{a,*},
Martin Francisco Montaña-Gómez^a, Rafael Villa-Angulo^b, José Carloman Herrera Ramírez^a,
Ana Laura González-Silva^a, Francisco Javier Monge-Navarro^a, Sergio Arturo Cueto-
González^a, Gerardo Felipe-García^a.

^a Institute for Research in Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California,
Mexicali, Baja California, México

^b Engineering Institute, Autonomous University of Baja California, Mexicali, Baja California,
México

Resumen

La comunidad de Ojos Negros está ubicada en el municipio de Ensenada Baja California, México. Desde 1930, los residentes locales fabrican un queso artesanal muy apreciado en la región; sin embargo, la leche cruda y el queso nunca han sido analizados por la calidad microbiológica y de higiene del producto final. El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad microbiológica, física y química de la leche cruda utilizada para producir queso y el queso artesanal producido en las 22 unidades de producción individuales. Se tomaron muestras de queso y leche de las unidades de producción para realizar pruebas microbiológicas. Se realizaron determinaciones físicas y químicas de proteínas, grasas y lactosa utilizando un analizador LACTOSCAN-S. Los resultados del análisis de la leche mostraron un contenido de proteína (33,11 g/l) y grasa (39,89 g/l) dentro de los parámetros de

la normatividad. Para la calidad microbiológica de la leche, los resultados del recuento de mesófilos aeróbicos mostraron un cumplimiento del 64% con las regulaciones; sin embargo, el mismo conteo de mesófilos aeróbicos en las muestras de queso resultó en solo el 4% de cumplimiento con las regulaciones. No hubo detección de *Salmonella spp.* o *Listeria monocytogenes* en cualquiera de las muestras de leche o de queso probadas. Se deben incorporar buenas prácticas sanitarias y de fabricación para mejorar la calidad sanitaria y de higiene para la producción de queso artesanal en la comunidad de Ojos Negros.

Palabras claves: Ojos Negros, queso artesanal, composición química, calidad microbiológica.

Abstract

The Ojos Negros's community is located in the municipality of Ensenada Baja California, Mexico. Since 1930, local residents manufacture an artisan cheese highly appreciated in the region; however, raw milk and cheese never have been analyzed for microbiological and hygiene quality of the final product. The objective of the present study was to evaluate the microbiologic, physical and chemical quality of the raw milk used to produce cheese and the artisan cheese produced in the 22 individual production units. Cheese and milk samples were collected from production units for microbiological testing. Physical and chemistry determinations for protein, fat and lactose was performed using a LACTOSCAN-S analyzer. Results from milk analysis shown a protein (33.11 g/l) and fat (39.89 g/l) content within the parameters of the regulation codes. For microbiological quality of milk, the results of the aerobic mesophiles count shown a 64% compliance with regulations; however, the same aerobic mesophiles count in cheese samples resulted in only 4% of compliance with regulations. There was no detection of *Salmonella spp.* or *Listeria monocytogenes* in any of the milk of cheese samples tested. Good sanitary and manufacturing practices need to be incorporated to improve sanitary and hygiene quality for the production of artisan cheese in the Ojos Negros community.

Key words: Ojos Negros, Artisan cheese, chemical composition, microbiological quality

En México la elaboración de queso artesanal por parte de medianos y pequeños productores se estima en alrededor del 25% del total producido al año⁽¹⁾. La elaboración y venta de quesos artesanales constituye una de las principales fuentes de ingresos para pequeños ganaderos a

pesar de la baja rentabilidad de su actividad^(2,3). En la región de Ojos Negros del municipio de Ensenada Baja California México desde 1930 se elabora en forma artesanal el llamado “queso prensado de Ojos Negros”. Actualmente la producción de éste queso (producido a partir de leche sin pasteurizar) alcanza las 30 toneladas mensuales, mismas que sustentan aproximadamente a 65 familias⁽⁴⁾. Sin embargo, los productores de queso se enfrentan a un nuevo reto ya que las regulaciones mexicanas establecen que la leche utilizada para producción de queso debe ser pasteurizada⁽⁵⁾. Adicionalmente deben instrumentarse prácticas sanitarias para garantizar un producto inocuo y no represente un riesgo para el consumidor⁽⁶⁾. En 2010 los productores regionales organizaron una asociación afín de buscar asistencia técnica, logrando el desarrollo de unidades de producción; sin embargo, la calidad microbiológica del producto es cuestionable dada la utilización de leche sin pasteurización, aunado a la ausencia de un sistema apropiado de buenas prácticas de manufactura⁽⁷⁾. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue realizar un análisis situacional la calidad microbiológica y fisicoquímica de la leche y queso producido en las 22 unidades queseras de dicha región. El estudio se llevó a cabo en 22 unidades de producción (UP) de queso artesanal situadas en la localidad de Ojos Negros Municipio de Ensenada Baja California México (31°45' y 32°04' latitud norte y 116°06' y 116°27' longitud oeste). El total de las UP se encuentran dentro del programa de control de tuberculosis y brucelosis. El sistema de producción es semi-extensiva (libre pastoreo y estabulación), poseen infraestructura y equipo adecuado para producir leche y quesos a escala familiar. En promedio cada hato produce 450 litros diarios de leche mismos que son destinados a la elaboración de queso artesanal. Los productores se encuentran en la fase inicial de instrumentar un programa de buenas prácticas de manufactura e higiene. Las muestras de leche de todas las UP fueron colectadas el mismo día de acuerdo a las especificaciones de la NMX-F-718-COFOCALEC⁽⁸⁾. De cada UP se obtuvieron 100 mL de la leche del tanque para determinar su calidad sanitaria; la toma de muestras de queso se realizó siguiendo las directrices de la NOM-109-SSA⁽⁹⁾. De cada UP se recolectó una pieza de queso entero de aproximadamente 2.5 kg, en una sola ocasión. Las muestras de leche y queso fueron trasladadas en hielera portátil a una temperatura de entre 7 y 10°C al Laboratorio de Análisis de Leche del IICV de la UABC, para su posterior procesamiento.

Los Análisis microbiológicos para leche y quesos, se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en los apéndices B10, B16, B17 de la NOM-243-SSA1⁽⁵⁾. Requiriendo

para leche y queso 1mL y 10g de muestra disueltos en 9 mL y 90mL de agua peptonada bufferada 1% (Difco, New Jersey) respectivamente. Para el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada muestra, se realizaron cinco diluciones depositando 1mL en placas por duplicado para bacterias mesófilas aerobias en Agar Cuenta Estándar (MCD Lab, Tlalnepantla, México), las placas que registraron entre 25 a 250 colonias fueron seleccionadas para conteo. Para determinar coliformes fueron seleccionadas aquellas placas con registro de 30 a 300 colonias, y para el conteo de Hongos y levaduras, 1 mL de cada dilución fueron sembradas y analizadas a los cinco días. Para el análisis de *Salmonella* 10mL de leche y 10g de queso fueron pre-enriquecer en 90mL de Agua Peptonada (Difco, New Jersey) y después de 24h de incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ fueron enriquecidos en caldo Tetrathionato (Difco, New Jersey) y RappaportVassilidis (Difco, New Jersey) para posteriormente enriquecer la muestra, sembrando en medios agar XLD (Difco, New Jersey), Hecktona (Difco, New Jersey) y Verde Brillante (Difco, New Jersey). Procediendo a identificar mediante pruebas bioquímicas TSI (BD Bioxon, Cuititlan Estado de México), LIA (BD Bioxon, Cuititlan Estado de México), Urea (Difco, New Jersey) y RMVP (Difco, New Jersey). Para el análisis de *Listeria monocytogenes* 25g de muestra de queso fue homogenizada en 225mL de caldo UVM (Difco, New Jersey) e incubando a 30°C por 24h, para posteriormente enriquecer en 10mL de caldo Fraser (Difco, New Jersey) por 24hrs a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se realizaron siembras en placas agar Oxford (Difco, New Jersey), las colonias con pigmentación color café con un halo fueron aisladas para su purificación e identificación en agar Infusión Cerebro Corazón (Difco, New Jersey) mediante morfología de cocobacilo en cadena Gram positivo, motilidad positiva a $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$, prueba de oxidasa negativa, catalasa positiva y prueba API-Listeria (bioMérieux, St. Louis, MO) respectivamente para su confirmación, siguiendo los procedimientos respectivos del apéndice B13 y B12 de la NOM-243-SSA⁽⁵⁾. La acidez en la leche se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la NOM-155-SCFI⁽¹⁰⁾, y el pH se evaluó con un potenciómetro (Hanna Instruments, Carrolton TX). La determinación fisicoquímica se realizó utilizando el analizador LACTOSCAN-S (Milk Analyzer LTD modelo LS 90, Bulgaria) para determinar el porcentaje de proteína, grasa, lactosa en la leche. Para cada una de las variables analizadas se calculó la media $\pm$ error estándar. Se utilizó la prueba t de Student para detectar diferencias estadísticamente ($p < 0.05$) entre los promedios de cada parámetro comparado con los valores deseables de las NOM que apliquen. Los resultados de la calidad fisicoquímica y nutricional de leche utilizada en la elaboración de queso artesanal en 22 UP de la región de Ojos Negros,

México se presentan en el cuadro 1. Donde se observa diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los promedios detectados de proteínas para cada clase (A, B y C) con respecto al parámetro de referencia que indica la normatividad NMX-F-700-COFOCALEC⁽¹¹⁾. Con respecto a la grasa, la clase A no mostró diferencia ($p > 0.05$) entre el parámetro deseable de la NOM y el valor promedio. Sin embargo, cuando se comparó el promedio para la clase C contra el parámetro deseable se identificaron diferencias significativas ($p < 0.05$). En nuestro estudio las cifras para las clases A de proteínas (32.98) y de grasa (36.62) fueron mejores que los reportados por Bernal⁽¹²⁾ en pequeños hatos lecheros procedentes del Estado de México y de Oliszewski⁽¹³⁾ en hatos lecheros de la región rural de Cuenca de Trancas en Argentina donde se aprecian menor cantidad de proteína (30.55 g/l) y de grasa (34.0 g/l), sin embargo ambas cifras son consideradas leche de buena calidad. Una posible explicación a estas variaciones pudiera ser el manejo alimenticio de la vaca con respecto al racionamiento de nutrientes, libre pastoreo o a factores genéticos en las razas de animales como lo señalan De la Cruz⁽¹⁴⁾. Con respecto a la lactosa el 73% de las UP presentaron un nivel deseable y no fue diferente estadísticamente ($p > 0.05$) con el parámetro deseable de la NOM. Con respecto al 27% de las UP que fueron identificados con bajos niveles de lactosa una posible explicación es que también fueron identificadas con casos de mastitis, es conocido que esta enfermedad propicia una reducción en la secreción de lactosa en la leche^(15,16). Con respecto al ácido láctico solo el 18% de las UP se encontraron en niveles aceptables de acuerdo la norma. Además, el 68% de las UP superaron el parámetro de la norma ($p < 0.05$). Una posible explicación es que las poblaciones bacterianas degradan lactosa a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento desarrollando progresivamente acidez en la leche^(17,18,19). Por otra parte el 68% de las UP presentaron un promedio de pH deseable, mientras que el 18% de las UP mostraron un promedio de pH > 6.95 ($p < 0.05$) esto puede ser explicado en parte porque la leche la mantienen en almacenamiento más de 6 horas a temperatura ambiente (entre 15 a 32°C) esto propicia un incremento de los microorganismos lácticos y sobretodo coliformes y con ello un incremento en su acidez^(19,20). Al comparar nuestros promedio observado de acidez titulable (1.720 g/L) y pH (6.70) se aprecian similares al informado en la región de Argentina por Oliszewski⁽¹³⁾, con una acidez de 1.726 g/L y 6.75 de pH.

El cuadro 2, muestra la calidad microbiológica de la leche utilizada en la elaboración de queso artesanal en 22 UP de la región de Ojos Negros. Los resultados muestran que el 64% de las

UP obtuvieron promedios entre deseables (50%) y aceptables (14%) con respecto a la NMX-F-700-COFOCALEC⁽¹¹⁾ para mesófilos aerobios. Estas cifras son similares a los reportado por Oliszewski (4.94 log UFC/mL)⁽¹³⁾. Con respecto a los promedios de las clases no deseables (3 y 4) al compararlos con el parámetro de referencia se detectó diferencia significativa ($P < 0.05$). Resultados similares fueron obtenidos por Perkins⁽²¹⁾ y De la Cruz⁽¹⁴⁾, mismos que señalaron que cuentas de mesófilos > 6 log indican problemas sanitarios del hato. Una posible explicación es que los hatos no cuentan con un programa de medicina preventiva secundaria que permita identificar problemas sanitarios entre ellos mastitis subclínica lo que se reflejan en altos niveles de mesófilos. Además el 100% (22) de las UP presentaron un promedio de coliformes no deseables ($p < 0.05$) por encima de la normatividad (NOM-243-SSA1)⁽⁵⁾. Aunque nuestros resultados se aprecia más bajo a los reportados por Oliszewski⁽¹³⁾ con 5.64 log UFC/mL. El incremento de mesófilos y coliformes no necesariamente indica una contaminación fecal directa en la leche pero si precisan deficiencias de higiene y rutinas de ordeña sin buenas prácticas de manejo durante la obtención y almacenamiento de la leche^(14,22,23). Otro aspecto relevante fue que en ninguna de las UP se identificó *Salmonella spp*, ni *Listeria spp*, lo cual es deseable ya que estas bacterias representan un riesgo para la salud del consumidor⁽²⁴⁾.

La calidad microbiológica del queso producido en las 22 UP se muestra en el cuadro 3 donde se observa que únicamente el 18% de las UP presentaron conteos similares estadísticamente ($p > 0.05$) al parámetro deseable de mesófilos aerobios. El resto de las UP mostraron promedios no deseables ($p < 0.05$) de mesofilos por encima de la normatividad (NOM-243-SSA1)⁽⁵⁾. Con respecto a coliformes el 100% de las UP presentaron cifras promedio por encima del parámetro establecido por normativa ($P < 0.05$). La alta incidencia de coliformes y de mesófilos en los quesos de las UP indica deficiencias en las prácticas de higiene y manufactura. Una posible explicación a estos es que el queso se elabora con leche conservada a una temperatura promedio de 20°C. Diversos estudios muestran que la temperatura de conservación es un factor importante que puede contribuir en el incremento de microorganismos alterantes dañando su estabilidad, mismos que de no ser controlados podrían tener un efecto directo sobre la calidad y la vida útil del queso^(25,26,23,19). Es importante destacar que valores superior a $\geq 6 \log_{10}$ mesófilos y $\geq 5 \log_{10}$ de coliformes también fueron reportados en otros estudios^(27,28,29,30). Torres⁽³¹⁾ mencionan que el incremento de mesófilos aerobios se considera un proceso normal en los primeros 30 días de su elaboración debido a que se presentan

reacciones químicas que acompañan la multiplicación de microorganismos durante la coagulación y drenaje del suero, debido a la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL). En relación a bacterias patógenas como *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* no se detectaron en el queso prensado cumpliendo con lo establecido en la regulación mexicana.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Los productores de queso de la región de Ojos Negros tienen más de 88 años produciendo este queso artesanal mismo que es ampliamente apreciado por el consumidor. Sin embargo, no existía información sobre la calidad del mismo. Este trabajo representa el primer estudio sobre calidad la calidad sanitaria y fisicoquímica de la leche y el queso producido en esta región. Los resultados muestran que algunos parámetros de calidad fisicoquímica tales como la proteína, grasa y lactosa superan a los parámetros deseables de la normatividad. Otro aspecto relevante fue que en ninguna de las UP se identificó *Salmonella spp*, ni *Listeria spp*, lo cual es deseable ya que estas bacterias representan un riesgo para la salud del consumidor. Sin embargo, la calidad sanitaria de la leche y el queso en algunos indicadores se encuentra por encima de los parámetros que exige la normatividad. Por lo anterior, es imperativo que estas UP continúen trabajando sobre la instrumentación de un programa de medicina preventiva que atienda los casos de mastitis infecciosa y sobretodo continuar con la capacitación a los productores para mejorar la calidad microbiológica de la leche y queso a fin de mejorar indicadores fuera de norma.

La producción artesanal del queso de ojos negros tiene en la región una notable importancia cultural, socio económico y gastronómico sin embargo deberá mejorar sus procesos para cumplir con los requisitos establecidos por la legislación actual para garantizar la inocuidad, asegurar su subsistencia y proteger el patrimonio cultural de este queso.

LITERATURA CITADA

1. González CAF, Yesecas C, Ortiz EAM, De la Rosa AM, Hernández MA and Vallejo CB. Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *J.Dairy Sci* 2016; **99**:3250-3262.
2. Alejo MK, Ortiz HM, Recino MBR, González CN, Jiménez VR. Tiempo de maduración y perfil microbiológico del queso de poro artesanal. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 2015; **2**:15-24.

3. Yohan Y, Somin L and Kyoung HCh. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control* 2016; **63**:201-215.
4. Silva PL. Proyecto Extensionismo para Gestión de las BPM en la Producción Inocua de Quesos en Ojos Negros Real Castillo. 2014. Informe del Servicio 2013-FOFAEBC-UABC, Mexicali BC.
5. Secretaria de Salud, NOM-243-SSA-2010. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Available:<http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Paginas/Normas-Oficiales-Mexicanas.aspx>. Accessed Sep 8, 2017.
6. Costa DMA, Sant´Ana AS, Cruz AG, Faria JF, Fernandes OC and Bona E. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unity of mozzarella cheese in Brazil. *Food Control* 2012; **24**:199-205.
7. Gastélum LL. Estudio para la detección de necesidades de infraestructura e equipamiento en las unidades de producción de leche en la Región de Ojos Negros. Gobierno del Estado de BC. 2010, Informe del Servicio 2010.
8. Consejo para el Fomento de la Calidad de la leche y sus derivados, A.C. (COFOCALEC), NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema Producto Leche - Alimentos - Lácteos - Guía para el muestreo de leche y productos lácteos. Available: http://www.cofocalec.org.mx/catalogo/por_clave=2014. Accessed Sept 9, 2017.
9. PROY-NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Available: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf>. Accessed Sep 8, 2017.
10. Secretaria de Economía (MX), NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Available:<https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/BusquedaNormas.xhtml>. Accessed Sep 8, 2017.
11. Consejo para el Fomento de la Calidad de la leche y sus derivados, A.C. (COFOCALEC), NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Sistema Producto Leche – Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. Available: http://www.cofocalec.org.mx/catalogo/por_clave=2014. Accessed Sep 8, 2017.

12. Bernal MLR, Rojas GMA, Vázquez FC, Espinoza OA, Estrada FJ, Castelán OO. Determinación de la calidad fisicoquímica de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regiones del Estado de México. *Vet. Méx* 2007; 38: 395–407
13. Oliszewski R, Cisint JC, Medina CF. Caracterización Composicional Fisico-química y Microbiológica de Leche de Vaca de la Cuenca de Trancas. *RAPA* 2016; 36: 31-39.
14. De la Cruz EG, Diaz PS, Bonifaz N. Gestión de la Calidad de Leche de Pequeños y Medianos Ganaderos de Centros de acopio y queserías artesanales, para la mejora continua. Caso de estudio: Carchi, Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 2018; 27: 124-136.
15. Hess HD, Flores H, Lascano CE, Baquero LA, Becerra A, Ramos J. Fuentes de variación en la composicion de la leche y niveles de urea en sangre y leche de vacas en sistemas de doble propósito en el trópico bajo de Colombia. *Pasturas Tropicales* 1999; 21:33–42
16. Magariños H. Producción higiénica de la leche cruda. Guatemala: Producción y Servicios Incorporados S.A; 2001. pp 1-45.
17. Oliszewsky R, Cisint JC and Nuñez KM. Manufacturing characteristics and shelf life of Quesillo, and Argentinean traditional cheese. *Food Control* 2007; **18**:736-741.
18. Fuentes CG, Ruiz RRA, Sánchez GJI, Ávila RDN, Escutia SJ. Análisis Microbiológico de la Leche de Origen Orgánico Atributos Deseables para su Transformación. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 2013; **10**:419-432.
19. Castro CG, Martínez CFE, Martínez CAR, Espinoza OA. Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2013; **33**:105-109.
20. Rojas AM, Montaña LP, Bastidas MJ. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Rev.Colomb.Quim* 2015; **44**:5-10.
21. Perkins NR, Kelton DF, Hand KL, MacNaughton G, Berke O, Leslie KE. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality of dairy farms in Ontario, Canada. *J.Dairy Sci* 2009; **92**: 3714-3722.
22. Brousett, MM., Torres JA, Chambi RA, Mamani VB, Gutiérrez SH. Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de leche cruda en las cuencas ganaderas de la región Puno-Peru. *Scientia Agropecuaria* 2015; **6**:165-176.

23. Yucel N and Huriye U. A turkey survey if higiene indicator bacteria and Yersinia enterocolitica in raw milk and cheese samples. *Food Control* 2006; **17**:383-388.
24. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos EH. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 2010; **21**:805-815.
25. Millogo V, Svennersten SK, Ouedraogo GA and Agenas S. Raw milk higiene farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food Control* 2010; **21**:1070-1074.
26. Cuevas GPF, Heredia CPY, Méndez RJI, Hernández MA, Reyes DR, Vallejo CB and González CAF. Artisanal Sonoran cheese (Cocido cheese): an exploration of its production process, chemical composition, and microbiological quality. *J Sci Food Agric* 2017; **97**:4459-4466.
27. Di Cagno R, Banks J, Sheehan L, Fox PF, Brechany EY, Cosetti A and Gobbetti M. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *Int Dairy J* 2003; **13**:961-972.
28. Martínez A, Villoch A, Ribot A, Ponce P. Evaluación de la Calidad e Inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba. *Rev Salud Anim* 2013; **35**:210-213.
29. Chombo MP, Kirchmayr M, Gschaedler, Lugo CE and Villanueva RS. Effects of controlling ripening conditions of the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *Food Science and Technology* 2016; **65**:1153-1161.
30. Sánchez VJJ, Colín NV, López GF, Avilés NF, Castelán OOA, Estrada FJG. Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Pública de México* 2016; **58**:461-467.
31. Torres LLMJ, Vallejo CB, Diaz CME, Mazorra MMA and Gonzalez CAF. Caharcterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control* 2006; **17**:683-690.

Cuadro 1: Calidad fisicoquímica y nutricional de leche utilizada en la elaboración de queso artesanal en 22 UP de la región de Ojos Negros, México.

Indicador ²	Valores de Referencia ²		
	g/L	N (%)	Media (DS) ¹
Proteína g/L	Clase A deseable ≥ 31 a	14 (63%)	32.98 ^b (0.287)
	Clase B mínimo 30 -30.9	6 (27%)	30.46 ^b (0.116)
	Clase C mínimo 28 a 28.9	2 (10%)	28.10 ^b (0.100)
Grasa g/L	Clase A deseable ≥ 32 a	10 (46%)	35.62 ^a (3.949)
	Clase B mínimo 31	1 (4%)	31.50
	Clase C mínimo 30	11 (50%)	27.01 ^b (1.138)
Lactosa g/L	Deseable 47.5 ^a	15 (73%)	47.74 ^a (0.495)
	No deseable < 44	7 (27 %)	42.80 ^b (0.728)
Ácido láctico g/L	No deseable ≥ 1.9	15 (68%)	2.438 ^b (0.076)
	Deseable 1.3 – 1.8 ^a	4 (18%)	1.720 ^b (0.080)
	No deseable ≤ 1.29	3 (14%)	1.153 ^b (0.016)
pH	No deseable ≥ 6.9	4 (18%)	6.95 ^b (0.016)
	Deseable 6.5-6.8 ^a	15 (68%)	6.70 ^a (0.045)
	No deseable ≤ 6.4	3 (14%)	6.33 ^a (0.066)

¹ Valores que representan la media $\pm$ desviación estándar

² NMX-F-700-COFOCALEC-2012.

t student ($p < 0.05$) la letra ^(a) en el superíndice indican diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de cada variable detectada comparado con los valores de la norma y ^(b) $p > 0.05$

Cuadro 2. Calidad microbiológica de la leche utilizada en la elaboración de queso artesanal en 22 de la región de Ojos Negros, México.

Indicador	Valores de referencia (log ₁₀ CFU/ mL ⁻¹)	N (%)	Media (SD) ¹
² Cuenta mesófilos aerobios /mL			
Clase 1	≤100,000 UFC/ml (≤5.0) ^a	11 (50%) Deseable	1.67 ^b (0.189)
Clase 2	101,000-300.000 (5.1 – 5.47)	3 (14%) Aceptable	5.11 ^a (0.110)
Clase 3	≥301,000 – 599,000 (≥5.48 – 5.77)	1 (4%) No deseable	5.60
Clase 4	≥600,000 – 1,200,000 (≥5.78)	7 (32%) No deseable	7.53 ^b (0.348)
³ Coliformes UFC/mL			
	≤10 UFC/mL (≤ 1)	ND Deseable	
	<11-100 UFC/mL (1.04-2.0)	1 (5%) No deseable	2.00
	≥101 UFC/mL (≥2.1)	21 (95%) No deseable	5.589 ^b (0.384)
³ <i>Salmonella spp</i> 25g	Ausencia	22 (100%)	
³ <i>Listeria monocytogenes</i> 25g	Ausencia	22 (100%)	

¹ desviación estándar

²NMX-F-700-COFOCALEC-2012

³NOM-243-SSA1-2010. Métodos de prueba: coliformes totales <10 UFC (≤1 log₁₀ CFU mL⁻¹)

ND – no detectado

t student (p<0.05) la letra ^(a) en el superíndice indican diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de cada variable detectada comparado con los valores de la norma y ^(b) p>0.05

Cuadro 3. Calidad microbiológica del queso artesanal de 22 UP de la región de Ojos Negros, México.

Indicador	Valores de referencia ² (log ₁₀ CFU/ g ⁻¹)	N (%)	media (DS) ¹
Cuenta mesófilos aerobios	≤100,000 UFC/ml (≤5) ^a	4 (18%) Deseable	4.65 ^a (0.472)
	101,000-2,430,000 (5.1 – 6.4)	3 (14%) No deseable	6.43 ^b (0.115)
	>3,120,000 (≥6.5)	15 (68%) No deseable	7.26 ^b (0.420)
Coliformes	<100 UFC (≤ 2.0) ^a	ND Deseable	--
	990 – ≥184,000 (3 – ≥5)	22 (100%) No deseable	5.20 ^b (0.182)
<i>Salmonella spp</i> 25g	Ausencia	22(100%) Deseable	
<i>Listeria monocytogenes</i> 25g	Ausencia	22(100%) Deseable	
² Mohos y Levaduras	500 UFC/g (2.7) ^a	1 (4%) Deseable	2.70
	>500 UFC/g (>2.71)	21 (96%) No deseable	4.57 ^b (0.230)

¹Desviación estándar.

²NOM-243- SSA1-2010 coliformes totales <100 UFC (≤ 2.0 Log₁₀ CFU mL⁻¹)

t student (p<0.05) la letra ^(a) en el superíndice indican diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de cada variable detectada comparado con los valores de la norma y ^(b) p>0.05

3.2. Artículo enviado para revisión

Revista Archivos de Zootecnia

Identificación de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales de Baja California, México, por secuenciación del gen ARNr 16S

Identification of lactic acid bacteria in artisanal cheeses from Baja California, Mexico, by sequencing the 16S rRNA gene

¹Silva, P.L.; ¹López, V.G.; ¹Montaño, G.M.; ²Villa, A.R.; ¹Herrera, R.J.; ¹González, S.A.; ¹Inzunza, A.F.; ¹Gutiérrez, F.K.; ¹Monge, N.F.; ¹Martínez, A.C.; ¹Felipe, G.G. y @¹Medina, B.G.

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Mexicali. Baja California. México.

²Instituto de Ingeniería. Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Mexicali. Baja California. México

@¹Email de correspondencia/ correspondence e-mail: gerardom@uabc.edu.mx

PALABRAS CLAVES ADICIONALES:

Diversidad bacteriana.

Bacterias ácido lácticas.

Queso artesanal.

Secuenciación ARNr 16S.

Región ojos negros.

ADDITIONAL KEYWORDS:

Bacterial diversity.

Lactic acid bacteria.

Artisanal cheese. sequencing 16S rRNA.

Ojos negros región.

Resumen

En este estudio, se identificaron 43 aislados de bacterias ácido láctico (BAL) en distintos quesos elaborados con leche cruda de vaca a diferentes tiempos de maduración en dos estaciones del año. La identificación fue realizada por amplificación del gen bacteriano ARNr 16S por PCR y secuenciación. Las especies *Enterococcus faecalis* (27.9%) y *Lactobacillus plantarum* (32.6%) se encontraron durante todo el periodo de maduración de los quesos en invierno, en tanto en verano solo *L. plantarum* prevaleció durante todo el proceso de maduración. *Enterococcus faecium* (11.7%) y *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (14%) perduró en ambas estaciones en diferentes tiempos de maduración. *Weissella paramesenteroides* (2.3%) se encontró solo durante el periodo invernal, en tanto en verano se encontraron *Lactobacillus paracasei* (2.3%), *Lactobacillus rhamnosus* (2.3%), *L. lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* (2.3%) y *Weissella viridescens* (11%). En el presente estudio las especies identificadas sugieren que el queso de esta región tiene características microbiológicas distintivas y que éstas varían en función de la estación del año, haciendo necesaria una estandarización o inocular cepas de BAL locales para mantener las características deseadas en el queso durante todo el año.

Summary

In this study, 43 isolates of lactic acid bacteria (LAB) were identified in different cheeses made with raw cow's milk at different maturing times in two seasons of the year. The identification was made by amplification of the bacterial gene 16S rRNA by PCR and sequencing. The species *Enterococcus faecalis* (27.9%) and *Lactobacillus plantarum* (32.6%) were found throughout the period of maturation of the cheeses in winter, while in summer only *L. plantarum* prevailed during the whole maturation process. *Enterococcus faecium* (11.7%) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (14%) persisted in both seasons at different maturation times. *Weisella paramesenteroides* (2.3%) was found only during the winter period, while in summer *Lactobacillus paracasei* (2.3%), *Lactobacillus rhamnosus* (2.3%), *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* (2.3%) and *Weisella viridescens* (11%). In the present study the identified species suggest that the cheese of this region has distinctive microbiological characteristics and that these vary depending on the season of the year, making it necessary to standardize or inoculate local BAL strains to maintain the desired characteristics in the cheese throughout year.

Introducción

El queso denominado Real del Castillo, elaborado en la región de Ojos Negros, municipio de Ensenada, Baja California, México ha alcanzado una alta aceptación en la región de la ruta del vino y otras partes del estado. Tradicionalmente su elaboración fue incorporada por inmigrantes europeos y ahora una adaptación artesanal es utilizada desde 1930. Es un queso elaborado todo el año con leche de vaca sin pasteurizar y sin el agregado de cultivos bacterianos iniciadores de la fermentación, (Hernández, 2015). Se distingue por ser prensado, de pasta semidura a dura, con o sin corteza, y su comercialización ocurre en diferentes días de maduración de acuerdo a la demanda y capacidad de producción, siendo generalmente entre 1 y 21 días (Silva *et al.*, 2017). Al igual que otros quesos, el proceso de elaboración implica manipulación directa de los ingredientes en el quebrado, salado y moldeado de la cuajada, y distinto tiempo y peso en el prensado y maduración de la pasta, careciendo de estandarización en estos procesos. Al parecer estos factores influyen en que se desarrollen diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) y con ello las características finales del queso sean muy variables (Domingos *et al.*, 2017). Uno de los géneros de BAL más comunes en quesos no pasteurizados es *Lactococcus*, el cual constituye parte de la microbiota natural de la leche y de la mayoría de los cultivos iniciadores comerciales con actividad acidificante y ligeramente proteolítica en la industria láctea (Terzic *et al.*, 2014). Por otro lado, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* confieren gran variedad de sabores y texturas a los quesos (Domingos *et al.*, 2017). Es importante señalar que las BAL nativas pueden determinar las características del queso de una región geográfica (González *et al.*, 2016), en consecuencia diferentes autores han distinguido genotípicamente BAL mediante secuenciación del gen ARNr 16S en distintos quesos mexicanos, como el Cotija (Escobar *et al.*, 2016; Chombo *et al.*, 2016), queso Chihuahua (Renyé *et al.*, 2011), así como quesos Europeos como el Pico de Portugal (Domingos *et al.*, 2017), Manchego de España (Sánchez *et al.*, 2006) y Raschera del Valle Piedmont en Italia (Dolci *et al.*, 2008). Debido a que se desconocían las especies de BAL en el queso de Ojos Negros, en este estudio se identificaron 43 aislados en distintos quesos elaborados con leche cruda de vaca a diferentes tiempos de maduración en dos estaciones del año.

Material y métodos

En este estudio, se seleccionaron dos quesos de tres unidades productoras por estación del año y se fraccionaron en dos piezas cada uno para obtener finalmente 24 piezas correspondientes a los días 1, 21, 42 y 63 días de maduración. Las muestras se mantuvieron en un rango de temperatura de 12 a 17°C y 72-87% de humedad relativa (HR) simulando condiciones de las salas de oreo de origen, utilizando un refrigerador convencional con un dispositivo aireador y humidificador colocado en su interior. Al término de maduración adecuado, cada muestra se analizó para bacterias ácido lácticas (BAL), cultivando en agar Man Rogosa Sharpe (MRS: Difco, USA) y medio sólido M17 suplementado con lactosa para determinar su presencia (Sánchez *et al.*, 2006). Posteriormente se seleccionaron colonias que concordaran con tinción Gram-positiva y morfología (coco, bacilo, cocobacilo), catalasa-negativa (H₂O₂, 3% vol / vol) y citocromo-oxidasa-negativa según Caraffa *et al.* (2015) y Østlie *et al.* (2016). Una vez caracterizados los aislados, se cultivaron en 4 ml de los mismos medios utilizados para el aislamiento durante 24 horas a 35°C, tomando una alícuota para agregarle 10% v/v de glicerol para su mantenimiento a -20°C, en tanto al resto del volumen se le procedió a extraer ADN utilizando el paquete comercial DNeasy blood & Tissue Kit (QIAGEN, USA) siguiendo el protocolo para bacterias Gram positivas descrito por el proveedor. El ADN fue resuspendido en 100 µl de agua grado molecular, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, se tiñó con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, se observó en luz ultravioleta y se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm. La amplificación del gen ARNr 16S se realizó utilizando los oligonucleótidos universales UNI 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UNI 53SR 3'-GTATTACC GCGGCTGCTGG-5', que amplifican un fragmento de aproximadamente 527 pb. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineación a 55°C durante 60 s, extensión a 72°C por 30 s, y un ciclo de extensión final a 72°C por 3 min (Negoro *et al.*, 2013). 10 µl de los productos de PCR fueron observados en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñidos con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y visualizados en luz ultravioleta. Posteriormente los productos de PCR se dializaron utilizando filtros de 0.025µm (millipore, USA), se prepararon alícuotas con 400ng de ADN y 10 pmol de oligonucleótido UNI 8F en un volumen total de 12 µl y se enviaron a secuenciar a Eurofins Microbiology (CA, USA). Las

secuencias obtenidas fueron introducidas en el programa BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) seleccionando aquellas con una identidad del 96 al 100 % (Rossetti *et al.*, 2005). Los datos de aislados de BAL en los medios de cultivo (MRS y M17), días de maduración (1, 21, 42 y 63) y estación del año (invierno y verano) se analizaron utilizando el paquete Statistix 9.1 de Windows, para obtener las proporciones de cada variable.

Resultados y discusión

En la tabla I, se presentan los 43 aislados de BAL obtenidos e identificados por secuenciación del gen ARNr 16S en muestras recuperadas en medios de cultivo MRS y M17. Es interesante notar que los géneros *Lactobacillus* (16/43 37.2%) y *Weissella* (3/43 7%) crecieron solamente en agar MRS, aunque también se recuperaron en este medio *Enterococcus* spp (8/43 18.6%) y *Lactococcus* spp. (1/43 2.3%). Estos resultados son similares a los trabajos de Renye *et al.* (2011), Fusco *et al.* (2015) y Avnikirmaci *et al.* (2016) quienes señalaron que el medio MRS es el sustrato preferido por *Lactobacillus*, coincidiendo además en su baja selectividad, ya que también pueden crecer algunos aislados de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Pseudomonas*. El medio de cultivo M17 solo favoreció el crecimiento de *Enterococcus* spp. (9/43 21%) y *Lactococcus* spp. (6/43 14%) siendo este sustrato el preferido en varios estudios para el aislamiento de estos géneros en queso (Carvalho *et al.*, 2003; Dolci *et al.*, 2008; Renye *et al.*, 2011; Domingos *et al.*, 2017).

En la tabla II se muestran las proporciones de aislados de BAL obtenidos en quesos en dos estaciones del año. Las especies encontradas en la estación invernal fueron *E. faecalis* (10/25 40%), *L. plantarum* (8/25 32%), *E. faecium* (4/25 16%), *L. lactis* subsp. *Lactis* (2/25 8%) y *W. paramesenteroides* (1/25 4%), en tanto en verano las especies encontradas fueron *L. plantarum* (6/18 33.2%), *L. lactis* subsp. *Lactis* (4/18 22.2%), *E. faecalis* (2/18 11.1%) y *W. viridescens* (2/18 11.1%), encontrándose también *E. faecium*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. lactis* subsp. *Lactis* bv. *Diacetylactis*, cada una con un solo aislado (5.6%). Al comparar nuestros resultados, con los obtenidos por Terzic *et al.* (2014), para un queso artesanal, elaborado todo el año con leche cruda y madurado por 15 días en la región de Bosnia-Herzegovina, se aprecian similitudes, ya que reportaron 40% de aislados del género *Enterococcus*, 38% de *Lactococcus* y 10% de *Lactobacillus*, en tanto en nuestro estudio si

bien *Enterococcus* fue el más representado (56%), el género *Lactobacillus* también estuvo bien representado (32%), en tanto el género *Lactococcus* solo representó el 8% del total de aislados. En verano, los mismos autores señalan variaciones en el comportamiento de las BAL, con una disminución en *Enterococcus* (18%) e incremento de *Lactococcus* (43%) y *Lactobacillus* (30%); si bien estas proporciones difieren con los hallazgos presentados en este estudio, se aprecia un comportamiento similar al incrementarse *Lactobacillus* (44%) y *Lactococcus* (28%), y disminuir *Enterococcus* (17%). Una posible explicación en las variaciones de *Lactobacillus* sería su capacidad de multiplicarse a temperaturas de entre 30 hasta 45 °C, así como su tolerancia a ambientes ácidos menores a 5.3 de pH (Renye *et al.*, 2011), mientras que las variaciones en la frecuencia de *Enterococcus* pueden depender del tipo de queso, estación del año en la que se elabora, de su actividad halotolerante y proteolítica (Vallejo *et al.*, 2008). El género *Lactococcus* es el principal responsable de la acidificación del queso, sin embargo, su frecuencia depende de su incapacidad de tolerar concentraciones elevadas de sal (> 6.5%), un suceso que comúnmente ocurre en quesos artesanales conforme transcurre su maduración (Terzic *et al.*, 2014).

En cuanto a la proporción de especies de BAL por días de maduración (Tabla II), se observó que *L. plantarum* fue la especie que más perduro del día 1 al 63 de maduración en los quesos de invierno (8/25 32%) y verano (6/18 33.2%). Esta especie se ha encontrado en diferentes quesos tradicionales elaborados con leche cruda en proporciones del 30% en queso Manchego (Sánchez *et al.*, 2006), 38.74% en queso Cotija Mexicano (Escobar *et al.*, 2016) y 19.3% en queso Pico Portugués (Domingos *et al.*, 2017), siendo los dos primeros casos similares en proporción a los resultados obtenidos en este estudio. *L. plantarum* es una especie cuyo rasgo fisiológico característico es su tolerancia al ácido y altas concentraciones de sal, como consecuencia de su metabolismo heterofermentador, por lo que es una especie comúnmente encontrada en muestras de queso madurado durante 3 a 4 meses, produciendo además acetoina debido al incremento en la proteólisis secundaria durante el envejecimiento del queso, ocasionando el desarrollo e intensidad en sus sabores y aromas (Dolci *et al.*, 2008). Otras especies de este género con menor presencia fueron *L. paracasei* (1/18 5.6%) y *L. rhamnosus* (1/18 5.6%), presentes hasta los 21 días de maduración en verano. *L. paracasei* se ha reportado en quesos semi-duros como el Manchego, Noruego y Pico (Sánchez *et al.*, 2006; Østlie *et al.*, 2016; Domingos *et al.*, 2017) en 11.5 %, 20 % y 13.15% de los aislados respectivamente.

E. faecalis, una especie reportada en quesos elaborados con leche cruda en otros estudios se encontró durante todo el periodo de maduración en este estudio como población dominante (10/25 40%) y en menor medida se observó *E. faecium* (4/25 16%) a los 63 días de maduración en época de invierno, difiriendo la frecuencia de estas especies con la observada en verano, la cual fue menor. La permanencia de *E. faecalis* se puede deber a su capacidad de subsistir cuando el ácido láctico se consume y el pH disminuye como lo señalan Carvalho *et al.* (2003) y Carrafa *et al.* (2015), condición que afecta al desarrollo de *E. faecium*, especie poco tolerante a pH ácido. Una posible explicación del comportamiento de estas dos especies en nuestro trabajo, pudieran ser las condiciones de acidez que se desarrollaron en los quesos durante su maduración, resultando los quesos en invierno con menor acidez (5.83 ± 0.32) y porcentaje de ácido láctico (0.935 ± 0.33) en contraste con los quesos de verano, que tuvieron un pH de (5.37 ± 0.32) y 0.492 ± 0.17 de porcentaje de ácido láctico (datos no mostrados). De todas las BAL, el género *Enterococcus* es el más controversial para usarse en alimentos, y su presencia ha sido cuestionada debido a su potencial asociación con problemas de salud, ya que su existencia precisa deficiencias de higiene como fuentes de agua contaminada y rutinas de ordeña sin buenas prácticas durante la elaboración y procesamiento de quesos. Aun así, se ha encontrado en alta proporción en muchos quesos elaborados con leche cruda mejorando su sabor, siendo *E. faecalis*, y *E. faecium* especies fuertemente ligadas a quesos semiduros como el queso Travník elaborado en la región de Bosnia y Herzegovia y señalado por Terzić *et al.* (2014) con 11.3 a 25% respectivamente en los aislados recuperados y en el queso Urfa de la región de Turquía, donde se reportó un 40% de aislados de *E. faecium* y 18.57% de *E. faecalis* (Avnikirmaci *et al.*, 2016). En el queso llamado Pico elaborado en la región de Portugal, se reportó una frecuencia de 71% de *E. faecalis* por Domingos *et al.*, (2017), quienes además señalaron que el género *Enterococcus* degrada la caseína y genera compuestos como el diacetilo durante la maduración, mejorando el sabor y aroma en los quesos. Por otra parte *E. faecium* en queso Cotija (Escobar *et al.*, 2016; Chombo *et al.*, 2016), ha sido señalado como promotor del desarrollo de cambios fisicoquímicos deseados y producción de bacteriocinas.

En cuanto a *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, su presencia solo se observó a los 21 días en invierno (2 / 8%) y en verano se observó desde el día 1 al 42 (4/ 22.2%). *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *Diacetylactis* fue recuperada solamente al principio de la maduración en verano (1 / 5.6%). Una condición que caracteriza a esta especie con metabolismo homofermentador obligado y tolerante al ácido, es su falta de adaptación a condiciones de salinidad, siendo inhibida en

ambientes por arriba de 4 % de NaCl como lo explican Terzic *et al.* (2014) y Avnikirmaci *et al.* (2016), a diferencia de otros géneros que están adaptados a vivir por arriba de concentraciones de 6.5% de sal como son *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Weissella* que también fueron aislados en este trabajo. La baja frecuencia de aislados del género *Lactococcus* pudo deberse a la falta de control sobre la cantidad de sal añadida a la cuajada durante el proceso de salado del queso Ojos Negros o a la concentración de sal que aumenta en el queso a medida que va perdiendo agua durante su maduración. Dado que no se analizó el contenido de sal en este trabajo, es importante considerar esta variable en futuros trabajos. *L. lactis* subsp. *lactis* es una BAL comúnmente utilizada en la industria láctea como cultivo iniciador por su capacidad de acidificar en corto tiempo y su actividad proteolítica, su presencia predomina antes y durante la maduración en quesos y ha sido reportada en la producción y maduración de quesos artesanales con 33% en el queso Pico (Domingos *et al.*, 2017) y 60% en queso Chihuahua (Renye *et al.*, 2011). *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *Diacetylactis*, es una biovariedad utilizada comúnmente en diversos quesos por su alta capacidad de producción de diacetilo al comienzo de la maduración en quesos de pasta dura y prensada, siendo el compuesto constituyente de los aromas cremosos y mantecosos del queso Cheddar, Cambembert, Edam y Gouda (Passerini *et al.*, 2013).

El género *Weissella* fue el menos frecuente en los quesos al comienzo de la maduración, aislándose *W. paramesenteroides* (1/4%) en invierno y *W. viridescens* (2/11.1%) en verano. Este género no es tan común en quesos, pero si en animales, vegetales y forrajes fermentados (Fusco *et al.*, 2015). La presencia del género *Weissella* generalmente no ha sido señalada como población dominante en quesos madurados, sin embargo *W. paramesenteroides* representó el 26.8% en queso Cotija madurado, originario de la Sierra de Jalmich entre Jalisco y Michoacán (Escobar *et al.*, 2016) siendo el género *Weissella* propuesto como promotor de textura deseada en queso Cheddar sin afectar su aroma (Lynch *et al.*, 2014).

Conclusión

Las especies aisladas durante la maduración del queso en el presente trabajo han sido aisladas en otros quesos, sin embargo, se observaron características propias en cuanto a las especies encontradas y su proporción por estación del año y días de maduración, razón por la cual probablemente tiene unas características organolépticas tan especiales, sin embargo no se ha

logrado uniformidad en cuanto a las características organolépticas, haciendo necesaria una estandarización o inocular cepas de BAL locales para mantener su calidad entre los diferentes productores durante todo el año.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional para el Desarrollo de Capacidades del Sector Rural, A.C. y Servicio Nacional de Capacitación y Asistencia Técnica Rural Integral (SENACATRI), bajo el folio PIIEX-E-02-2015-001. Queseros del municipio de Ojos Negros en Ensenada BC por el apoyo brindado, al Laboratorio de Calidad de Leche y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California por brindar instalaciones y equipo.

Bibliografía

- Avnikirmaci, H, Hamdiozer, B, Akcelik, M, Akcelik, N 2016, 'Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese', *International Journal of Dairy Technology*, vol. 69, pp 301-307.
- Caraffa, I, Nardin, T, Larcher, R, Viola, R, Tuohy, K, Franciosi, E 2015, 'Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese', *Food Microbiology*, vol 48, pp 123-132.
- Carvalho, AS, Silva, J, Ho1, P, Teixeira, P, Malcata, FX, Gibbs, P 2003 'Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*', *Journal of Applied Microbiology*, vol 94, pp 947-952.
- Chombo, MMP, Kirchmayr, M, Gschaedler, A, Lugo, CE, Villanueva, RS 2016 'Effects of controlling ripening on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE, LW', *Food Science and Technology*, vol 6, pp 1153-1161.

- Domingos, LMFP, Stanton, C, Ross, PR, Dapkevicius, MLE, Silva, CCG 2017 'Genetic diversity, safety and Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese', *Food Microbiology*, vol 63, pp 178 – 190.
- Dolci, P, Alessandria, V, Zeppa, G, Rantsiou, K, Cocolin, L 2008 'Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria', *Food Microbiology*, vol 25, pp 392–399.
- Escobar, ZA, Sánchez, FA, Quirasco, BM 2016 'Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota', *Food Microbiology*, vol 57, pp 116–127.
- Fusco, V, Quero, GM, Cho, GS, Kabisch, J, Meske, D, Neve, H, Bockelmann, W, Franz CMA 2015 'The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front', *Frontiers in Microbiol*, vol 6, pp 1-22.
- González, RA, Carro, S, Cal, K, Giacaman, S, Aldrovandi, A 2016 'Lactococcus lactis autóctono: evaluación del efecto antilisterial y propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo', *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, vol 12, pp 15-26.
- Hernández, SA 2015, 'Caracterización del Queso Real del Castillo en Valle de Ojos Negros, Baja California', Tesis de Maestría. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma de Chihuahua. México.
- Lynch, KML, McSweeney, PLH, Arendt, EK, Lowe, TU, Galle, S, Coffey, A 2014, 'Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese', *International Dairy Journal*, vol 34, pp 125-134.
- Negoro, E, Hiromichi, I, Katsunori, T, Satoshi, I, Kazutaka, T, Shinji, K, Takahiro, Y, Akira, Y, Yoshimasa, U, Mitsunobu, S, Takanori, U 2013, 'Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases', *International Journal of Infectious Diseases*, vol 17, pp 271-276.

- Østlie, MH, Kraggerud, H, Longva, AB, Abrahamsen, RK 2016, 'Short communication Characterisation of the microflora during ripening of a Norwegian semi-hard cheese with adjunct culture of propionic acid bacteria', *International Dairy Journal*, vol 54, pp 43–49.
- Passerini, D, Laroute, V, Coddeville, M, Bourgeois, PL, Loubiere, P, Ritzenthaler, P, Cocaïgn, BM, Daveran, MML 2013, 'New insight into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins', *International Journal of Food Microbiology*, vol 160, pp 329-336.
- Renye, JJA, Somkuti, GA, Van, Hekken, DL, Guerrero, PVM 2011, 'Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese', *Journal of Dairy Science*, vol 94, pp 3311-3315.
- Rossetti, L, Giraffa, G 2005, 'Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint database', *Journal of Microbiological Methods*, vol 63, pp 135-144.
- Sánchez, I, Seseña, S, Poveda, JM, Cabezas, L, Palop, LL 2006, 'Genetic Diversity dynamics and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese', *International Journal of Food Microbiology*, vol 107, pp 265-273
- Silva, PL, López, VG, Medina, BG, Montaña, GM, Herrera, RJ, Villa, AR, Alday, MC, González, SA, Inzunza, F, López, SA, Felipe, GG 2017, 'Dinámica poblacional y tipificación de bacterias ácido lácticas en la maduración del queso de ojos negros, Ensenada B.C, México (resultados preliminares), Sección de poster presentado en la XXVII reunión internacional sobre producción carne y leche en climas cálidos. Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México, pp 326-330.
- Terzic, VA, Mihajlovic, S, Uzelac, G, Veljovic, K, Tolinacki, M, Nikolic, M, Topisirovic, L, Kojic, M 2014, 'Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik

Young cheeses, sweet cream and sweet kajmaks over four seasons', Food Microbiology, vol 39, pp 27–38.

Vallejo, M, Marguet, E, Etchechoury, Valeria 2008, 'Características de α -acetolactato sintetasa y producción de diacetilo por *Enterococcus faecium* ETw7 y *Enterococcus faecalis* ETw23', Revista Peruana de Biología, vol 15, pp 97-100.

Tabla I. Porcentaje de aislados de BAL obtenidos por secuenciación del gen ARNr 16S en muestras recuperadas de dos medios de cultivo seleccionados (Percentage of BAL isolates obtained by sequencing the 16S rRNA gene in samples recovered from two selected culture media).

	Identificación molecular de aislados de BAL - n (%) ²									
Medio ¹	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Total n (%)
MRS	5(11.6)	3(7)	1(2.3)	ND	1(2.3)	2(4.7)	14(32.6)	1(2.3)	1(2.3)	28 (65.1)
M17	7(16.3)	2(4.7)	5(11.7)	1(2.3)	ND	ND	ND	ND	ND	15 (34.9)
	12 (27.9)	5 (11.7)	6 (14)	1 (2.3)	1 (2.3)	2 (4.7)	14 (32.6)	1 (2.3)	1 (2.3)	43 (100)
Total 43 aislados (n) de BAL analizados por amplificación del gen bacteriano ARNr 16S por PCR										
¹ . Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C ± 2 °C por 24 h, y agar M17 supl. glucosa 1%, a 37 °C ± 2 °C por 48 horas.										
² . <i>Enterococcus faecalis</i> (A), <i>Enterococcus faecium</i> (B), <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> (C), <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>Diacetylactis</i> (D), <i>Weissella paramesenteroides</i> (E), <i>Weissella viridescens</i> (F), <i>Lactobacillus plantarum</i> (G), <i>Lactobacillus paracasei</i> (H), <i>Lactobacillus rhammosus</i> (I).										
ND – no detectado										

Tabla II. Distribución del número de aislados de BAL obtenidas en dos estaciones del año y diferentes días de maduración del queso de Ojos Negros (Distribution of the number of BAL isolates obtained in two seasons of the year and different maturation days of the Ojos Negros cheese).

	día maduración invierno						día maduración verano				
No. aislados por Cepa ¹	1 n(%)	21 n(%)	42 n(%)	63 n(%)	Total n(%)		1 n(%)	21 n(%)	42 n(%)	63 n(%)	Total n(%)
<i>Enterococcus</i> 14(56)							<i>Enterococcus</i> 3(17)				
<i>E. faecalis</i>	3(12)	3(12)	2(8)	2(8)	10(40)		ND	1(5.6)	ND	1(5.6)	2(11.1)
<i>E. faecium</i>	ND	ND	ND	4(16)	4(16)		ND	1(5.6)	ND	ND	1(5.6)
<i>Lactobacillus</i> 8(32)							<i>Lactobacillus</i> 8(44)				
<i>Lb. plantarum</i>	2(8)	1(4)	3(12)	2(8)	8(32)		1(5.6)	1(5.6)	2(11)	2(11)	6(33.2)
<i>Lb. Paracasei</i>	ND	ND	ND	ND	ND		1(5.6)	ND	ND	ND	1(5.6)
<i>Lb. Rhamnosus</i>	ND	ND	ND	ND	ND		ND	1(5.6)	ND	ND	1(5.6)
<i>Lactococcus</i> 2(8)							<i>Lactococcus</i> 5(28)				
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	ND	2(8)	ND	ND	2(8)		1(5.6)	2(11)	1(5.6)	ND	4(22.2)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	ND	ND	ND	ND	ND		1/5.6%	ND	ND	ND	1(5.6)
<i>Weissella</i> 1(4)							<i>Weissella</i> 2(11)				
<i>W. paramesenteroides</i>	ND	1(4)	ND	ND	1(4)		ND	ND	ND	ND	ND
<i>W. viridescens</i>	ND	ND	ND	ND	ND		2(11.1)	ND	ND	ND	2(11.1)
Total n(%)	5(20)	7(28)	5(20)	8(32)	25(100)		6(33)	6(33)	3(17)	3(17)	18(100)
ND - no detectado											

3.3. Evidencia de artículos científicos

1. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias

The image shows two screenshots. The top screenshot is the homepage of the Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias (RMCP) website. It features the INIAP logo, the journal title, and the issue number #5084 Revisión. The bottom screenshot is an email correspondence between the author and the editor. The email is dated 2018-12-19 03:41 PM and is from the author, Ciencias Pecuarias, to the editor, Gilberto López. The email discusses the revision of a manuscript titled "Caracterización de la leche y queso artesanal de la región de Ojos Negros Baja California, México." The author mentions that the manuscript has been revised according to the comments of the reviewers and the editor. The editor responds, stating that the manuscript has been accepted for publication as a research note and that the author should include the first page complete with names of authors and institutions in the final version. The email also includes the contact information for the editor, Gilberto López Valencia, and the journal's website, <http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/>.

gob MX

Trámites Gobierno Participa Datos

iniap REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS

#5084 Revisión

Correspondencia entre el editor/a y el autor/a - Google Chrome

<https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/author/view/EditorDecisionComments/5084M521>

Ciencias Pecuarias
cienciaspecuarias@inifap.gob.mx

1. Forma.

-Mejorar la edición, hay algunos problemas de puntuación, palabras duplicadas, y en algunas secciones de redacción.

2. El problema principal que se observó es que sólo se utilizó estadística descriptiva, para un trabajo así es recomendable el uso de estadística inferencial, recomendaría por ejemplo el uso de una T de Student que compare los datos de campo con las normas.

-Se recomienda profundizar sobre las implicaciones, y en discusión con trabajos en otras regiones del exterior.

Espero que se incorporen las observaciones, pues un trabajo que contribuye al conocimiento de los quesos locales en el país.

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias
<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/>

Autor/a
2018-12-19 03:41 PM

Asunto: Caracterización de la leche y queso artesanal de la región de Ojos Negros Baja California, México. [ELIMINAR](#)

Estimado Dr. Talavera, le anexo la versión corregida del artículo de acuerdo a los comentarios de los dictaminadores.

Todos los comentarios fueron atendidos y efectivamente quedó mejor el documento.

Sin más y en espera de que se hayan atendido adecuadamente las observaciones le envío un cordial saludo

Gilberto López

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias
<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/>

Editor/a
2019-04-29 06:28 PM

Asunto: [RMCP] Decisión del Editor [ELIMINAR](#)

Gilberto López Valencia:

Con referencia al trabajo: "Caracterización de la leche y queso artesanal de la región de Ojos Negros Baja California, México.", que tuvo a bien someter a revisión en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias; nos permitimos hacer de su conocimiento el siguiente:

Dictamen: Aceptado para su publicación como Nota de Investigación.

En su versión final incluir la primera página completa con nombres de autores e instituciones. Considerar también detalles del archivo en el Portal, así como los puntos del archivo adjunto.

Enviar información a:
rodriguez_oscar@prodigy.net.mx

Ciencias Pecuarias
cienciaspecuarias@inifap.gob.mx

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias
<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/>

Cerrar

2. Archivos de Zootecnia

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA

Clarivate Analytics

Scopus

SJR

Calidad de revistas Científicas Españolas

Sciendo

ResearchGate

ULRICHSWEB

www.cobi.org

GLR

DI

INICIO

ACERCA DE

ÁREA PERSONAL

BUSCAR

ACTUAL

NÚMEROS ANTERIORES

AVISOS

IMPACTO

REVISORES

CONSEJO EDITORIAL

GUÍA PARA AUTORES

ÉTICA EDITORIAL

VIDEO TUTORIALES

CONTACTO

E-JOURNAL (LIBROS ELECTRÓNICOS)

PROCESO EDITORIAL (EDITORES SECTORIALES)

PLATAFORMA DE PAGO

Inicio > Usuario/a > Autor/a > Envíos activos

Envíos activos

ACTIVO/A ARCHIVAR

ID.	DO-RR	SECC.	AUTORES/AS	TÍTULO	ESTADO
4083	04-11	ARTSP	Silva Paz, López Valencia, Montaño...	IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN QUESOS...	Asignación en espera

Empezar un nuevo envío

HAGA CLIC AQUÍ para ir al primer paso del proceso de envío en cinco pasos.

Enlaces reback

TODOS NUEVO PUBLICADO OMITIDOS

FECHA DE CREACIÓN	VISITAS	URL	ARTÍCULO	TÍTULO	ESTADO	ACCIÓN
No hay ningún enlace reback.						

Publicar Omitir Eliminar Seleccionar todo

DESCARGA NUESTRA APLICACIÓN PARA SMARTPHONES

Haz click y sigue las instrucciones

[Aplicación Móvil y Shortcut para Apple](#)

Copyright

OPEN JOURNAL SYSTEMS

Servicio de ayuda de la revista

USUARIO/A

Ha iniciado sesión como...

gmedina

• [Mi perfil](#)

• [Cerrar sesión](#)

NOTIFICACIONES

• [Vista](#)

• [Notificar](#)

AUTOR/A

Envíos

• [Actualizar](#) (1)

• [Archivar](#) (0)

• [Nuevo envío](#)

IDIOMA

Escoge idioma

CONTENIDO DE LA REVISTA

Buscar

Ámbito de la búsqueda

Todo

Buscar

Examinar

• [Por número](#)

• [Por autor/a](#)

• [Por título](#)

TAMAÑO DE FUENTE

INFORMACIÓN

• [Para la edición de la revista](#)

• [Para la edición de la revista](#)

• [Para la edición de la revista](#)

4. CONCLUSIONES GENERALES

4. CONCLUSIONES GENERALES

- Nuestro estudio representa la primera investigación que se centra en la calidad sanitaria y fisicoquímica de la leche y queso, así como el conocimiento de las BAL presentes en el queso producido en la región de Ojos Negros
- Se evidencio que los parámetros de calidad de la leche como materia primaria en la elaboración de queso, superan a los valores deseables de la normatividad con respecto a proteína, grasa y lactosa.
- Un aspecto relevante de la calidad sanitaria asociado con patógenos como *Salmonella spp* y *Listeria spp* no se observaron en ninguna de las UP, lo cual es deseable ya que estas bacterias representan un riesgo para la salud del consumidor.
- No obstante, en algunos indicadores de la higiene en la leche y el queso se encuentran por encima de los parámetros que exige la normatividad para lácteos, los cuales si no se controlan finalmente se corre el riesgo de patógenos en ellos.
- Se detectó que durante el proceso de elaboración del queso y su maduración se desarrolla una progresiva acidificación debida a la presencia de especies de BAL mesófilas de importancia económica y de seguridad.
- Las especies de BAL aisladas durante la maduración del queso en el presente trabajo han sido aisladas en otros quesos, sin embargo, se observaron características propias en cuanto a las especies encontradas y su proporción por estación del año y días de maduración, razón por la cual probablemente desarrollan características organolépticas tan especiales.
- Se observó que la maduración como tecnología puede mejorar la calidad sanitaria del queso, porque especies de *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* y *faecalis*, aisladas conforme se continua la maduración hasta los 63 días, han sido reportadas benéficas contra bacterias patógenas, por generar gran actividad antimicrobiana y ácidos orgánicos naturales como el ácido láctico, contribuyendo a la obtención de un producto artesanal de mayor seguridad

- Por lo anterior, es imperativo que estas UP continúen trabajando sobre la instrumentación programas de medicina preventiva en el logro de una leche y queso, especialmente con el objetivo de mejorar indicadores fuera de norma y apegarse a una estricta estandarización de los procesos de maduración del queso para lograr uniformidad en los aspectos de seguridad y organolépticos entre los diferentes productores en todo el año; asegurando su subsistencia y protección del patrimonio cultural de este queso.