

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS Y FISICOQUIMICAS
A DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN DEL QUESO ARTESANAL DE
LECHE DE VACA ORIGINARIO DE OJOS NEGROS, BAJA CALIFORNIA**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN
CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

ANA LAURA GONZALEZ SILVA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

JUNIO DEL 2019

CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS Y FISICOQUIMICAS A DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN DEL QUESO ARTESANAL DE LECHE DE VACA ORIGINARIO DE OJOS NEGROS, BAJA CALIFORNIA. Tesis presentada por Ana Laura González Silva como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Gilberto López Valencia

Director de tesis

MC. Laura Elena Silva Paz

Asesor

Dr. Francisco Javier Monge Navarro

Asesor

Dr. José Carloman Herrera Ramírez

Asesor

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

Asesor

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia gracias a Dios por permitirme continuar con mis estudios, me brindo apoyo colocando a las personas correctas en el transcurso de mi carrera dándome siempre la fuerza para seguir adelante.

Agradezco a mis formadores, personas de gran conocimiento quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro.

Agradezco a CONACYT por el gran apoyo económico que me brindo durante esta etapa.

Agradezco a la Coordinación de Posgrado en especial a la Doctora Maritza Manríquez por el apoyo que me brindo en esta etapa.

Gracias a mis compañeros y amigos de clase y laboratorio, por el apoyo incondicional para sacar adelante este gran proyecto, por los momentos de risa, las conversaciones, ustedes hicieron de mi trayectoria una parte fundamental.

Gracias a mis padres: Laura y Audomaro, por ser los principales promotores de mis estudios, gracias por siempre confiar en mí, por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.

Gracias a mi esposo Javier y a mis hijos: Javier, Ana Paula y Santos, quienes han logrado hacerme mejor persona y estudiante, yo no estaría hasta este punto de mi trayectoria como estudiante si no fuera por ustedes, como en todos mis logros, en este han estado siempre presentes, mi familia es mi mayor orgullo y mi gran motivación ya que me impulsan a cada día superarme en la carrera de ofrecerles siempre lo mejor de mí.

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios, a mis padres, esposo e hijos, porque siempre han estado presentes en los mejores momentos de mi vida y han sido una parte fundamental en cada uno de mis logros.

A mi tutor Dr. Gilberto López Valencia por la gran paciencia que me tuvo durante la elaboración de mi trabajo, muchas gracias.

A todas las personas que conocí y que me acompañaron durante esta etapa de mi vida, pero sobre todo quiero agradecerles por hacer de esta etapa una hermosa experiencia.

RESUMEN

El queso artesanal elaborado en la región de Ojos Negros, Baja California es un tipo de queso prensado, oreado ligeramente madurado caracterizado por sus intensos sabores y aromas el cual al ser elaborado con leche cruda de vaca es considerado como factor de riesgo para la salud, sin embargo, contiene flora natural no patógena como las bacterias ácido lácticas (BAL), que le proporcionan características extraordinarias siendo una de las más importantes la producción de ácido láctico ya que en altas concentraciones inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, el cual va aumentando conforme a mayor número de días de maduración convirtiéndolo en un producto más seguro para consumir. Su proceso de acuerdo con los requisitos regulatorios de la “Food and Drug Administration” (FDA) requiere de 60 días mínimos de maduración, sin embargo, debido a la alta demanda, los productores han reducido este tiempo vendiendo su producto antes de cumplir la semana de su elaboración convirtiéndose en un riesgo para la salud que implica el consumo de estos quesos. El objetivo fue determinar las características microbiológicas y fisicoquímicas del queso (al día 1, 21, 42 y 63) identificando características cada vez más favorables conforme el transcurso del tiempo. Las BAL (*Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*) fueron los microorganismos más dominantes a través de la maduración los cuales fueron los responsables del potencial acidificante, factor importante para la salud pública como para el desarrollo del sabor típico del queso.

Los resultados muestran que los microorganismos indicadores de la calidad bacteriológica del queso (coliformes totales) fueron disminuyendo a través de los días de maduración.

ABSTRACT

Artisanal cheese made in the region of Ojos Negros, Baja California is a type of pressed cheese, barely ripened characterized by its intense flavors and aromas which, when made with raw cow's milk, is considered a risk factor for health, but it contains natural non-pathogenic flora such as lactic acid bacteria (LAB), which provides extraordinary characteristics, one of the most important being the production of lactic acid, since in high concentrations it inhibits the growth of pathogenic microorganisms, which increases according with the passage of the days of maturation, making it a safer product to consume. Its process in accordance with the regulatory requirements of the "Food and Drug Administration" (FDA) that requires 60 minimum days of maturation, however, due to the high demand, producers have reduced this time by selling their product before completing the week of its elaboration becoming a risk for the health that implies the consumption of these cheeses. The objective was to determine the microbiological and physicochemical characteristics of the cheese (at day 1, 21, 42 and 63) identifying increasingly favorable characteristics according to the course of time. The BAL (*Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Enterococcus*) were the most dominant microorganisms through maturation which were responsible for the acidifying potential, an important factor for public health and for the development of the typical taste of these cheeses.

The results show that the microorganisms indicating the bacteriological quality of the cheese (total coliforms) were decreasing through the days of maturation.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO ESPECIFICOS.....	3
HIPOTESIS	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Historia del queso artesanal producido en Ojos Negros	4
Composición de la leche cruda de vaca	4
Papel funcional de las BAL (de acuerdo con el uso en la salud)	6
Beneficios de la leche de vaca no pasteurizada	7
Pruebas fisicoquímicas de interés aplicables en leche cruda y queso artesanal ..	8
Determinación de acidez	8
Determinación del pH.....	9
Determinación de proteína	9
Determinación de humedad	10
Pruebas microbiológicas de interés aplicables en leche cruda y queso artesanal.....	10
Prueba de coliformes totales	10
Prueba de mesófilos aerobios	11
<i>Prueba de Salmonella spp.</i>	11
<i>Aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas</i>	13

Pruebas bioquímicas para identificación de grupos de bacterias	16
Prueba de catalasa	16
Prueba de oxidasa	17
MATERIALES Y METODOS	18
Lugar de estudio	18
Diseño del estudio y toma de muestras.....	18
Análisis de laboratorio	19
Tratamiento de muestras	19
Análisis microbiológico	19
Conteo de bacterias coliformes y mesófilos aerobios	20
<i>Análisis para la detección de Salmonella spp</i>	20
<i>Análisis para el aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas (BAL)</i> ..	21
Análisis fisicoquímico.....	25
Determinación de acidez.	25
Determinación de pH.....	26
Determinación de humedad	26
Determinación de proteína	26
RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
CONCLUSIONES.....	39
LITERATURA CITADA.....	41

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 La composición promedio de la leche de vaca	5
Cuadro 2 Características bioquímicas de bacterias ácido lácticas pertenecientes al género <i>Lactococcus</i> spp	14
Cuadro 3 Características fenotípicas bacterias ácido lácticas pertenecientes al género <i>Lactobacillus</i> spp.....	15
Cuadro 4 Características fenotípicas de la bacteria ácido láctica pertenecientes al género <i>Enterococcus</i> spp.....	15
Cuadro 5 Características fenotípicas la bacteria ácido láctica pertenecientes al género y especie <i>Paenibacillus chibensis</i>	16
Cuadro 6 Receta de preparación del Master Mix Comercial® por muestra	24
Cuadro 7 Efecto de los días de maduración (1, 21, 42 y 63) y la estación del año (verano e invierno) sobre el crecimiento microbiológico en quesos artesanales...	29
Cuadro 8 Efecto de dos periodos estacionales sobre el crecimiento microbiológico en quesos artesanales.	30
Cuadro 9 Efecto de los días de maduración (1, 21, 42 y 63) y la estación del año (verano e invierno) sobre las variables fisicoquímicas en quesos artesanales	32
Cuadro 10 Efecto de dos periodos estacionales sobre las variables fisicoquímicas en quesos artesanales.	33
Cuadro 11 Especies de bacterias ácido lácticas aisladas de queso artesanal durante dos periodos estacionales en cuatro diferentes tiempos de maduración.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Identificación de 43 cepas BAL a diferentes tiempos de maduración del queso artesanal producido en Ojos Negros	35
---	----

INTRODUCCIÓN

El queso artesanal se define como un producto elaborado a partir de leche cruda de vaca elaborado en unidades de producción generalmente pequeñas sin la adición de cultivos iniciadores cuya fermentación ocurre mediante un proceso natural. Se entiende como maduración del queso a la fase donde la masa de este cambia sus características de aspecto, composición, consistencia, color y olor, además que el gusto adquiere nuevos matices y se acentúan. Todo esto ocurre porque la masa del queso está poblada de microorganismos que con sus enzimas llevarán a cabo transformaciones bioquímicas y físicas en el producto. Es importante señalar que los quesos que son elaborados a partir de leche cruda y que si no pasan por un proceso de maduración apropiado no son apto para el consumo humano (Alejo- Martínez et al., 2015).

La “Food and Drug Administration” (FDA) indica que los posibles microorganismos que pudieran encontrarse en el queso disminuyen conforme transcurre el tiempo de maduración debido a los cambios fisicoquímicos que conlleva el proceso, por lo que es necesario que el queso sea madurado 60 días como mínimo anterior a su venta (Brooks et al., 2012).

En el poblado de Ojos Negros Baja California, desde hace más de 100 años se elabora un tipo de queso oreado y prensado que cuenta con gran prestigio entre sus consumidores. Sin embargo, en algunas ocasiones los productores debido a la alta demanda comercializan los quesos sin completar los 60 días de maduración. Por lo anterior y considerando que estos se elaboran con leche de

vaca no pasteurizada existe la probabilidad de que representen un impacto negativo en la salud pública. El objetivo de este trabajo es **determinar las características microbiológicas y fisicoquímicas a diferentes tiempos de maduración del queso artesanal de leche de vaca originario de Ojos Negros, Baja California.**

OBJETIVO ESPECIFICOS

Determinar la calidad microbiológica del queso producido en cuatro tiempos de maduración (días 1, 21, 42 y 63) durante dos periodos estacionales.

Determinar la calidad fisicoquímica del queso producido en cuatro tiempos de maduración (días 1, 21, 42 y 63) durante dos periodos estacionales.

Identificar las especies de bacterias ácido lácticas aisladas del queso a través de cuatro tiempos de maduración (días 1, 21, 42 y 63) por medio de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa.

HIPOTESIS

La calidad de un queso madurado a los 63 días dada sus características microbiológicas y fisicoquímicas es mejor en comparación a un queso madurado a menor tiempo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Historia del queso artesanal producido en Ojos Negros

La fama de los quesos del Real del Castillo ha trascendido fronteras, debido a que se fabrican desde hace más de 100 años y es una tradición que empezó con familias Europeas de origen italiano y sueco que emigraron a esta zona alrededor del año 1880, la cual hoy en día llaman “ La Ruta del Queso”, se reconoce que fueron tres familias que iniciaron la elaboración del queso tradicional: Ramonetti y Candolfi de origen sueco y Parma de origen italiano, en ese mismo orden de antigüedad y tradición quesera (El Vigía, 2013).

Hoy en día en la delegación de Real del Castillo en Ensenada Baja California existen 30 productores de quesos artesanales, que producen 500 mil litros de leche diarios y 30 toneladas mensuales de una variedad de queso artesanal reconocidos por su buena calidad al ser elaborados con leche bronca sin descremar y sin agentes químicos que puedan dañar el producto (El Vigía, 2013; SIAP, 2018).

Composición de la leche cruda de vaca

La leche de vaca es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras; es blanca y opaca, posee un sabor dulce y un pH cercano a 7. Está compuesta por agua, grasa y sólidos no grasosos. Los sólidos no grasosos comprenden las proteínas, la lactosa y las cenizas, mientras que los sólidos totales (ST) incluyen el contenido de los sólidos no grasos y de la grasa. La

composición promedio de la leche de vaca se observa en el cuadro 1 (A. Hernández et al., 2011)

Cuadro 1 Composición promedio de la leche de vaca

Constituyente	Variación % p/v	Promedio % p/v
Agua	70-90.5	87
Grasa	2.20-8	3.80
Proteínas	2.70-4.80	3.50
Lactosa	3.50-6	4.90
Cenizas	.65-.90	.80
Sólidos totales	9.05-19.70	13
Sólidos no grasos	6.85-11.70	9.20

A. Hernández et al., (2001).

La leche dentro de la ubre de una vaca sana se encuentra prácticamente estéril; sin embargo, puede ser contaminada por microorganismos en el canal del pezón. El número de microorganismos del líquido aumenta sensiblemente durante el ordeño y durante las operaciones de manipulación antes de ser refrigerado. La contaminación microbiana proviene de varias fuentes, entre los que se pueden mencionar: el cuerpo de la vaca, los utensilios y el equipo utilizadas para el ordeño, las personas, los insectos y el medio. Todas esas fuentes de contaminación hacen que, en condiciones higiénicas, la leche posea un contenido promedio de microorganismos de 10^5 UFC/ml a 20^5 UFC/ml si la calidad de la leche es buena (Claeys et al., 2013; PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012).

La mayor parte de los microorganismos presentes en la leche cruda son bacterias no patógenas, que pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* por mencionar algunos, pero también se

pueden encontrar microorganismos patógenos, pero para esto la manera de reducirlos o eliminarlos dentro de nuestro producto es llevando buenas prácticas de ordeña, recolección y transporte de la leche, también considerando que el ganado del cual se extrae el producto este sano asegurándonos que posea certificado de hato libre de Brúcela y Tuberculosis, así mismo el ácido láctico producido por las bacterias de los géneros anteriormente mencionados inhiben la proliferación de los microorganismos patógenos, siendo entonces un conservador natural de la leche aportando beneficios a la salud de quien la consume (Fuentes-Coto et al., 2013).

Papel funcional de las BAL (de acuerdo con el uso en la salud)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que participan en procesos de elaboración de alimentos fermentados, principalmente de origen lácteo. La principal característica metabólica de las BAL es la producción de ácido láctico como resultado de la degradación de la lactosa, por un lado, junto al bajo pH el ácido láctico posee un efecto bacteriostático y bactericida sobre bacterias patógenas o alterantes, mejorando la seguridad y alargando la vida media del producto; por otro lado, contribuye a las características organolépticas finales, como la textura, sabor y olor de este (Heredia-Castro et al., 2017).

Los cultivos lácticos juegan un papel crucial en el inicio de la fermentación, desarrollando la acidez y favoreciendo la coagulación de la leche. El potencial enzimático de las cadenas usadas como BAL cultivos iniciadores, siendo estos una preparación de microorganismos vivos que se emplean para poner en marcha el proceso de fermentación en la elaboración de los productos lácteos en una serie

de industrias diferentes determina el desarrollo de las texturas y las características organolépticas del queso. En adición, las BAL están envueltas en la maduración y el desarrollo del aroma de los productos lácteos. Las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (BAL-NI) son aquellas que se encuentran en la flora autóctona de la leche cruda o después de un tratamiento térmico inadecuado las cuales tienen también una fuerte influencia en el desarrollo del sabor, aroma y texturas de los quesos y por lo tanto en su calidad (Ramos-Izquierdo et al., 2009).

Las BAL también son empleadas como probióticos, los cuales ayudan a mejorar la salud o reducir el riesgo de padecer trastornos gastrointestinales, infecciones y enfermedades inflamatorias del intestino en el consumidor debido a que contribuyen al equilibrio de la microbiota intestinal, con el consiguiente beneficio en la lucha contra infecciones entéricas, la estimulación del sistema inmune tanto al nivel de mucosas como sistémico, la reducción de los niveles de colesterol, la regulación de la tensión arterial o la prevención del cáncer. No obstante, por el hecho de estar vivas, las bacterias probióticas no se muestran inertes en el producto lácteo, sino que se multiplican y son metabólicamente activas, pudiéndole aportar nuevas cualidades al alimento (Heredia-Castro et al., 2017, Rosetti L., 2016)

Beneficios de la leche de vaca no pasteurizada

Claeys et al., en el 2013 mencionaron que el proceso de pasteurización destruye los microorganismos de la leche, eliminando también las bacterias beneficiosas como los probióticos, destruye además enzimas, desnaturaliza componentes antimicrobianos e inmuno-estimulantes, inactiva vitaminas C y B12,

incluso cambia la naturaleza de las proteínas afectando directamente el valor nutricional de la leche.

Lucey en el 2015 menciona que la población continúa consumiendo leche cruda, aunque numerosos estudios epidemiológicos han demostrado claramente que puede estar contaminada por una variedad de patógenos, algunos de los cuales están asociados con enfermedades. Por lo anterior, son necesarias estrategias para disminuir los riesgos asociados con la leche cruda y sus productos tales como el seguimiento de la NMX-F-730-COFOCALEC-2008 para las prácticas de higiene recomendadas para la obtención de leche, la NOM-243-SSA1-2010 para las especificaciones sanitarias de la leche y derivados lácteos, el uso de las buenas prácticas de ordeño descritos por la FAO en el 2011 por mencionar algunas, mejoran los esfuerzos educativos y sin duda la calidad de nuestro producto. El desarrollo de medidas de control antes y después de la recolección de la leche para reducir la contaminación de manera efectiva es fundamental para el control de patógenos en la leche cruda cumpliendo estrictamente con las normas esto puede lograrse (Oliver et al., 2009).

Pruebas fisicoquímicas de interés aplicables en leche cruda y queso artesanal

Determinación de acidez

La NOM-155-SCFI-2012 menciona que la leche generalmente tiene una acidez de 1.3 a 1.7 g/L expresada en ácido láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0.05-0.08%) y de fosfatos. También contribuyen a la acidez: el dióxido de carbono (0.01-0.02%), los citratos (0.01%) y la albumina (menos de 0.001%). La acidez se mide con base a una

titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador o, en su caso utilizando un potenciómetro para detectar pH que corresponde al fin de la titulación.

Determinación del pH

El método a que esta Norma se refiere se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (NOM-F-317-S-1978).

Determinación de proteína

El método mayormente utilizado para el análisis de proteínas es el referenciado por la Association of Analytical Communities (AOAC International) usado en la actualidad para el análisis de proteínas (método Kjeldahl) mediante la determinación de nitrógeno orgánico. En esta técnica se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos de los alimentos en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total se convierte mediante esta digestión en sulfato de amonio. La mezcla digerida se neutraliza con una base y se destila posteriormente. El destilado se recoge en una solución de ácido bórico. Los aniones del borato así formado se titulan con HCl (o H_2SO_4) estandarizado para determinar el nitrógeno contenido en la muestra (Lynch y Barbano, 1999).

Según García et al., 2012 los resultados obtenidos del análisis de leche es una buena aproximación del contenido de proteína cruda de la misma ya que el nitrógeno también proviene de componentes no proteicos.

Determinación de humedad

La determinación de humedad en los alimentos es de suma importancia, ya que un elevado contenido de ésta influye en la velocidad de multiplicación de los microorganismos siendo reportado por Block en el 2009 que la humedad relativa mínima para el desarrollo de estos es de 75 a 95 por ciento, provocando su descomposición y por lo tanto la pérdida de la calidad sanitaria. El método para determinar el porcentaje de humedad se encuentra descrito en la NOM-184-SSA-2002 la cual se basa fundamentalmente en la deshidratación del producto y el peso final del mismo.

Pruebas microbiológicas de interés aplicables en leche cruda y queso artesanal

Prueba de coliformes totales

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuada, la prueba utilizada es la descrita por la NOM-243-SSA1-2010 en los apéndices B10, B16, B17, B13, y B12.

El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

- La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.
- La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.

- La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares (NOM-243-SSA1-2010).

Prueba de mesófilos aerobios

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de 48 ± 2 horas y temperatura de incubación de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores (NOM-243-SSA1-2010).

Prueba de Salmonella spp

Tiene como propósito establecer las especificaciones sanitarias para los quesos frescos, madurados y procesados; con el fin de reducir los riesgos de transmisión de enfermedades causadas por alimentos, así como propiciar que se

procesen e importen productos de la calidad sanitaria necesaria para garantizar la salud del consumidor.

Los miembros del género *Salmonella spp.* han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección (NOM-210-SSA1-2014).

Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos. Las modificaciones a los métodos consideraron dos aspectos principales, el primero es el debilitamiento o daño a las células bacterianas presentes en un alimento debido al proceso a que está sujeto (por ejemplo: tratamiento térmico, secado, etc.) no siendo el caso para leche cruda y segundo, la variabilidad inherente a la naturaleza del producto bajo estudio (NOM-210-SSA1-2014).

La determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella spp.*, en cierta cantidad de masa o volumen específico de producto, se lleva a cabo acorde a lo descrito en el presente método, requiriendo 4 etapas sucesivas. Las cuales son:

- Etapa de pre-enriquecimiento.
- Enriquecimiento selectivo.
- Aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales.
- Identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos (NOM-210-SSA1-2014).

Salmonella spp puede presentarse en concentraciones bajas y en algunas ocasiones ir acompañada de una gran cantidad de biota microbiana y de otras enterobacterias y otros géneros bacterianos. Es por lo que se hace necesario el pre-enriquecimiento para permitir la detección de un número bajo de bacterias o células estresadas de *Salmonella spp*. (NOM-210-SSA1-2014).

Aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas

Se dispone actualmente de muchos medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de las bacterias lácticas, aunque sólo algunos de ellos se los considera efectivamente selectivos. Entre estos los normalmente utilizados son agar M17 para *Lactococcus spp* y agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) para *Lactobacillus spp*, observado que al cambiar en particular una condición de estos medios se pueden aislar otras especies; por ejemplo, el M17 al incubarlo a 37°C es suficiente para permitir el desarrollo de *Streptococcus thermophilus* y a 25°C para *Lactococcus spp*. La dominancia de *Lactococcus spp* en los primeros días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda es claramente estudiada y se puede explicar por el elevado número de estas bacterias en la leche. En las etapas posteriores del madurado (30 a 45 días), la proporción entre *Lactococcus spp* y *Lactobacillus spp* se invierte y pasan a dominar *Lactobacillus spp*. Por otra parte, los microorganismos patógenos, durante los primeros 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda, pierden viabilidad debido al efecto combinado en disminuir los valores de pH, concentración de sal, actividad de agua, y producción de bacteriocinas en el interior del queso. La capacidad diferenciadora para bacterias ácido lácticas se basa en las

características bioquímicas (catalasa, oxidasa y coloración de gran, prueba de KOH para confirmar) de las especies a aislar (Hassan y Frank, 2001; Suarez et al., 2008).

En el cuadro 2, se muestran las características bioquímicas de especies del género *Lactococcus* (Abdi y Soleimanian-Zad, 2006; Manolopoulou et al., 2003).

Cuadro 2 Características bioquímicas de bacterias ácido lácticas pertenecientes al género *Lactococcus* spp.

Característica	<i>Lactococcus</i>	
CO ² a partir de glucosa	-	
Crece a 10°C		
Crece a 45°C		
Crece a 6.5% NaCl	+/-	<i>L. lactis</i> si presenta esta actividad.
Crece a 18% NaCl	-	
Crece a pH 9.6	+/-	<i>L. lactis</i> si presenta esta actividad.
Catalasa	-	
+/-Respuesta variable según la especie.		

Abdi y Soleimanian-Zad, (2006); Manolopoulou et al., (2003)

En el cuadro 3 se muestran las propiedades tecnológicas de los *Lactobacillus* mencionando las especies más importantes en el ambiente lácteo (Amarita, et al., 2001). Los *Lactobacillus* poseen propiedades que los diferencian de otras especies de BAL, una de ellas siendo muy importante en la contribución de la textura de los quesos es la producción de CO² el cual proporciona los agujeros en el producto, y contribuye en la textura de este.

Cuadro 3 Características fenotípicas bacterias ácido lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus* spp.

Característica	Reacción	Especies
CO ² a partir de glucosa	- +	<i>L. casei</i> <i>L. paracasei</i>
Crece a 10°C	+	<i>L. plantarum</i>
Crece a 45°C	-	<i>L. plantarum</i>
Crece a 6.5% NaCl	-	<i>L. plantarum</i>
Crece a pH 9.6	-	<i>L. casei</i> (pH óptimo es de 5.5)
Catalasa	-	
+/-Respuesta según la especie.		

Amarita, et al., (2001); Abdi and Soleimanian-Zad, (2006); Manolopoulou et al., (2003)

Los *Enterococcus* se encuentran en varios tipos de quesos tradicionales en los cuales contribuyen al proceso de fermentación y de maduración gracias a su actividad proteolítica, hidrólisis de la grasa de la leche por la esterasa y la producción de componentes típicos del sabor tal como acetaldehído, acetona, y diacetil, los cuales son responsables del desarrollo particular de las características sensoriales de muchas variedades de quesos. En el cuadro 4 se muestran las propiedades tecnológicas de los *Enterococcus* (Gelsomino et al., 2001).

Cuadro 4 Características fenotípicas de la bacteria ácido láctica pertenecientes al género *Enterococcus*.

Característica	Reacción
Crece a 10°C	+
Crece a 45°C	+
Crece a 6.5% NaCl	+
Crece a 18% NaCl	-
Crece a pH 9.6	-
Catalasa	-
+/-Respuesta según la especie.	

Fuka et al., (2017); Gelsomino et al., (2001)

Se conoce que las bacterias del género *Paenibacillus* tienen una fuerte influencia en la coagulación de la leche para la producción de cualquier tipo de queso. En el cuadro 5 se muestran las propiedades tecnológicas de los *Paenibacillus chibensis* en el ambiente lácteo (Miyashita, 2007).

Cuadro 5 Características fenotípicas la bacteria ácido láctica pertenecientes al género y especie *Paenibacillus chibensis*

Característica	Reacción
Crece a 5°C	-
Crece a 40°C	+
pH 5.7	+
Crece a 5% NaCl	-
Oxidasa	-
Catalasa	+
+/-Respuesta según la especie.	

(Shida et al., 1997)

Pruebas bioquímicas para identificación de grupos de bacterias

Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.

Suspender un poco de la colonia desarrollada proveniente del cultivo de elección con un hasa sobre un portaobjetos y posteriormente colocar una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de un gotero o pipeta Pasteur y se procede a detectar la presencia o ausencia de burbujas (NOM-243-SSA1-2010).

Prueba de oxidasa

Esta prueba consiste en determinar la presencia del citocromo C. La oxidación se detecta como color azul.

Se utiliza papel filtro cortado (trozos de 3 x 1 cm) y se coloca sobre una caja Petri y se añade reactivo de oxidasa y se deposita sobre el reactivo con un palillo de madera o con un asa de platino nueva, un poco de la colonia desarrollada proveniente del cultivo de elección. La reacción positiva la indica un color azul - violeta intenso. La prueba es rápida y los resultados se muestran en cuestión de segundos (NOM-243-SSA1-2010).

MATERIALES Y METODOS

Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en unidades de producción de queso que producen un queso del tipo prensado y oreado y que han instrumentado Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) dentro de programas de Desarrollo Rural en Baja California desde el 2015; las cuales se encuentran ubicadas en la región de Ojos Negros, Municipio de Ensenada Baja California México (31 °54' y 41.11' latitud norte y 116°16' y 26.07' longitud oeste).

Los análisis microbiológicos y fisicoquímicos se efectuaron en el queso y se desarrollaron en el Laboratorio de Leche y los análisis moleculares se desarrollaron en el Laboratorio de Biología Molecular ambos laboratorios del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

Diseño del estudio y toma de muestras

Para el estudio se eligieron tres Unidades de Producción (UP) que elaboran queso del tipo prensado, oreado y que han trabajado en un programa de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) promovido por la Secretaria de Desarrollo Rural (SEDER) desde 2015. Se recolectaron 2 quesos (2.5 kg) elaborados en el periodo de verano y 2 quesos (2.5 kg) en el periodo de invierno por cada una de las UP mismas que fueron seleccionadas aleatoriamente para realizar los análisis microbiológicos y fisicoquímicos. Las muestras fueron identificadas y

transportadas en bolsas estériles y colocadas en hieleras a una temperatura promedio de (7-10°C) para su posterior análisis al laboratorio.

Análisis de laboratorio

Tratamiento de muestras

Las dos piezas de queso de 2.5 kg tomadas en invierno y verano de cada UP fueron divididos a la mitad, obteniendo así 4 porciones del queso, la primera porción correspondió al día uno, las porciones restantes fueron sometidas a 21, 42 y 63 días de maduración almacenadas a una temperatura de 15°C y 80% HR utilizando un refrigerador convencional (Whirlpool, Co) con un dispositivo aireador y humidificador colocado en su interior.

Las muestras de queso fueron examinadas consecutivamente durante los tiempos de maduración. De cada pieza se tomaron 10g de muestra en 90mL de agua peptonada bufferada 1% (Difco, New Jersey) respectivamente, utilizando el digestor Stomacher modelo 400 (Seward Laboratory Systems, Bohemia, NY) por dos minutos. Diluciones de cinco decimales se prepararon en tubos con 9mL de PBS [NaH₂PO₄.H₂Og] (Fermont, Mirador, Monterrey), para luego sembrar por duplicado y realizar las siguientes pruebas acorde a la norma oficial mexicana NOM-243-SSA1 (2010).

Análisis microbiológico

Las muestras de queso fueron examinadas consecutivamente durante los tiempos de maduración. Para el análisis microbiológico de los recuentos de coliformes (CT) y mesófilos aerobios (CMA) se utilizó el método descrito por Borelli

(2006) así como también los procedimientos descritos respectivamente en los apéndices B10, B16, B17, B13, y B12 de la NOM-243-SSA-2010 y para los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizó el protocolo de Menéndez y colaboradores (2001). Las muestras de queso se homogeneizaron en porciones de 10 gramos con 90 ml de agua peptonada tamponada al 0.1% (Difco, New Jersey) en un Stomacher modelo 400 Seward Laboratory Systems, Bohemia, NY) durante 1 minuto para cada una de las muestras del producto tanto para verano como para invierno y se prepararon diluciones decimales (10^1 - 10^5) usando por lo tanto el mismo diluyente. Todos los análisis microbiológicos fueron realizados por duplicado (Rodríguez et al., 2009).

Conteo de bacterias coliformes y mesófilos aerobios

Las muestras fueron analizadas en busca de bacterias mesófilas aerobias en agar para métodos estándar (MCD LAB, Edo. De México) con recuento en placa utilizando 12 ml del agar y 1 ml de las diluciones anteriores por placa; la aparición de microorganismos coliformes se determinó en agar Bilis y Rojo Violeta (MCD LAB, Edo. De México) con recuento en placa utilizando 12 ml del agar y 1 ml de las diluciones anteriores por placa. Las placas fueron incubadas $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas (Borelli et al., 2006; NOM-243-SSA1-2010).

Análisis para la detección de Salmonella spp.

La detección de *Salmonella* spp. se llevó a cabo después del enriquecimiento previo en peptona- agua tamponada y enriquecimiento en Caldo Tetratiónato y caldo Rappaport-Vassiliadis (Laboratorios Conda, España) los cuales fueron incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, respectivamente. Muestras

incoloras de aspecto lechoso del medio o por la turbidez serían señaladas como positivas a la prueba, lo contrario a esto serían señaladas como negativas, aquellas que fueron consideradas sospechosas se sembraron en agar Verde Brillante (Difco Laboratories, USA) cuya interpretación se describe como blanco rosadas o transparentes sobre fondo rojo y agar xilosa lisina desoxicolato por sus siglas como XLD (Difco Laboratories, USA), donde las colonias típicas de *Salmonella spp* son de color rojo con el centro negro. Las colonias típicas se identificaron mediante pruebas bioquímicas agar Tripe Sugar Iron (TSI), pruebas de fermentación de Lisina Iron Agar (LIA), medio de SIM y agar citrato de Simmons. Se procedió a hacerle a los subcultivos la prueba de oxidasa y catalasa (Borelli, 2006; González et al., 2014; NOM-210-SSA1-2014).

Análisis para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

A partir de las diluciones de 10^1 - 10^5 se procedió a buscar *Lactobacillus* mesófilos y termófilos en 12 ml de agar MRS (Difco, New Jersey) por 1 ml de la dilución para cada una de las muestras, una vez hechos los cultivos se introdujeron en una jarra anaerobia, este ambiente fue propiciado por la introducción de una vela encendida para lograr la reducción de O^2 y aumento de CO^2 y se incubaron a $35 \pm 2^\circ C$ durante 24 a 48 horas, para *Lactococcus* mesófilos y termófilos se cultivó en agar M17 (Difco, New Jersey) con 10% de dextrosa (Difco, New Jersey) con recuento en placa utilizando 12 ml del agar y 1 ml de la dilución y se incubó posteriormente bajo las mismas condiciones utilizadas en el agar MRS (Difco, New Jersey). Se procedió a realizar el conteo de las unidades formados de colonias (UFC) y se seleccionaron al menos cinco colonias de agar

MRS y M17 las cuales fueron resembradas en el mismo medio correspondiente de cada muestra y se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dentro de una jarra anaerobia durante 24 a 48 horas. Se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa una vez transcurrido el tiempo y se realizaron las tinciones para Gram (López-Jácome et al., 2014). A partir de este nivel del experimento se identificó el género de la bacteria ácido láctica. Se procedió a crioconservar a temperatura de aproximadamente -20°C las cinco colonias por placa en sus respectivos agares en viales con glicerol al 15% (Difco, New Jersey) para su posterior análisis de PCR, se identificaron marcándoles el medio utilizado, el grupo y número de la colonia (Menéndez et al., 2001).

Para el análisis de PCR se reactivaron las bacterias que fueron crioconservadas realizando un subcultivo en tubo de 4mL ya sea de caldo MRS o M17 según las cepas de BAL siguiendo el protocolo de aislamiento de cada una y se pusieron a incubar a 35°C por 24 horas. Se procedió a realizar la extracción de ADN, utilizando el protocolo diseñado para purificación total del ADN de bacterias gram-positivas, ya que se trata de identificar BAL. Las células del cultivo nuevo se depositaron en un microtubo de 1.5 mL (1000 μL) y se centrifugaron para recolectar la mayor cantidad de ADN por 3 min a 14,000 rpm y se le añadió 180 μL de buffer de lisis enzimática “lisozima BAL” (Kit QIAGEN) y para posteriormente mezclar el microtubo en vortex (Fisher Scientific). Una vez mezclada la lisozima y el ADN se incubaron a 37°C , durante 1 hora utilizando el equipo “Thermomixer R” Eppendorf a 300RPM. Después de la incubación, se les añadió 25 μL de “Proteinasa K” y 200 μL de buffer AL sin etanol (Kit QIAGEN) y se mezclaron en vortex para

posteriormente incubarse a 56°C por 30 minutos a 300RMP utilizando el equipo “Thermomixer R” eppendorf, seguidamente se le agregaron 200 µl de etanol del 96-100% a cada una de las muestras mezclándolas bien por agitación en vortex. El contenido total (600µl) se pasó con micropipeta a las columnas de centrifugación (DNeasy Mini: columna con colector/2mL), previamente identificadas con el número de la muestra; se centrifugaron en “Centrifuge 5415 C” eppendorf a 10,000RPM por 1 minuto. Posteriormente se extrajeron las columnas (DNeasy Mini) y se colocaron en un nuevo micro-tubo de 2mL, desechando el anterior; se añadieron 500 µl de “Buffer AW1” (Kit QIAGEN) y se centrifugaron por 1 min a 10,000 RPM. Se agregaron 500 µl de “Buffer AW2” (Kit QIAGEN) para posteriormente centrifugarlo durante 3 minutos a 14,000 RPM para secar la membrana de la columna. Para secar las columnas se colocaron en el equipo “Vacofuga-eppendorf” por 10minutos a 45°C. Se colocaron las columnas (DNeasy Mini) en un nuevo tubo eppendorf de 1.5mL (debidamente identificado) y se agregaron 150µL de agua grado molecular-H₂O Mol (Thermo Scientific) y se centrifugaron a 8,000RPM por 1 minuto. Se desecharon las columnas y se cerraron los tubos eppendorf y quedo listo el producto de extracción con ADN suspendido en el agua grado molecular. Después de extraer el ADN, se elaboró la electroforesis en gel de agarosa (Difco, New Jersey) para cuantificar por espectrofotometría la cantidad que se extrajo de genoma. Posteriormente se realizó la amplificación del ADN bacteriano para la posterior secuenciación del fragmento de PCR para la identificación de los microorganismos. Se utilizaron 2 µl de cada una de las muestras de DNA extraído (BAL), y 23 µl de Master Mix comercial (Thermo Scientific) la preparación de éste se encuentra en el cuadro 6

y se centrifugaron por 10 segundos. Se colocaron los viales en el equipo “termociclador PCR” por 2:30 horas, una vez registradas las condiciones de temperatura y tiempo en las que se trabaja el PCR universal, se procedió a realizar electroforesis nuevamente (Chebeňová-Turcovská et al., 2012; Randazzo et al., 2002).

Cuadro 6 Receta de preparación del Master Mix Comercial® por muestra

Reactivos utilizar	Concentración requerida
H ₂ O molecular	9.5µl
PCR Mix	12.5 µl
Oligo UNI 8F	0.5µl
Oligo UNI 535R	0.5µl

Randazzo et al (2002).

Para la preparación del fragmento de PCR se utilizaron cajas Petri con agua destilada suspendiendo un filtro poro de 0.025 µm (Merck Millipore Ltd.) colocando encima de éste 15µl del producto de PCR de cada muestra recuperando las mismas en un espacio de 8 minutos entre una muestra y otra. Se preparó el concentrado del producto purificado utilizando 1 µl del oligo F, agua grado molecular y producto de PCR de cada una de las muestras una vez filtrado, posteriormente se identificaron y se mandaron a Eurofins Genomics LLC (Sandiego, USA) para obtener la secuenciación del fragmento. Una vez teniendo la secuenciación del fragmento de PCR se utilizó el programa BLAST® del

National Center for Biotechnology Information (NCBI) de USA para identificar nuestra secuencia de ADN (Ramos-Izquierdo et al., 2006, Ramos et al., 2017).

Análisis fisicoquímico

Determinación de acidez

El método utilizado esta descrito en la NOM-155-SCFI-2012| y se aplicó para el análisis en cada una de las 12 muestras de queso al momento de la recepción de la muestra al laboratorio. Se utilizaron 10 gramos de queso en agua destilada previamente homogeneizado en Stomacher 400 circulator marca Seward y se colocó en un vaso precipitado de 50 ml por duplicado, se procedió a colocar 3 gotas de fenolftaleína al 1% a la muestra agitando suavemente. Se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) a través de una bureta de 50 ml graduada y se consideró la cantidad de NaOH utilizado para neutralizar los grupos ácidos.

La acidez fue reportada en % de ácido láctico, el cual se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Acidez g/L (ácido láctico)} = \frac{V \times N \times 0.090}{M}$$

Dónde:

- V= Volumen de solución de NaOH 0.1 N gastado en la titulación de la muestra
- N= Normalidad de la solución NaOH

- M= Volumen de la muestra
- 0.090= Equivalente del ácido láctico

Determinación de pH.

El método utilizado se encuentra descrito en la NOM-F-317-S-1978 en el cual se utilizó 10 gramos de queso previamente homogenizados en agua destilada. Posteriormente se calibró el potenciómetro en soluciones reguladoras de pH4, pH7 y pH10 y se procedió a introducir los electrodos en la muestra y se leyó el valor del pH directamente en la escala del potenciómetro.

Determinación de humedad

El porcentaje de humedad se determinó por la pérdida de agua de una muestra de 10g de queso por triplicado a una temperatura de $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, se enfriaron en un desecador y se pesaron. Se determinó por la pérdida gradual de peso por ignición según metodologías de la NOM-184-SSA (2002).

Determinación de proteína

La proteína cruda se determinó utilizando el método indirecto de nitrógeno Kjeldahl del AOAC, (1995) multiplicado por el factor de expresión del contenido de nitrógeno en porcentaje de proteína para productos lácteos (6.38), se utilizó 1g de muestra homogenizada por triplicado, la cual se colocó junto a 10g de mezcla digestora en un matraz Kjeldahl, añadiéndole 25mL de ácido sulfúrico concentrado. Luego procedió a la destilación, hasta obtener 200mL de destilado en un matraz Erlenmeyer con 50mL de ácido Bórico (H_3BO_4) al 4% con 3 gotas de indicador rojo de metilo y titularlo con ácido clorhídrico 0.1N.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los efectos sobre el crecimiento microbiológico en quesos artesanales a través de los días de maduración (1, 21, 42 y 63) y la estación del año (verano e invierno) se muestran en el cuadro 7. Los resultados muestran que no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de las poblaciones de coliformes totales, CMA, bacterias en medio MRS y bacterias en medio M17 entre las dos estaciones del año evaluadas.

Además, se encontró una correlación negativa entre la producción de coliformes totales conforme van incrementando los días de maduración evaluadas ($p < 0.05$) en el periodo de invierno. Sin embargo, al realizar el mismo análisis para la estación de verano solo se observó una tendencia negativa ($P = 0.05$). Este hallazgo de la reducción de coliformes puede ser explicado en parte a la presencia de las BAL ya que Volken de Souza et al., (2002) mencionan que el tiempo de maduración tiene una influencia significativa sobre el conteo de esta población conforme transcurren los días de maduración (> 60 días). Es importante señalar que los conteos de coliformes totales tanto en invierno como en verano desde el primer día de maduración se encuentran dentro de la normativa (NOM-243-SSA1-2010) por lo anterior lo clasifica como un queso apto para el consumo humano.

En relación con las bacterias mesófilas no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) conforme avanzan los días de maduración, una posible explicación a esto es que podría deberse a la presencia de BAL (Acevedo D. et al., 2010). Es importante señalar que de acuerdo a la normatividad

(NOM-243-SSA1-2010) los valores microbiológicos que resultaron de la evaluación del) queso para mesófilos aerobios en los dos periodos se encuentran dentro de los límites máximos permisibles a los días 1, 21, 42 y 63. Por lo anterior, las bacterias mesófilas detectadas en el queso no representan un riesgo de salud pública para el consumidor.

Con respecto a las bacterias aisladas en medio MRS no se encontró ningún tipo de correlación ($P > 0.05$) entre la producción de éstas y los días de maduración en ninguno de los dos periodos, sin embargo al evaluar las bacterias en medio M17 se observó una correlación negativa ($P < 0.05$) en el periodo de verano, esto debido a la evidente presencia de flora bacteriana, estos resultados coinciden con los reportados por Acevedo y colaboradores en el 2010 en un queso artesanal colombiano donde las BAL mantuvieron las poblaciones constantes. Esto es deseable debido a que les confieren características organolépticas deseables y desempeñan una función conservadora mediante la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas, siendo reconocidas por la Food and Drug Administration (FDA) por sus beneficios a la salud humana.

Cuadro 7 Efecto de los días de maduración (1, 21, 42 y 63) y la estación del año (verano e invierno) sobre el crecimiento microbiológico en quesos artesanales.

Variables en queso	Días de maduración	Media± SD por periodo (log 10 CFU/g)	
		V	I
Coliformes totales	1	6.13 ± 0.49	5.69 ± 2.80
	21	3.60 ± 0.65	4.19 ± 0.82
	42	3.37 ± 0.5018	2.85 ± 0.99
	63	1.85 ± 0.76	1.20 ± 1.31
		<u>P = 0.05</u>	<u>P < 0.05</u>
Conteos de mesófilos aerobios	1	7.03 ± 0.39	7.43 ± 0.73
	21	7.17 ± 0.17	7.76 ± 0.46
	42	6.89 ± 0.82	7.28 ± 1.19
	63	5.98 ± 0.33	7.28 ± 0.10
		<u>P > 0.05</u>	<u>P > 0.05</u>
Medio MRS	1	7.23 ± 0.10	6.74 ± 0.60
	21	7.13 ± 0.42	6.79 ± 0.27
	42	6.54 ± 0.30	6.60 ± 0.26
	63	6.60 ± 0.30	7.05 ± 0.15
		<u>P > 0.05</u>	<u>P > 0.05</u>
Medio M17	1	7.28 ± 0.03	7.16 ± 0.36
	21	7.16 ± 0.40	6.81 ± 0.39
	42	6.96 ± 0.46	5.92 ± 0.61
	63	6.49 ± 0.11	6.75 ± 0.28
		<u>P < 0.05</u>	<u>P > 0.05</u>

El cuadro 8 muestra el efecto de dos periodos estacionales sobre el crecimiento microbiológico en quesos artesanales. Donde se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre los conteos de microorganismos de los quesos que fueron elaborados en el periodo de verano en comparación con los quesos de invierno. Una posible explicación a este evento es que la temperatura media de los meses más calientes (entre julio y agosto) es de 26.3° lo que resulta una temperatura que no favorece la proliferación de los microorganismos evaluados (Caridi et al., 2003).

Cuadro 8 Efecto de dos periodos estacionales sobre el crecimiento microbiológico en quesos artesanales.

Variables en queso	Media $\pm$ SD por periodo (log 10 CFU/g)		
	Verano	Invierno	Valor P
Coliformes totales	3.73 $\pm$ 1.68	3.48 $\pm$ 2.24	>0.05
Conteos de mesófilos aerobios	6.77 $\pm$ 0.64	7.44 $\pm$ 0.66	>0.05
Bacterias acido lácticas MRS	6.88 $\pm$ 0.41	6.80 $\pm$ 0.35	>0.05
Bacterias acido lácticas M17	6.97 $\pm$ 0.41	6.66 $\pm$ 0.60	>0.05

En el cuadro 9, se presenta el efecto de los días de maduración (1,21,42 y 63) y la estación del año (verano e invierno) sobre la composición fisicoquímica en quesos artesanales. Con relación a los niveles de proteínas no se presentó correlación entre los niveles de proteínas y los días de maduración en ninguno de los dos periodos ($P>0.05$), esto puede ser característico en este tipo de quesos donde la actividad proteolítica de enzimas de origen microbiano se lleva a cabo de manera moderada a través del proceso de maduración (De Wit et al., 2005). Sin embargo, Nikolaou y colaboradores (2002), mencionan que la proteólisis también depende de la concentración de sal presente dentro del producto, el cuajo residual, proteinasas endógenas de la leche, la temperatura durante la maduración y cambios en el pH a través del proceso. Por otra parte, los resultados de proteína evaluados en nuestro estudio coinciden con los reportados por Callon et al (2005) en un tipo de queso francés elaborado con leche cruda al termino de 30 días de maduración y con los de Camara et al., (2017) en un queso de 21 días en dos

periodos estacionales, en los que se aprecian niveles de proteína entre 33.2% y 40.9% respectivamente.

Con relación al porcentaje de humedad se encontró una correlación negativa conforme van incrementando los días de maduración ($p= 0.05$) en el periodo de invierno, esto posiblemente debido a las bajas temperaturas de la región. Chichoscki et al. (2002), analizó el efecto de las condiciones climáticas de las diferentes temporadas del año en las características de un queso brasileño y observó que la humedad del queso varió significativamente con los valores más altos detectados en invierno. Respecto al pH se observó un incremento significativo entre el día 21 y 42 en el verano resulta de la actividad metabólica de las BAL y/o del proceso proteolítico que libera grandes cantidades de compuestos alcalinos (Arteaga et al., 2009). En el invierno, el pH no presentó variaciones significantes después del primer día de maduración. Las bajas temperaturas de este periodo favorecen a la reducción en la intensidad de las reacciones bioquímicas, resultando un constante nivel de pH hasta el fin del proceso. Souza y colaboradores en el 2003 mencionaron que los valores de pH durante la maduración principalmente en verano favorecen la acción de las proteasas utilizadas por las bacterias, las cuales presentan máxima actividad en intervalos de pH entre 5.5-6.5. En relación con la acidez también se observó una correlación negativa ($p<0.05$) entre la producción de ésta y los días de maduración en los dos periodos. Estos resultados son deseables ya que las poblaciones constantes de BAL al paso de los días resultan en una alta producción de ácido láctico debido a

su proceso fermentativo propiciando una función conservadora de manera natural al queso (Vasek et al., 2008).

Cuadro 9. Efecto de los días de maduración (1, 21, 42 y 63) y la estación del año (verano e invierno) sobre las características fisicoquímicas en quesos artesanales

Variables de queso	Días maduración		Media $\pm$ SD por periodo	
			V	I
Proteína	1	n= 3	46.46 $\pm$ 2.95	21.10 $\pm$ 2.15
	21		45.72 $\pm$ 2.24	28.76 $\pm$ 2.46
	42		46.20 $\pm$ 2.22	27.46 $\pm$ 2.20
	63		49.07 $\pm$ 5.37	33.88 $\pm$ 5.37
			<u>P> 0.05</u>	<u>P >0.05</u>
%Humedad	1	n= 3	49.78 $\pm$ 3.09	48.92 $\pm$ 5.09
	21		37.58 $\pm$ 4.45	43.99 $\pm$ 1.45
	42		41.07 $\pm$ 17.09	36.14 $\pm$ 5.59
	63		34.46 $\pm$ 5.86	33.16 $\pm$ 4.70
			<u>P>0.05</u>	<u>P<0.05</u>
PH	1	n= 3	5.66 $\pm$ 0.57	5.79 $\pm$ 0.48
	21		5.83 $\pm$ 0.28	5.05 $\pm$ 0.23
	42		6.0 $\pm$ 0	5.34 $\pm$ 0.64
	63		5.18 $\pm$ 0.15	5.30 $\pm$ 0.31
			<u>P>0.05</u>	<u>P>0.05</u>
Acidez	1	n= 3	0.38 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.06
	21		0.55 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.05
	42		0.77 $\pm$ 0.17	0.81 $\pm$ 0.28
	63		0.93 $\pm$ 0.18	0.95 $\pm$ 0.12
			<u>P<0.05</u>	<u>P<0.05</u>
		X $\pm$ SD (n=12)		

En el cuadro 10 se evaluó el efecto de los periodos verano e invierno sobre las características fisicoquímicas en el queso artesanal. Al evaluar los niveles de proteínas los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) entre dos diferentes periodos estacionales, mostrando en verano un

incremento en los niveles de proteína esto puede ser atribuido a que la pérdida de agua tiende a ser mayor debido a las altas temperaturas promoviendo así la concentración de los sólidos totales (Arteaga et al., 2009). Sin embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P>0.05$) en cuanto a las variables del porcentaje de humedad, pH y acidez.

Cuadro 10 Efecto de dos periodos estacionales sobre las características fisicoquímicas en quesos artesanales.

Variables en queso	Media $\pm$ SD por periodo (log 10 CFU/g)		
	Verano	Invierno	Valor P
Proteína	46.86 $\pm$ 3.24	27.80 $\pm$ 5.54	<0.05
Humedad %	40.72 $\pm$ 10.02	40.55 $\pm$ 7.57	>0.05
pH	5.67 $\pm$ 0.42	5.37 $\pm$ 0.47	>0.05
Acidez	0.66 $\pm$ 0.25	0.68 $\pm$ 0.29	>0.05

La figura 1, muestra las diferentes cepas (n=43) que fueron identificadas como BAL por medio de procedimientos moleculares durante diferentes tiempos de maduración del queso artesanal producido en Ojos Negros, en términos generales las cepas de las bacterias que se encontraron en el transcurso de la maduración fueron los *Enterococcus* siendo las bacterias ácido lácticas más abundantes (48.83%), seguido por *Lactobacillus* (39.53%), *Lactococcus* (6.97%) y *Paenibacillus*(2.32%), resultados similares fueron descritos por Jokovic y colaboradores en el 2011 quienes analizaron quesos elaborados en una localidad de Serbia que comparte las mismas características de clima que Ojos Negros.

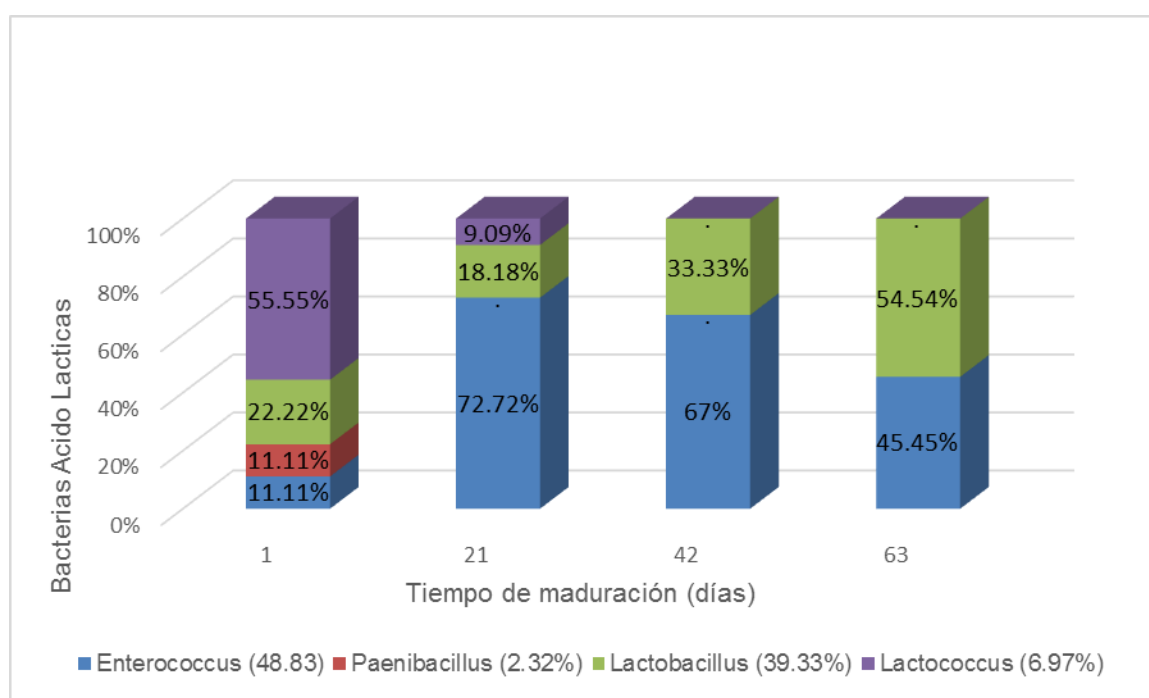
Al evaluar la presencia de las BAL conforme transcurre el tiempo de maduración podemos observar con respecto a *Enterococcus* que a partir del día

21 se aprecia una disminución gradual de su presencia. Sin embargo, no existe correlación ($p>0.05$) entre la disminución de estos con relación a los días de maduración, Marilena Marino et al. (2003), Öner et al (2006), reportan que este grupo de bacterias es uno de los más resistentes para condiciones adversas tales como la sal y la acidez y pueden influenciar al proceso de maduración también debido a la actividad proteolítica, lipolítica y su habilidad para estimular la producción de ácido láctico esto puede explicar su presencia a lo largo del proceso. Sin embargo, Sarantinopoulos et al (2001) reportan un rápido descenso de esta especie durante el proceso de maduración. Por otra parte, Jokovic y colaboradores (2011) mencionan que los *Enterococcus* son bacterias que juegan un papel importante en cuanto al desarrollo del sabor por lo anterior, este hallazgo podría ser la explicación al sabor amargo característico del queso de Ojos Negros.

En relación a *Lactobacillus* se aprecia un aumento gradual de su presencia a partir del día 42 pero no existió correlación ($p>0.05$) entre el aumento de *Lactobacillus* con relación a los días de maduración, sin embargo, Jokovic et al., 2011 y Volken de Souza et al., 2003 reportan esta especie en altas proporciones en los últimos días de maduración ya que tienen la habilidad de crecer en las altas condiciones selectivas de las últimas etapas de la maduración, además mencionan que durante el proceso de fermentación la formación de grandes cantidades de metabolitos, tales como lactato, citrato, glicerol y aminoácidos entre otros, son mejor utilizados por los *Lactobacillus*, sugiriendo que estos microorganismos juegan un papel importante en la producción de este queso. Por último, la presencia de *Lactococcus* también fue evaluada conforme transcurre el

tiempo de maduración. Los resultados indican que existió correlación entre los días de maduración y la disminución de este grupo de bacterias, resultados similares fueron reportados por Nikolaou et al., (2002) y Bintsis y Papademas (2002).

Figura 1 Identificación de 43 cepas BAL a diferentes tiempos de maduración del queso artesanal producido en Ojos Negros



En las especies de bacterias ácido lácticas aisladas del queso (Cuadro 11), al primer día y a los 21 días de maduración se encontró la BAL del género *Lactococcus* (N=3) únicamente en el periodo verano donde la única especie encontrada fue *Lactococcus lactis* spp. *lactis* con ausencia en el periodo de invierno, esto coincide con lo reportado por Mannu y Paba en el 2002, quienes mencionan que este tipo de BAL se presentan al inicio de la maduración y

desaparece conforme va aumentado el tiempo de maduración. Por otra parte, los *Lactobacillus* (N=17) fueron las BAL más abundantes en el periodo de verano (n=9) donde se encontraron al día 1 y 63 la especie *Lb. paracasei spp. paracasei* (11.11% y 27.27% respectivamente), al día 21 la especie *Lb. zae* (9.09%) y *Lb. plantarum* al día 42 (25%) donde se observa que seguida la maduración a los 21 días del queso resulto una ligera disminución de los *Lactobacillus*, sin embargo, coincide con lo reportado por otros estudios que indican la presencia de ésta en las primeras etapas del proceso de maduración del queso y una disminución de la misma al transcurso del tiempo, sin embargo, en este estudio se mantuvieron constantes. Los *Lactobacillus* en el periodo de invierno (n=8) al primer día se encontraron las especies *Lb. garviae* (22.22%) *Lb. plantarum* (11.11%) y *Lb. rhamnosus* (11.11%) al día 21 de maduración se encontró nuevamente *Lb. plantarum* (9.09%), al día 42 de maduración *Lb. rhamnosus* (8.33%) y *Lb. casei* (18.18%) al día 63 de maduración, esto coincide con lo reportado por Coppola et al., (2000) donde hace mención que en las etapas de mayor tiempo de maduración predominaron los *Lactobacillus*, en su estudio las especies dominantes fueron *Lb. paracasei spp* y *Lb. rhamnosus*. Por otra parte, los *Enterococcus* (N=22) en el periodo de verano (n=6), fueron las BAL más abundantes seguidas por los *Lactobacillus* donde domino la especie *Enterococcus faecalis* (18.18%, 25% y 9.09%) al día 21, 42 y 63 días de maduración respectivamente. Durante el periodo de invierno los *Enterococcus* fueron las BAL más abundantes donde se encontró la especie *E. faecalis* (11.11 %, 45.45%, 41.66% y 18.18%) al día 1, 21, 42 y 63 de maduración respectivamente, la especie *E. faecium* (9.09% y 9.09%) fue encontrada al día 21 y 63 de maduración y al día

63 se encontró también la especie *E. durans* (9.09%)., el género más predominantes en esta etapa fueron los *Enterococcus* (N=22). Los *Enterococcus* y los *Lactobacillus* fueron los géneros de BAL más abundantes, indicándonos la influencia que tienen éstas sobre el olor, sabor y textura en los quesos artesanales que se elaboran en la región de Ojos Negros.

Cuadro 11 Especies de bacterias acidolácticas aisladas de queso artesanal durante dos periodos estacionales en cuatro diferentes tiempos de maduración.						
Especie	Verano/Invierno	% de aislados de BAL del queso				
		Días de maduración				
		1 N=9	21 N=11	42 N= 12	63 N=11	
Lactococcus						
<i>Lc.lactis spp.lactis</i>	Verano Invierno	22.22 -- n=2	9.09 -- n=1	-- --	-- --	n= 3 n= 0 N=3
Lactobacillus						
<i>Lb.casei</i>	Verano Invierno	-- --	-- --	-- --	-- 18.18	n= 0 n= 2
<i>Lb.garviae</i>	Verano Invierno	-- 22.22	-- --	-- --	-- --	n= 0 n= 2
<i>Lb. paracasei spp. paracasei</i>	Verano Invierno	11.11 --	-- --	-- --	27.27 --	n= 4 n= 0
<i>Lb. plantarum</i>	Verano Invierno	-- 11.11	-- 9.09	25 --	-- --	n= 3 n= 2
<i>Lb. rhamnosus</i>	Verano Invierno	-- 11.11	-- --	-- 8.33	-- --	n= 0 n= 2
<i>Lb. zae</i>	Verano Invierno	-- -- n=5	9.09 -- n=2	-- -- n=4	9.09 -- n=5	n= 2 n= 0 N=17
Enterococcus						
<i>E.durans</i>	Verano Invierno	-- --	-- --	-- --	-- 9.09	n= 0 n= 1
<i>E.faecalis</i>	Verano Invierno	-- 11.11	18.18 45.45	25 41.66	9.09 18.18	n= 6 n= 13
<i>E. faecium</i>	Verano Invierno	-- -- n=1	-- 9.09 n=8	-- -- n= 8	-- 9.09 n=5	n= 0 n= 2 N=22
Paenibacillus						
<i>P. chibensis</i>	Verano Invierno	11.11 -- n=1	-- -- n=0	-- -- n=0	-- -- n=0	n= 1 n= 0 N=1
						N= 43

Por último, ninguna de las muestras de queso obtenidas de las tres unidades de producción de Ojos Negros presentó colonias típicas del género *Salmonella spp* con lo establecido en la regulación Mexicana; esto probablemente pudo deberse por gracias al manejo de las buenas prácticas de manufactura durante la ordeña y dentro del área de producción así como consecuencia a las BAL presentes que actuaron inhibiendo en forma natural a estos patógenos como lo señalan D'Amico et al., 2010, Peña et al., (2011) y Oliszewski et al., (2007).

CONCLUSIONES

Se observó una tendencia en la disminución de la concentración de bacterias coliformes al incrementar el tiempo de maduración hasta los 63 días.

Las variables microbiológicas del queso artesanal de Ojos Negros no presentaron relación con el periodo en el que el queso fue elaborado.

El tiempo de maduración influyó en algunas características fisicoquímicas tal como la acidez donde se observó una tendencia a aumentar con respecto a los días de maduración siendo esta mayor al término de los 63 días. Las bacterias ácido lácticas son las encargadas de acidificar el producto, lo cual es importante para evitar la sobrevivencia de microorganismos patógenos, proporcionándole al queso características que permiten su conservación.

Los valores fisicoquímicos tales como la acidez, pH y humedad no se vieron afectados con respecto al periodo en el cual fue elaborado el queso. La proteína se puede ver afectada debido a la concentración de sólidos totales por las condiciones climáticas.

Las bacterias ácido lácticas tienen una fuerte influencia en las características organolépticas del queso en general, las bacterias del género *Enterococcus* fueron las bacterias dominantes en este tipo de queso artesanal producido en la región de Ojos Negros Baja California cuya presencia se presume es importante para atribuirle las características de olor, sabor y textura típico en estos quesos.

No únicamente el tiempo de maduración mayor a los 60 días es importante para la reducción de microorganismos no deseables, sin embargo, a mayor tiempo de maduración el queso va adquiriendo características que pueden ser favorables para la integridad del producto para que sea un alimento seguro.

LITERATURA CITADA

- Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimanian-Zad, S. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(1), 99-103.
- Acevedo, D., Urbina, G., & Conde, C. G. (2010). Tecnificación, caracterización fisicoquímica y microbiológica del queso de capa de Mompox Colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8(2), 41-45.
- A.Hernández, Ileana Alfaro, Ronaldo Arrieta. 2001. Microbiología Industrial. Editorial Universidad Estatal A Distancia. 70-76.
- Alejo-Martínez, K., Ortiz-Hernández, M., Recino-Metelín, B. R., González-Cortés, N., & Jiménez-Vera, R. (2015). Tiempo de maduración y perfil microbiológico del queso de poro artesanal. *Revista Iberoamerica de Ciencias*, 2(5), 15-24.
- Amarita, F., Requena, T., Taborda, G., Amigo, L., & Pelaez, C. (2001). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. *Journal of applied microbiology*, 90(6), 971-978.
- Arteaga, M., Molina, L. H., Pinto, M., & Brito, C. (2009). Caracterización de queso Chanco enriquecido con suero lácteo en polvo. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 53-62.
- Bintsis, T., & Papademas, P. (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 113-120.

- Borelli, B. M., Ferreira, E. G., Lacerda, I. C., Santos, D. A., Carmo, L. S., Dias, R. S., ...& Rosa, C. A. (2006). Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 545-550.
- Brooks, J. C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstrom, R., & Hutkins, R. (2012). Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, 31(2), 154-158.
- Callon, C., Berdague, J.L., Dufour, E., Montiel, M.C. The effect of Raw Milk Microbial Flora on the Sensory Characteristics of Salers-Type Cheeses, *J.Dairy Sci*, 88: 3840-3850 (2005).
- Camara P.A.S, Airidas D, Henrique J.D.S, Silva C.G.C, Malcata F.X, Enes D.M.L.N. Physicochemical, biochemical, microbiological and safety aspects of Pico cheese: Assessment throughout maturation and on the final product. *Dairy Technology*, 70: 542-555 (2017).
- Caridi, A., Micari, P., Foti, F., Ramondino, D., & Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprinod'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiology*, 20(2), 201-209.
- Chebeňová-Turcovská, V., Ženišová, K., Kuchta, T., Pangallo, D., & Brežná, B. (2011). Culture-independent detection of microorganisms in traditional Slovakian bryndza cheese. *International journal of food microbiology*, 150(1), 73-78.

- Cichoscki, A. J., Valduga, E., Valduga, A. T., Tornadijo, M. E., & Fresno, J. M. (2002). Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control*, 13(4-5), 329-336.
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., ...&Vandenplas, Y. (2013). Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1), 251-262.
- Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavari, C., & Grazia, L. (2000). Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Le Lait*, 80(5), 479-490.
- D'Amico, D. J., & Donnelly, C. W. (2010). Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *Journal of dairyscience*, 93(1), 134-147.
- De Wit, M., Osthoff, G., Viljoen, B. C., & Hugo, A. (2005). A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(6), 606-616.
- El Vigía. 2019. Pioneros del queso artesanal. Disponible en: <https://www.elvigia.net/el-valle/2013/4/28/pioneros-queso-artesanal-113027.html>
- Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., &Manachini, P. L. (2003).Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an

artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Tomapiemontese. *Food Microbiology*, 20(4), 397-404.

Fuentes-Coto, G., Ruiz-Romero, R. A., Sánchez-Gómez, J. I., Ávila-Ramírez, D. N., & Escutia-Sánchez, J. (2013). Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 10(4), 419-432

Fuka, M. M., Maksimovic, A. Z., Tanuwidjaja, I., Hulak, N., & Schlöter, M. (2017). Characterization of enterococcal community isolated from an Artisan Istrian raw milk cheese: Biotechnological and safety aspects. *Food technology and biotechnology*, 55(3), 368.

García Martínez, E. M., & Fernández Segovia, I. (2012). Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte.

Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J., & Cogan, T. M. (2001). Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International journal of food microbiology*, 71(2-3), 177-188.

González Pedraza, J., Pereira Sanandres, N., Soto Varela, Z., Hernández Aguirre, E. A., & Villarreal Camacho, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección.

Hassan, A.N. Y Frank, J.F (2001). Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; *Applied dairy microbiology*. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU.

- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6).
- Jokovic, N., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Tolinacki, M., & Topisirovic, L. (2011). Characterization of non-starter lactic acid bacteria in traditionally produced home-made Radan cheese during ripening. *Arch. Biol. Sci*, 63, 1-10.
- Lynch, J. M., & Barbano, D. M. (1999). Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *Journal-aoac international*, 82, 1389-1398.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Obtenido de [http://www. medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b. pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf)*.
- Lucey, J. A. (2015). Raw milk consumption: risks and benefits. *Nutrition today*, 50(4), 189.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., & Anifantakis, E. M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 153-161.
- Mannu, L., & Paba, A. (2002). Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *Journal of applied microbiology*, 92(1), 55-62.

- Marino, M., Maifreni, M., & Rondinini, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229(1), 133-140.
- Menéndez, S., Godinez, R., Centeno, J. A., & Rodríguez-Otero, J. L. (2001). Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows-milk cheese. *Food Microbiology*, 18(2), 151-158.
- Miyashita, S. (2007). *U.S. Patent No. 7,235,271*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Nikolaou, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2002). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal, low-fat cheese made from raw ovine milk during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 55(1), 12-17.
- NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.
- NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos.

Oliszewski R., Cisint J.C., Nunez de Kairuz M. Manufacturing characteristic and shelf life of Quesillo, an Argentinean tradicional cheese. *Food Control* 18: 736-741 (2007).

Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., & Murinda, S. E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne pathogens and disease*, 6(7), 793-806.

Öner, Z., Karahan, A. G., & Aloğlu, H. (2006). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. *LWT- Food Science and Technology*, 39(5), 449-454.

Peña Y.P, Hernández M.E, Castillo V.L, López N.A, Díaz M.M, Rodríguez P.S. Serovariedades y patrones de susceptibilidad de los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aislados de alimentos en Cuba. *Revista Panamericana de la Salud Publica* 30: 561-565 (2011).

PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Sistema Producto Leche - Alimento - Lácteo - Leche Cruda De Vaca - Especificaciones Fisicoquímicas, Sanitarias y Métodos de Prueba.

Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E., & Izquierdo-Reyes, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de

bacterias ácido-lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y ciencia*, 25(2), 159-171.

Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M., & Vaughan, E. E. (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(4), 1882-1892.

Rodríguez, C., Caldas, L., & Ogeerally, P. (2009). Calidad sanitaria en queso artesanal tipo telita. Upata, estado Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 98-102.

Rosetti Lía. (2016). Bacterias Lácteas: Identificación de Bacterias Acido Lacticas (BAL) por Biología Molecular. Disponible en: www.ue-inti.gob.ar.

Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., ... & Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11(8), 621-647.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K., & Komagata, K. (1997). Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 299-306.

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

04/05/2019 (Accessed on May 20/6/2018). . Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México.

Suarez Murcia, J. C. (2008). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá).

Vasek, O. M., Cardozo, M. C., & Fusco, A. J. V. (2008). PRODUCCIÓN ARTESANAL DE QUESOS. SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN AGROALIMENTARIO EN LA REGIÓN CORRENTINA (ARGENTINA). In *VI Congreso Internacional de la Red SIAL*.

Souza, C. F. V. D., Dalla Rosa, T., & Ayub, M. A. Z. (2003). Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(3), 260-266.