

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DEL QUESO DE CABRA ARTESANAL
DEL SURESTE DE COAHUILA PARA SU USO COMO CULTIVOS
INICIADORES EN QUESOS PASTEURIZADOS**

POR:

BLANCA LILIANA NARVÁEZ GUILLÉN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO, DICIEMBRE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS DEL QUESO DE CABRA ARTESANAL DEL SURESTE DE COAHUILA
PARA SU USO COMO CULTIVOS INICIADORES EN QUESOS PASTEURIZADOS**

POR:

BLANCA LILIANA NARVÁEZ GUILLÉN

TESIS

Que somete ante el H. jurado examinador como requisito parcial para obtener el título
de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA:

M.P. Francisco Hernández Centeno
Presidente de Jurado

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Sinodal

M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui
Sinodal

Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2015

~ || ~

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS DEL QUESO DE CABRA ARTESANAL DEL SURESTE DE COAHUILA
PARA SU USO COMO CULTIVOS INICIADORES EN QUESOS PASTEURIZADOS**

POR:

BLANCA LILIANA NARVÁEZ GUILLÉN

TESIS

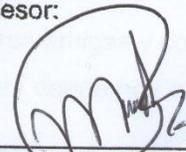
Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Dirigido por el siguiente comité asesor:



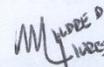
M.C. Sarahí Del Carmen Rangel Ortega
ASESOR PRINCIPAL



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
CO-ASESOR



M.P. Francisco Hernández Centeno
CO-ASESOR



M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui
CO-ASESOR

Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, por darme tantas bendiciones, paciencia y fortaleza, para dar fin a esta etapa de mi vida que apenas comienza, por poner en mi camino a todas aquellas personas que me apoyaron y me orientaron en mi formación, por nunca dejarme sola y a pesar de los momentos difíciles siempre estar conmigo.

A mi Alma Terra Mater, por acogerme y ser mi casa de estudios durante estos cuatro años y medio. Por regalarme las herramientas necesarias y conocimientos que me servirán para salir adelante.

A mi madre hermosa, Yrma Guillen Monjaras, por su confianza siempre fiel que puso en mí, una mujer admirable que sabe salir adelante, a mi padre **José Alfredo Narváez Gómez** por su apoyo, confianza y amor.

A mis hermanas, Patricia y Ana Rosy, por ser las mejores amigas y compañeras en mi vida, por sus consejos que gracias a ellos he llegado hasta donde hoy me encuentro.

A mi novio, a la persona que me ha robado el corazón **Miguel Ángel López Bravo**, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, por ser el mejor amigo y novio, por nunca dejarme sola y ayudarme en los momentos difíciles. Te amo.

A mi prima, Karina, por ser como una hermana, brindarme cariño y traer a este mundo un angelito que ha sido como una luz en nuestras vidas, te quiero.

A mis abuelitos, Amalia y Filiberto, por sentirse orgullosos de mí, por sus consejos y su cariño.

A la familia Guillén, los quiero y admiro, son la mejor familia que Dios me ha regalado.

A mis amigas, Yesi y Cesia, gracias por tenerme siempre presente en su vida a pesar de la distancia, por seguir siendo las mimas personas tan lindas que un día Dios puso en mi camino.

A una gran amiga, una de las mejores personas que he conocido, que me brindó su amistad, cariño y apoyo en momentos difíciles **Almita**.

A mi familia en Saltillo, Almita, Dani, Sol, Gaby, Cristian, Llesmin, Luz, Valente (†) Ale (yahan), por ser excelentes compañeros y amigos que me han brindado su cariño, siempre los recordaré.

A mi asesora, la M. C. Sarahí del Carmen Rangel Ortega por su apoyo incondicional y paciencia para poder llevar cabo este proyecto de tesis.

A mis profesores, al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, Dra. María de Lourdes Morales Caballero, Dr. Heliodoro de la Garza Toledo. M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui, Dr. Armando Robledo Olivo y a todos los docentes que me impartieron clases, siempre los recordare y estaré muy agradecida por brindarme parte de su conocimiento.

A Maricela, por apoyarme siempre con lo necesario para poder llevar a cabo este trabajo.

Más vale adquirir sabiduría que oro;
Más vale adquirir inteligencia que plata.
Proverbios 16:16

DEDICATORIAS

Con eterno amor para mi madre **Yrma Guillen Monjarás**, quien me dio la vida y me ha visto crecer, le doy gracias por ser mi luz, mi guía en este camino, por brindarme siempre su apoyo, por darme fuerzas, por la confianza que siempre puso en mí, por su comprensión y motivación para salir adelante y poder culminar esta etapa más en mi vida. Te amo mamita!!!.

A mis hermanas **Patricia, Ana Rosy y Kary** que han llenado de luz y alegría mi vida, por la motivación que cada una me ha brindado las amo.

Al amor de mi vida **Miguel Ángel López Bravo**, por su paciencia, su cariño, apoyo, por estar en los momentos malos y buenos, por sus consejos que siempre me ayudaron para salir adelante, agracias por todo eso ¡Te amo!

A la **M.C. Sarahí del Carmen Rangel Ortega** por estar siempre apoyándome en este trabajo, una de las mejores maestras que he tenido. Un ejemplo a seguir, siempre tendrá mi respeto y admiración, la recordaré siempre.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	13
I.- INTRODUCCIÓN	14
II.- JUSTIFICACIÓN.....	16
III.- HIPÓTESIS	17
IV.- OBJETIVOS	17
4.1. General	17
4.2. Específicos.....	17
V.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
5.1. Quesos.....	18
5.1.1 Historia.....	18
5.1.2. Quesos artesanales	19
5.1.2. Quesos industriales	22
5.2. Características organolépticas de la leche.....	24
5.3. Microbiología de la leche	25
5.3.1. Hogos y levaduras	25
5.3.2. Bacterias mesófilas.....	26
5.3.3. Bacterias Ácido Lácticas.....	26
5.4. Pasteurización en la leche para quesos.....	32
5.5. Cultivos iniciadores	34
5.5.1. Historia.....	34
5.5.3. Grupos de cultivos lácticos	39
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1. Aislamiento, identificación y conservación de las BAL.....	41

6.1.1. Aislamiento de las BAL	41
6.1.3. Conservación de las BAL.....	43
6.2. Caracterización de las BAL.....	44
6.2.1. Actividad acidificante	44
6.2.2. Capacidad de Inhibición de bacterias patógenas	45
6.2.3. Producción de CO ₂ (identificación bioquímica de las BAL de acuerdo al tipo de fermentación producida)	45
6.2.4. Producción de aroma en leches fermentadas inoculadas con BAL	46
6.3. Preparación de BAL para elaboración de queso pasteurizado de cabra	47
6.3.1. Curva de calibración	47
6.3.2. Curva de crecimiento	48
6.5. Evaluación sensorial del queso de cabra.....	49
6.6. Análisis estadísticos.....	51
VII. - RESULTADOS Y DISCUSIONES	52
7.1. Aislamiento e identificación de las de las BAL	52
7.2. Caracterización de las BAL.....	54
7.2.1. Actividad acidificante	54
7.2.2. Capacidad de Inhibición de bacterias patógenas	58
7.2.3. Producción de CO ₂ (identificación de las BAL de acuerdo al tipo de fermentación producida)	61
7.2.4. Producción de aromas lácticos en leches fermentadas por BAL	61
7.3 Preparación de BAL para elaboración de queso pasteurizado de cabra	63
7.3.1. Curva de calibración	63
7.3.2. Curva de crecimiento	64
7.4. Elaboración de queso pasteurizado de cabra utilizando las BAL seleccionadas .	66
7.5. Evaluación sensorial del queso de cabra.....	66

VIII.- CONCLUSIONES	71
IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	72
X.- ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración de queso de cabra (Monroy, 2011).	24
Figura 2. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Emdben-Meyerhoff-Parna) (Parra, 2010).	30
Figura 3. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (vía de las pentosas) (Parra, 2010).	31
Figura 4. a) Muestras de leche, cuajo y queso para extracción de las cepas, b) dilución de cada una las muestras	41
Figura 5. a) Siembra en agar MRS de las muestras diluidas, b) muestras incubadas en anaerobiosis, c) selección de las cinco colonias de cada muestra.....	42
Figura 6. Siembra de las BAL por el método de estría cruzada.	42
Figura 7. Prueba de la catalasa a) catalasa negativa, b) catalasa positiva	43
Figura 8. Reactivación de las cepas.	44
Figura 9. Incubación de la leche inoculada y titulación de cada una de las muestras a diferentes periodos de tiempo.	45
Figura 10. Técnica de difusión en hoyo para inhibición de bacterias.	46
Figura 11. Tubo estéril con campanas Durham invertidas.	46
Figura 12. Medición de la densidad óptica y siembra en agar MRS de las BAL.....	48
Figura 13. Muestras de quesos y hoja de evaluación presentada a los evaluadores...50	
Figura 14. a) Tinción Gram de las cepas seleccionadas, b) prueba negativa de la catalasa.....	52
Figura 15. Colonias de BAL seleccionadas.	53
Figura 16. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 0 h de incubación....	54
Figura 17. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 6 h de incubación....	54
Figura 18. Acidificante de las BAL seleccionadas a las 12 h de incubación.....	55
Figura 19. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 24 h de incubación...56	
Figura 20. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 48 horas de incubación.	56
Figura 21. Texturas presentadas por las BAL durante el periodo de evolución de la actividad acidificante.	58
Figura 22. Halos de inhibición de las BAL seleccionadas.	58

Figura 23. Capacidad inhibitoria de las BAL seleccionadas frente a Escherichia coli. .59	59
Figura 24. Capacidad inhibitoria de las BAL seleccionadas frente a Salmonella.59	59
Figura 25. Capacidad inhibitoria de las BAL seleccionadas frente a Stafilococcus aureus.60	60
Figura 26. Concentraciones obtenidas en cada periodo de tiempo evaluado y Curva de calibración para QR2.....64	64
Figura 27. Concentraciones obtenidas en cada periodo de tiempo evaluado y curva de calibración para QJ2.64	64
Figura 28. Crecimiento correspondiente a la cepa QR2.....65	65
Figura 29. Crecimiento correspondiente a la cepa QJ2.....66	66
Figura 30. Elaboración de queso pasteurizado de cabra.67	67
Figura 31. Evaluadores del queso pasteurizado de cabra.....68	68
Figura 32. Hoja de evaluación del queso artesanal de cabra pasteurizado.69	69
Figura 33. Resultados de la evaluación sensorial de quesos pasteurizados.....70	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Algunos quesos mexicanos genuinos, clasificados según el tipo de región geográfica de producción.	21
Cuadro 2. Clasificación de quesos de acuerdo al tipo de proceso.	22
Cuadro 3. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas (Adaptada de Stililes y Holzpfel, 1997).	29
Cuadro 4. Patógenos que pueden hallarse en la leche cruda	33
Cuadro 5. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos. .	35
Cuadro 6. Utilización de las principales bacterias ácido lácticas.	36
Cuadro 7. Actividad antimicrobiana de diversas cepas de BAL frente a bacterias patógenas y no patógenas	38
Cuadro 8. Escala categórica numérica empleada en la evaluación del queso pasteurizado.	50
Cuadro 9. Caracterización e identificación morfológica de las BAL de cada una de las queserías.	53
Cuadro 10. Resultados de la evaluación sensorial de producción de aromas lácticos en leches fermentadas por BAL.	62
Cuadro 11. Hoja maestra utilizada en la evaluación sensorial del queso elaborado.	69
Cuadro 12. Promedios y desviaciones estándar del ejido El Recreo	79
Cuadro 13. Promedios y desviaciones estándar del ejido Jagüey de Ferniza.	79
Cuadro 14. Promedio y desviaciones estándar del ejido Chapultepec.	80
Cuadro 15. Promedios y desviaciones estándar de Salmonella.	80
Cuadro 16. Promedios y desviaciones estándar de E.coli.	81
Cuadro 17. Promedios y desviaciones estándar de Stafilococcus aureus.	81

RESUMEN

Los quesos artesanales son alimentos conocidos en todo el mundo debido a las características tan particulares que presentan, como lo es el sabor principalmente, además de ser elaborados a mano. Son reconocidos por no incluir aditivos en los ingredientes, son elaborados de leche natural y no se someten a ningún tratamiento térmico para disminuir la carga microbiana.

En la leche cruda se encuentra diversa flora microbiana tanto patógena como benéfica, dentro de esta se hace alusión a las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son las responsables del sabor olor y textura típica de los quesos artesanales. Diversos géneros de BAL en la actualidad son utilizados como cultivos iniciadores, esto con el fin de mejorar las características organolépticas de los alimentos, los cultivos indicadores pueden ser empleados tanto en el procesamiento de carne, diversos productos lácteos bebidas alcohólicas y vegetales para la obtención de salchichas, jamones, vinos, cervezas aceitunas, encurtidos, quesos, yogurt entre otros.

El estado de Coahuila se caracteriza por la producción de queso artesanal con leche de caprinos, con base en ello, este estudio se enfocó en la identificación de BAL del queso de cabra artesanal para uso como cultivo iniciador. Durante la investigación, se llevó a cabo el aislamiento y la identificación de las BAL, caracterizándolas bajo pruebas bioquímicas tales como actividad acidificante, capacidad de inhibición, producción de CO₂ y producción de aromas, seleccionándose aquellas que presentaron las mejores características de las pruebas mencionadas anteriormente. Las BAL elegidas fueron preparadas para ser inoculadas en leche pasteurizada y posteriormente en la elaboración del queso de cabra, y se evaluó mediante una prueba sensorial empleando la prueba diferencia de control. Los quesos elaborados a partir de la leche pasteurizada e inoculados con las BAL seleccionadas presentaron características semejantes al queso artesanal de cabra, por lo tanto, son útiles para ser empleadas como cultivos iniciadores.

Palabras clave: queso artesanal, bacterias ácido lácticas, queso de cabra, cultivos iniciadores.

I.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran variabilidad de alimentos disponibles en el mercado, la mayoría de estos productos son elaborados a través de grandes industrias, las cuales cuentan con tecnología avanzada, manufacturados bajo las condiciones higiénicas que marcan las normas para la obtención de productos inocuos, además de ser productos altamente estandarizados durante todo el proceso, en ellos se encuentra la industria cárnica, la panificación, además de la industria láctea. Dentro de la industria láctea se pueden encontrar una diversidad de productos tales como crema, yogurt y una gran variedad de quesos.

El queso es un alimento elaborado a partir de leche bronca o pasteurizada, descubierto por nuestros antepasados y en la actualidad muy apreciada por el ser humano. Obtenido a través de la coagulación de la leche y su posterior desuerado, en el mercado se encuentra una diversidad de quesos, los cuales se encuentran clasificados por el contenido de materia grasa, tipo de proceso de elaboración, periodo de maduración, etc. En el mercado podemos encontrar tanto los quesos elaborados artesanales como quesos elaborados en grandes industrias.

Los quesos artesanales se consideran aquellos que son elaborados utilizando leche cruda o bronca, sin la necesidad de aplicar conservadores, saborizantes o mejoradores de textura, por lo tanto son considerados como quesos genuinos. A pesar de que este tipo de alimento es muy apreciado por la comunidad, los quesos artesanales son considerados como alimentos que pueden llegar a alterar la salud del consumidor, debido a la flora microbiana existente en la leche, la cual puede persistir al no recibir ningún tratamiento térmico para disminuir su carga.

Los quesos elaborados en las grandes industrias se encuentran bajo los estándares de calidad exigidos por las normas, los cuales han comenzado a desplazar a los quesos artesanales. En esta industria se encuentran los quesos análogos, llamados así porque son elaborados a través de la reconstitución de leche en polvo y la suma de proteínas lácteas, grasa vegetal, sales fundentes, emulsificantes y otros. Además son inocuos para el ser humano debido a la reducción de microorganismos al aplicar tratamientos térmicos

como la pasteurización, en la cual no solamente se eliminan bacterias patógenas sino también bacterias benéficas, como las BAL.

En la leche cruda utilizada para la elaboración de quesos artesanales se encuentra una diversidad de microorganismos, de los cuales algunos son los responsables de la textura y sabor en este alimento. Dentro de estos microorganismos son reconocidas las BAL como aquellas que proporcionan las características típicas en quesos artesanales.

Las BAL son microorganismos muy utilizados en la actualidad en diversos alimentos, sobre todo en las fermentaciones, debido a las propiedades que brindan al ser aplicadas en diversos alimentos. Fueron descubiertas en 1857 por Louis Pasteur y clasificadas en 1919 por Orlan Jensen, de acuerdo al tipo de metabolismo de azúcares, en homofermentativas y heterofermentativas; en las primeras se obtiene como metabolito final ácido láctico y en las segundas además del ácido láctico fracciones equimolares de etanol, aldehídos y CO₂. Hoy en día las BAL son utilizadas como cultivos iniciadores. Estos cultivos pueden estar formados por una o varias cepas activas.

Para que estos microorganismos se consideren como cultivos iniciadores deben presentar características como acidificación rápida del medio, es decir, una disminución de pH en las primeras horas, lo cual trae como consecuencia la inhibición de microorganismos patógenos debido al medio ácido generado por las BAL, brindar las características deseadas en el producto final, reproducción rápida y, sobre todo, no causar daños al consumidor.

Los cultivos iniciadores se agregan a la leche después de la pasteurización, ya que al aplicar temperatura muchas de las BAL son eliminadas. Son empleados en la elaboración de productos lácteos, algunos de ellos por la capacidad de acidificación rápida, como en quesos frescos, y otros por acidificación lenta, como en el caso de los quesos madurados.

II.- JUSTIFICACIÓN

Hoy en día el consumo de productos artesanales se encuentran de moda, ya que se dice que estos no traen consigo conservadores, saborizantes o colorantes los cuales ayuden a mejorar el producto. Sin embargo, en los productos artesanales, como lo son los quesos, se puede encontrar un déficit en cuanto a la calidad ya que en ellos existen muchos microorganismos patógenos que pueden dañar a la salud del consumidor. Ramos *et al* (2009) mencionan que los productos artesanales son preferidos por los consumidores debido a su sabor y aroma, gracias a las bacterias autóctonas.

La problemática presentada en el queso artesanal es en cuanto a la estandarización de la metodología y la inocuidad al momento de manipular este alimento por los productores, además de la obtención de la materia prima, ya que para su elaboración se emplea leche bronca o cruda. Con las investigaciones que se han realizado por muchos años atrás, se sabe que la leche empleada sin ningún tratamiento térmico, trae consigo una gran cantidad de microorganismos, y en ellos podemos encontrar tanto bacterias patógenas como benéficas, es decir, bacterias que no dañan a la salud y además pueden ser empleadas en la industria alimentaria, llamadas bacterias ácido lácticas (BAL).

Los cultivos iniciadores son bacterias o el conjunto de BAL, provenientes de diversos alimentos y principalmente de la leche, que se reincorporan una vez que el producto ha sido tratado térmicamente, estas actuarán nuevamente y devolverán las propiedades o características deseadas al alimento. Al llevar a cabo la manufactura de estos productos a partir de la leche pasteurizada muchos de los microorganismos que afectan a la calidad del queso desaparecen, pero también los microorganismos que le proporcionan las características esenciales de estos productos. La tecnología ha tenido grandes avances en cuanto a la microbiología ya que, gracias a diversos métodos, se ha logrado aislar aquellos microorganismos que le proporcionan propiedades organolépticas específicas a los alimentos.

III.- HIPÓTESIS

El uso de BAL aisladas del queso artesanal de cabra permitirá elaborar un queso pasteurizado de cabra con similares características al artesanal.

IV.- OBJETIVOS

4.1. General

Aislar, identificar y caracterizar las BAL del queso artesanal de cabra del sureste de Coahuila, para uso en la elaboración de queso pasteurizado de cabra como cultivo iniciador.

4.2. Específicos

- Aislar e identificar las BAL de queso artesanal, cuajo natural y leche de cabra.
- Caracterizar y preparar las BAL para elaboración de queso pasteurizado de cabra (formular cultivos iniciadores)
- Elaborar queso de leche pasteurizada de cabra utilizando el cultivo iniciador formulado.
- Evaluación sensorial del queso de cabra elaborado.

V.- REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Quesos

5.1.1 Historia

El queso es un alimento que ha perdurado a lo largo de los siglos, pero los orígenes del mismo están en discusión; hoy en día no se pueden datar con exactitud, aunque se estima que se encuentra entre el año 8000 a.C y el 3000 a.C (Latorre, 2011). El queso se ha venido elaborando desde la época de la colonia, esto se inició cuando los conquistadores españoles trajeron a la Nueva España los primeros hatos de cabras y ovejas y, con el tiempo, junto con el ganado criollo se comenzaron a desarrollar zonas ganaderas, como en lo Altos de Jalisco (Villegas, 2004).

Estados Unidos es considerado como el principal productor de quesos a nivel mundial, Alemania como el principal exportador en cuanto a cantidad y Francia el mayor exportador en cuanto a valor monetario; sin embargo, Alemania, Reino Unido e Italia son considerados como los países que realizan más importaciones (Martínez, 2015). México se ubica en el noveno lugar mundial en cuanto a la producción de quesos, con alrededor de 268 mil toneladas. Las principales zonas productoras de queso en México se encuentran en Coahuila, Durango, Chihuahua, Oaxaca, Querétaro, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, San Luis Potosí, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Toluca y Chiapas. (Cayetano y Salem, 2012).

En México se conocen al menos 30 tipos diferentes de quesos, algunos de ellos son elaborados a partir de leche bronca y manufacturados principalmente por pequeñas o medianas industrias utilizando métodos artesanales, y con ello la falta de control de calidad, de manera que los productos finales presentan una heterogeneidad composicional, sensorial y tiempo corto de conservación (Heredia, 2011).

La elaboración de quesos se encuentra fuertemente relacionada con la producción primaria, pues existen cuatro sistemas lecheros: intensivo, semiintensivo, de traspatio (ganadería familiar) y de doble propósito (carne y leche). Los cuatro sistemas se dedican a la transformación de la leche en queso, pero difieren en cuanto a cantidad y tratamiento de esta. El sistema de doble propósito se dedica a la elaboración de quesos regionales y

el sistema intensivo al abastecimiento de plantas que producen leche fluida industrializada y a la transformación de quesos (Cervantes *et al*, 2008 citado por Perdomo, 2010).

En México, la agroindustria de quesos genuinos está constituida principalmente por innumerables micro y pequeñas empresas. En la mayoría de ellas los procesos son llevados a cabo de manera artesanal y se caracterizan por emplear en su elaboración leche cruda (bronca) sin pasteurizar (Perdomo, 2010).

5.1.2. Quesos artesanales

Los quesos artesanales surgen de la necesidad de aprovechar la leche y ofrecer un producto que fuera aceptado por la población consumidora (Perdomo, 2010). Cuando se habla de alimentos artesanales, se hace referencia a todos aquellos alimentos que son elaborados a mano, sin tomar en cuenta para su elaboración parámetros específicos. Para que estos alimentos tengan las características que los identifican, integran a la sociedad productora, ya que en ellas se encuentra esta cultura alimentaria y sobretodo la tradición (Monroy, 2015).

Las queserías artesanales se reconocen no solamente por la elaboración de estos productos que proporcionan bondades nutricionales y gustativas, sino por la amplitud de generar y mantener empleos rurales, los cuales se encuentran dentro de esta cadena agroindustrial de leche en los que están incluidos ganaderos, queseros y comerciantes (Villegas y Cervantes, 2011). La mayoría de quesos artesanales son elaborados a partir de leche cruda de vaca o de cabra, por lo tanto en ocasiones traen consigo problemas a la salud.

Para promover los quesos artesanales es necesario tener prácticas de manufactura estandarizadas y conocer las características finales del producto, los cuales se logran después de una integrada caracterización de perfiles químicos, microbiológicos y sensoriales (Alvarado *et al.*, 2007; Cervantes y Villegas, 2013). La calidad sensorial típica de los quesos tradicionales depende de varios factores, tales como las prácticas de fabricación tradicionales (leche bronca), la alimentación, la diversidad y dinámica de las comunidades microbianas. La composición microbiana y su actividad durante el

madurado juegan un papel muy importante, ya que estas son las causantes del desarrollo de las características sensoriales (Castillo, 2014).

Los quesos mexicanos artesanales son considerados como productos genuinos, algunos de ellos son elaborados desde la colonia y algunos son recientes, como muestra se pueden mencionar el asadero, el cotija, el de aro, sierra, adobera, crema tropical, el de cincho, el de guaje, de hoja, bola de Ocosingo, el de morral y el de rueda; el saber hacerlos les ha permitido adquirir sus propias particularidades, pero son desconocidas las características que les proporcionan su especificidad ¿Qué microflora es la que proporciona la tipicidad de cada queso? ¿Cuál es su perfil de sabor y olor? ¿Cuál es su textura? (Espinoza *et al*, 2010).

Los quesos genuinos se pueden diferenciar claramente de aquellos que son llamados imitación de queso (quesos rellenos y análogos de quesos) debido a que no se emplea necesariamente leche fluida para su elaboración, sino algunos ingredientes como leche en polvo, proteínas lácteas en polvo, grasa vegetal, sales fundentes, emulsificantes, estabilizantes y otros. Estos productos provenientes de la gran industria actualmente, dominan el mercado de los quesos en México (Cervantes y Villegas, 2013).

En un estudio de Cervantes y Villegas (2013) se dio a conocer una clasificación de quesos genuinos (cuadro 1) de acuerdo con el medio físico y climático de las regiones de origen, obteniéndose quesos de las planicies templadas.

Cuadro 1. Algunos quesos mexicanos genuinos, clasificados según el tipo de región geográfica de producción.

Quesos de las planicies templadas	Quesos Tropicales	Quesos de Sierra	Quesos del Desierto
Quesillo de Reyes Edtla	Queso de poro de Tabasco	Queso cotija región de origen (Jalisco y Michoacán)	Queso Chihuahua
Queso adobera de los Altos de Jalisco	Queso crema de Chiapas	Queso de la sierra de Durango	Queso Asadero de Aguascalientes
Quesos de aro	Queso cotija de Chiapas	Queso adobera de la Sierra Amula	Queso añejo de Zacatecas
Queso panela	Queso bola de Ocosingo, Chiapas	Queso ahumado de la Joya	Queso cocido de Sonora
Queso Oaxaca	queso enreatado	Queso panela seco de la sierra de Huajimic, Nayarit	
Queso asadero	Queso de Tepeque, Michoacán	Queso de chiquihuite de la sierra Huajimic, Nayarit	
Quesos botaneros	Queso guaje	Queso criollo de hoja de luna, Hidalgo	
Queso tipo manchego mexicano	Queso jarocho		
Queso de aro de Edtla	Queso Zacazonapan		
Queso Chapingo	Queso de tetilla de Nayarit		

Fuente: Cervantes y Villegas (2013).

En las queserías artesanales la mayoría de las veces el producto es elaborado a base de leche cruda sin pasteurizar, empleando el proceso tradicional. Por lo general estos quesos son de circulación local o regional, tienen como mercado a los consumidores de estos mismos espacios geográficos y actualmente clientes que buscan productos de calidad respetando lo tradicional; por otro lado, las agroindustrias elaboran quesos en su mayoría de imitación (quesos tipo) destinados a consumidores con bajos ingresos (Villegas y Cervantes, 2011).

5.1.2. Quesos industriales

La NOM-121-SSA1-1994 define a los quesos como productos elaborados a partir de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento 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, los cuales por su proceso pueden ser: fresco, madurado o procesado. De acuerdo con lo establecido por la norma referida, los quesos se encuentran clasificados como se observa en el cuadro 2 de acuerdo a su procesamiento.

Cuadro 2. Clasificación de quesos de acuerdo al tipo de proceso.

Tipo de proceso	Tipos de quesos	Ejemplos
Frescos	Frescales	panela, canasto, sierra, ranchero, fresco, blanco enchilado, adobado
	de pasta cocida	Oaxaca, asadero, mozzarella, del morral, adobera
	acidificados	cottage, crema, , doble crema, petit suisse, neufchatel
Madurados	madurados prensados de pasta dura	añejo, parmesano, cotija, reggianito
	madurados prensados	Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergja, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsoe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.
	maduración con mohos	Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie
Procesados	fundidos	
	fundidos para untar	

Modificado de la NOM-121-SSA1-1994

La elaboración de queso se ha realizado desde hace siglos de manera artesanal en condiciones poco higiénicas. En la actualidad la elaboración de queso de forma artesanal en países desarrollados se lleva a cabo cumpliendo todas las reglas de higiene y mediante la uso de equipos que facilitan su fabricación. La mayor parte de la producción de quesos proviene de industrias en las cuales cuentan con tecnologías modernas, cada etapa se encuentra estandarizada y las garantías higiénicas son muy altas. (Madrid, 1994).

Madrid (1994) nos indica que para llevar a cabo la elaboración del queso, son necesarios ciertos ingredientes básicos además de la leche:

- Cultivos de levaduras o bacteria ácido lácticas.
- Cuajo, ácidos o enzimas coagulantes.
- Sal.
- Aditivos autorizados, según cada tipo de queso y según la legislación de cada país.

La elaboración de queso es una forma de conservación de las proteínas de la leche, así como de la materia grasa, al igual que el calcio y fósforo, y sus propiedades organolépticas y nutritivas son aceptadas por el hombre en casi todas las regiones del mundo. Existen muchos tipos de quesos, estos varían según la naturaleza de la leche y la tecnología aplicada. (Mahaut *et al.*, 2003). Monroy (2011) da a conocer la técnica para elaboración de queso de cabra a partir de un estudio de campo (figura 1).

La leche que es empleada para elaboración de quesos y otros productos lácteos debe provenir de animales que se encuentren sanos y bien alimentados, estar libre de materia extraña, presentar color característico del producto y estar exenta de olores y sabores extraños. Se considera como no apta para consumo cuando sus características físicas y químicas u organolépticas se encuentran modificadas y fuera de los límites previstos en la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994 y cuando los microorganismos patógenos rebasen los límites establecidos por dicha norma (Perdomo, 2010).



Figura 1. Proceso de elaboración de queso de cabra (Monroy, 2011).

5.2. Características organolépticas de la leche

En la leche existen muchos factores que son muy importantes, como las propiedades físicas y químicas, pero cabe resaltar que las características organolépticas en la leche también son muy importantes; se caracteriza por el color blanco, y cuando se observa de un color diferente nos indica que hay presencia de microorganismos o alguna alteración; el sabor en la leche es difícil de definir ya que no es ácida ni amarga, se caracteriza por ser un poco dulce gracias a la lactosa; el olor de la leche es también característico, es decir, no existe una definición de esta, ya que la leche es un producto muy alterable y con facilidad adquiere sabores u olores que se derivan de los alimentos consumidos por el animal (Rodríguez y Echeverría, 2009).

La leche cruda favorece el crecimiento de microorganismos, aunado a esto, la microflora influye sobre la calidad de la leche cruda. Estudios demuestran que los principales

factores, responsables de los casos de brotes de intoxicaciones por alimentos son básicamente derivados del manejo deficiente de ellos. (Monroy, 2014).

5.3. Microbiología de la leche

La variedad microbiológica en la leche cruda se considera esencial para la riqueza sensorial y la variedad de los quesos tradicionales. Algunos son los responsables de los defectos en los quesos o de los riesgos a la salud de los consumidores. Las BAL se encuentran como los microorganismos más importantes en la leche debido a sus propiedades benéficas, ya que son las encargadas de la transformación de la lactosa y de brindar la tipicidad y características sensoriales genuinas de cada queso (Castillo, 2014).

5.3.1. Hongos y levaduras

Los hongos presentan una estructura filamentosa con ramificaciones y las levaduras son microorganismos cuyo crecimiento es unicelular, suelen crecer a 25°C. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza formando parte de la flora normal de los alimentos y como agentes contaminantes en equipos sanitizados inadecuadamente. Estos microorganismos provocan el deterioro fisicoquímico del alimento al metabolizar carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos, lo cual puede originar mal olor, alteraciones del sabor y del color en la superficie de los productos contaminados. Pueden sintetizar metabolitos tóxicos termorresistentes, con capacidad de alterar sustratos desfavorables y propiciar el crecimiento de bacterias patógenas (Monroy, 2011).

Los hongos y levaduras se encuentran en la leche cruda, pero son incapaces de sobrevivir a la pasteurización, la presencia de estos microorganismos en la leche y otros productos lácteos es originada principalmente durante la elaboración. La contaminación por hongos y levaduras de diversos productos lácteos y quesos es debida a que éstos se encuentran en el medio ambiente como en las paredes, estantes de maduración, aire, equipos, agua, etc., los cuales provocan periódicamente problemas tanto económicos como sensoriales (Godic y Vengust, 2007).

Los hongos no se consideran de gran importancia en la leche líquida, ya que suelen desarrollarse en los productos lácteos, sobre todo en la superficie y en la partes que se

encuentran en contacto con el aire, algunos de estos géneros son *Penicilium* y *Geotricum candidum*. Las levaduras suelen encontrarse en la leche cruda, las cuales son generadoras de gas, puede llegar a producir algo o nada de alcohol, además de provocar sabores indeseables en los productos lácteos. Los hongos ascomicetos, se encuentran con mucha menos frecuencia que las bacterias en la leche (Villegas, 2004). Las levaduras son las causantes de leche espumosa, se encuentra en algunos quesos como el kéfir y en leches condensadas (Charles, 1986).

En los algunos casos la presencia de estos microorganismos resulta ser indispensable, ya que gracias a ellos es posible obtener las características deseadas en algunos quesos como es el caso del Camembert y Cabrales. (Villegas, 2004).

5.3.2. Bacterias mesófilas

Las bacterias mesófilas se caracterizan por su temperatura de crecimiento que oscila entre 20-30°C, con un óptimo a 30°C, y tiempo de incubación entre 18-24 horas. En este grupo se encuentran géneros tales como *Lactococcus lactis* sub *lactis*, *Lactococcus lasctis* sub *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* sub *cremmoris* (Gaitán, 2013; Parra, 2010). Se utilizan en particular para la fabricación de quesos frescos como: quarg, feta, cottage; quesos de pasta blanada: camembert, brie, pont, l'Évêque, coulommiers; quesos duros de pasta prensada: cheddar, gouda, edam; o de quesos de pasta azul: roquefort (Mora y García, 2007).

5.3.3. Bacterias Ácido Lácticas

La elaboración de productos fermentados se inició por los pueblos nómadas de las regiones de Turquía, Asia central y Bulgaria, ya que transportaban la leche fresca en estómagos de cabra (abomaso) en la cual se formaba una masa coagulada por la quimosina producida y las bacterias presentes en la leche, ya que facilitaba el transporte y la conservación de la misma, por lo tanto esta ventaja hizo que se conservara dicha tecnología a lo largo de las generaciones (Olivera, 2011).

Las BAL fueron descubiertas en 1857 por Louis Pasteur, profesor de química y decano de ciencias en la Universidad de Lille en Francia, al mismo tiempo que realizaba estudios tras la consulta de los vinicultores de la región del por qué se les descomponía y

acidificaba el vino. Después de algunas semanas se descubrió que la sustancia que alteraba los vinos era el ácido láctico, obtenido por la fermentación láctica desencadenada por ciertos microorganismos. El término de "*Bacterium acidi lactic*" se debe a Weigmamn, propuesto en 1889 para definir las como bacterias que forman la leche ácida a partir del azúcar de la leche (Mora y García, 2007).

Las BAL forman parte de la microbiota natural en muchos alimentos y no existe ninguna indicación de que presenten algún riesgo para la salud del consumidor; por lo tanto, las BAL, al igual que algunos de sus metabolitos se consideran como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) de EEUU (Mora y García, 2007).

Estas bacterias son grupos que se encuentran representados por varios géneros, ya que poseen algunas características en común como las morfológicas, fisiológicas y metabólicas. Las BAL son conocidas por presentar formas específicas, es decir, se representa como coco o bacilos. Estos microorganismos se conocen por tener diversas aplicaciones como la fermentación de productos lácteos, principalmente, carnes y vegetales, también son utilizadas en la producción de vinos y cervezas (Ramírez *et al.* 2011) propiciando propiedades sensoriales y nutricionales a los productos alimenticios (Parra, 2010).

Las BAL son definidas como microorganismos Gram positivos productores de ácido láctico, principal producto del metabolismo fermentativo de los carbohidratos. Se caracterizan por no ser esporulados, microaerófilos, anaerobios facultativos, además poseen la capacidad de sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH bajos (Gaitán, 2013; Ortiz, 2006). Una de las características importantes es la ausencia de la enzima catalasa, la cual degrada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para llevar a cabo esta función se necesita de un grupo porfirínico (citocromos) que las BAL son incapaces de sintetizar, por lo tanto este tipo de bacterias no posee esta enzima. Se caracterizan por ser catalasa negativa. Una particularidad debido a la ausencia de citocromos en las BAL, es que estas se presentan en colonias de color blanco lechoso (Mora y García, 2007).

Las BAL son muy exigentes en su nutrición, pues requieren una gran cantidad de factores nutritivos, se caracterizan por ser auxótrofas, es decir, requieren de una serie de componentes que no pueden ser sintetizados por ellos mismos como aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas tales como vitaminas B: ácido pantoténico, biotina y ácido fólico, por lo tanto dichos nutrientes deben encontrarse en el medio de crecimiento. La mayor parte de las BAL obtiene su energía a partir del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo se restringe a ambientes ricos en azúcares. (Olivera, 2011; Latorre, 2011).

Otras de sus propiedades es que ayudan a la formación de sabores ácidos, inhibición de algunos microorganismos patógenos, reducen el contenido de lactosa, ayudan a la formación de olores, algunas de ellas se identifican por la producción de gas, lo cual es muy importante para la formación de ojos en algunos quesos, la proteólisis para la maduración de quesos y sobre todo para ser aplicados como probióticos. (Parra, 2010).

De acuerdo a su taxonomía, las BAL pertenecen al phylum *Firmicutes*, se cuenta con alrededor de 20 géneros siendo 12 los más representativos: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterián* y *Weissella* (Suárez, 2008; Mora y García, 2007)). Los cuatro géneros más tradicionales son *Streptococcus* (actualmente subdividido en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, a los que se han sumado otros géneros como: *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* (Gaitán, 2013; Latorre 2011).

La energía celular de las BAL procede de la fermentación de los carbohidratos para producir ácido láctico, en 1919 Orlan Jensen realizó la primera clasificación de las BAL en dos grupos de acuerdo a su metabolismo: homofermentativas estrictas y heterofermentativas estrictas (Olivera, 2011), además de las heterofermentativas facultativas (cuadro 3). También se clasifican de acuerdo a su desarrollo a diferentes temperaturas, configuración de ácido láctico, habilidad para crecer en altas concentraciones de sal y tolerancia a la acidez y alcalinidad. (Mora y García, 2007).

Cuadro 3. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas (Adaptada de Stilles y Holzapfel, 1997).

Homofermentativas	Heterofermentativas	Heterofermentativas facultativas
<i>Lactobacillus:</i>	<i>Lactobacillus</i>	
<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lb. faciminis</i> <i>Lb. salivaricus</i> ssp. <i>salivaricus</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. gallinarum</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. trichodes</i> <i>Lb. fructivorans</i> <i>Lb. collinoides</i> <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. maleferementans</i>	<i>Lb. acetotolerans</i> <i>Lb. hamsteri</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. agillis</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>P. damnosus</i> <i>P. bovis</i> <i>P. thermophilus</i>	<i>Lc. amelibiosum</i> <i>Lc. argentinum</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Lc. mesenteriodes</i> <i>Lc. gelidum</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. inopinatus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>	
<i>S. bovis</i> <i>S. thermophilus</i>	<i>C. divergens</i> <i>C. mobile</i> <i>C. gallinarum</i> <i>C. piscicola</i>	
<i>Lactococcus</i>	<i>Weissella</i>	
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>hordmiae</i> <i>L. garviae</i> <i>L. plantarum</i>	<i>W. confusus</i> <i>W. paramesenteroides</i> <i>W. confusus</i> <i>W. halotolerans</i> <i>W. minor</i> <i>W. iridescens</i>	
<i>Vagococcus</i>		
<i>V. fluvialis</i> <i>V. salmoninarum</i>		

Fuente. Ramírez (2005).

En las primeras, compuestas por los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, y *Streptococcus*, se obtiene exclusivamente ácido láctico empleando la vía glucolítica o vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (figura 2); convierten 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico obteniéndose hasta un 85-95%. Estas bacterias poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa y carecen de la fosfoacetolasa (Martin *et al.*, 2008; Parra, 2010).

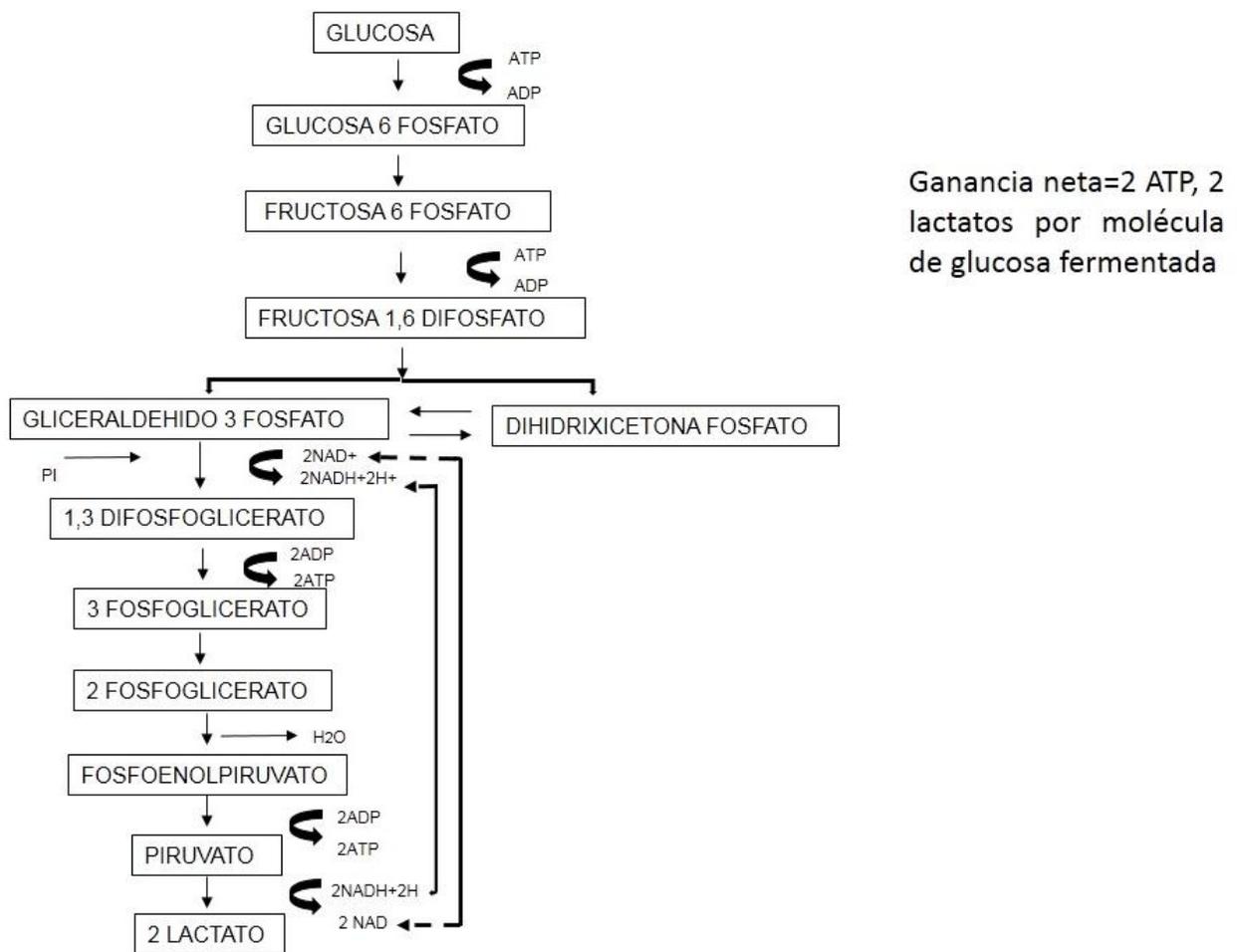
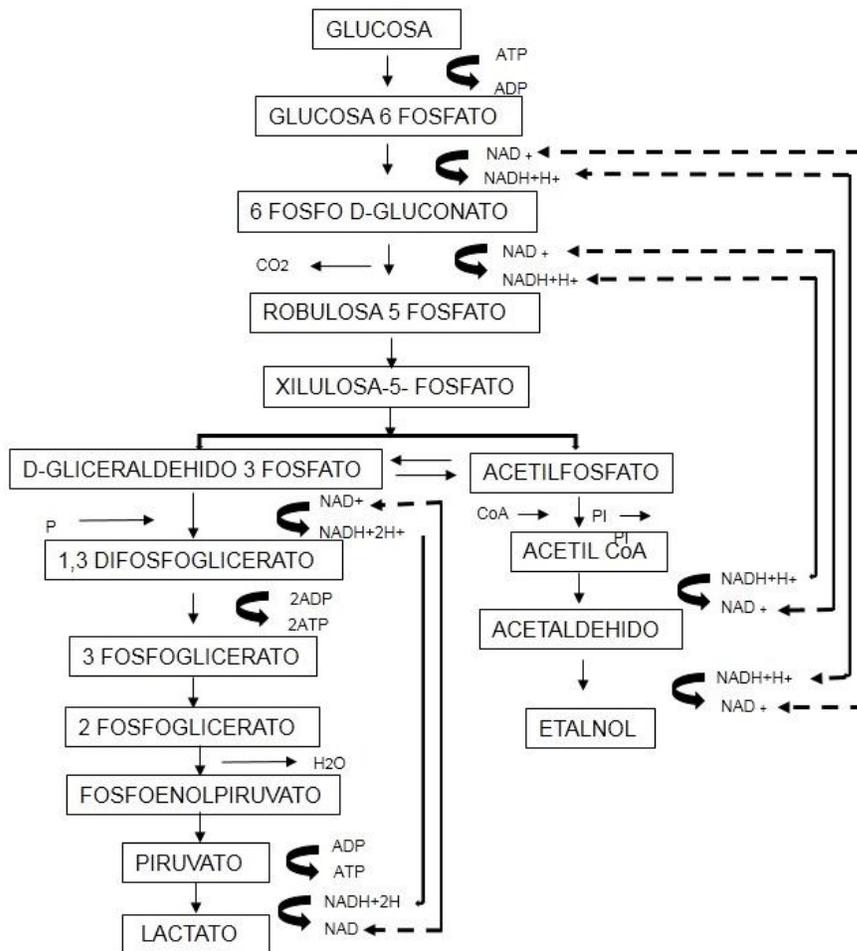


Figura 2. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Embden-Meyerhoff-Parnas) (Parra, 2010).

Las bacterias heterofermentativas emplean la vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK) o de las pentosas (figura 3) en la cual se produce solamente un 50% de ácido láctico, al fermentar 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico; además se

obtienen cantidades apreciables de etanol, aldehído y dióxido de carbono. En este grupo se encuentran los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Martin *et al.*, 2008; Parra, 2010).



Ganancia neta= 1 ATP
(1 lactato + 1 etanol+ 1 CO₂ por molécula de glucosa fermentada.

Figura 3. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (vía de las pentosas) (Parra, 2010).

La diferencia entre una vía y otra es debido a la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima principal en la glucólisis. Las heterofermentativas no poseen la enzima aldolasa, la cual rompe a la fructosa 1,6-difosfato. En su lugar, oxidan a la glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta xilulosa 5-fosfato, y se disocia en gliceraldehído 3-fosfato y acetil fosfato empleando la enzima fosfoacetolasa. El

gliceraldehído 3-fosfato es convertido en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP (adenosina trifosfato). Por otro lado, el acetil fosfato acepta electrones del NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida) generado en la formación de xilulosa 5-fosfato, obteniéndose directamente etanol sin producir ATP (Mora y García, 2007).

Las bacterias heterofermentativas facultativas tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo homofermentativo su metabolismo final. Utilizan la vía EMP para la obtención de ácido láctico. Si se modifican algunas condiciones de cultivo tales como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, se induce a la vía 6-PG/PK causando la fermentación heteroláctica (Ramírez, 2005; Mora y García, 2007).

En la leche cruda se encuentra una gran variedad de microorganismos, como se mencionó antes, y algunos resultan ser benéficos, como las BAL, y otros perjudiciales para la salud. La pasteurización es un tratamiento para la reducción de la flora microbiana en la leche asegurando una mejor calidad higienico-sanitaria. Sin embargo, algunas bacterias y enzimas beneficiosas para el desarrollo de las características en los quesos pueden ser destruidas (Faría *et al*, 2000).

5.4. Pasteurización en la leche para quesos

En la elaboración de queso a partir de leche sin pasteurizar y bajo procedimientos de manufactura tradicional, se encuentra una diversa y rica microflora; la calidad del queso depende básicamente de la composición de la microflora presente. La diversidad de las bacterias que participan en la elaboración de los quesos, es considerado como un factor fundamental para mantener las características típicas de los quesos tradicionales (Marino *et al*, 2003).

La pasteurización de la leche permite obtener mejores productos lácteos, con características higiénicas, debido a este proceso se destruyen la mayor parte de los microorganismos patógenos que podrían estar presentes en la leche bronca (Ramos *et al*, 2009). Los microorganismos patógenos se eliminan por tratamiento térmico de pasteurización lenta (LTLT) y pasteurización rápida (HTST), *Mycobacterium tuberculosis* se considera como el patógeno más termorresistentes en la leche, esta bacteria no

sobrevive a la pasteurización, en el cuadro número 4 se mencionan los principales patógenos que pueden hallarse en la leche cruda (Villegas, 2004).

Cuadro 4. Patógenos que pueden hallarse en la leche cruda

TMT(tiempo de muerte térmica a 60°C)	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20 min
<i>Brucella abortus</i>	10-15 min
<i>Shigella dysenteriae</i>	10 min
<i>Salmonella typhosa</i>	2 min
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1 min

Fuente: Villegas, 2004

Al aplicar este proceso térmico en la leche no solamente se eliminan bacterias indeseables, como las patógenas, también se disminuye la concentración de BAL y enzimas endógenas que se encuentran presentes en la leche cruda (Rangel, 2011), lo que resulta en uno de los efectos más significativos, ya que al elaborar quesos requeridos con las mismas características de aquellos que son producidos con leche cruda, es necesario la reposición de estos microorganismos benéficos que se han destruido por el calentamiento (Ortigosa *et al*, 2001).

Los consumidores aprecian los quesos artesanales por sus singulares características de sabor y aroma, que es generalmente atribuida a la actividad metabólica de la microbiota autóctona presente en la leche cruda. La utilización de cultivos lácticos comerciales ayuda a llevar a cabo el proceso de acidificación, pero generalmente son asociados con otras propiedades organolépticas, puesto que estos microorganismos son seleccionados de quesos de otras regiones. El uso de cultivos lácticos industriales, en sustitución de la microflora autóctona, podría efectuar la pérdida de cepas autóctonas a largo plazo (Ramos *et al*, 2009). La principal aplicación de las BAL como cultivos iniciadores en la industria láctea ha sido para obtención de yogurt y diversos quesos madurados (Cabeza, 2010).

5.5. Cultivos iniciadores

5.5.1. Historia

Los cultivos lácticos se originaron en el siglo XVIII en Asia, África y Europa, al observar la coagulación y la presencia de sabores diferentes en la leche al ser almacenada durante algunos días, seleccionándose aquellas que presentaban mejor sabor para inocular la leche al día siguiente (Parra, 2010; Olivera, 2011). En 1873 Lister aisló un cultivo iniciador puro y confirmó el papel de los microorganismos en la fabricación de los quesos, en 1890 comienza la aplicación tecnológica de los cultivos iniciadores (Castillo, 2014).

Los cultivos iniciadores están definidos como aquel cultivo que se encuentra formado por una o varias cepas activas con la capacidad de multiplicarse en cierto alimento, los cuales propician la acidificación rápida del medio en el que se encuentra y se añaden para acelerar y conducir la fermentación de un alimento, producen cambios específicos como aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los alimentos (Ramírez, 2005; Olivera, 2011).

Las bacterias que son seleccionadas para formar parte de un cultivo iniciador tienen la función de determinar las características de los productos finales, por lo tanto, la industria ha centrado sus esfuerzos en: (a) la selección de bacterias lácticas con las propiedades adecuadas; (b) conseguir estériles con las cepas adecuadas en las proporciones correctas; y (c) mantener la composición de los cultivos iniciadores (Walstra *et al*, 2001).

Tradicionalmente un cultivo iniciador o estéril se obtiene, mediante la incubación de las bacterias lácticas en la leche a una temperatura adecuada. El cultivo se mantiene por propagación y crecimiento en un medio nuevo de leche. En la actualidad la leche es sustituida por medios de cultivos especiales, esto con el fin de evitar la multiplicación de fagos durante la preparación de cultivos iniciadores (Walstra *et al*, 2001). Los cultivos iniciadores dan lugar a (Castillo, 2014):

- La acidificación de la leche y, por consiguiente, disminución de pH.
- Producción de enzimas proteolíticas, para llevar a cabo la descomposición de las proteínas durante la posterior maduración.

- Producción de enzimas lipolíticas, para efectuar la descomposición de la grasa para permitir la maduración del queso.
- Aparición de sustancias aromáticas típicas de los queso

Los cultivos de BAL son comúnmente empleados como iniciadores para la elaboración de productos lácteos fermentados (Agudelo *et al*, 2010) (Cuadro 4), además de su habilidad para acidificar, brindar textura, sabor y aromas (Parra, 2010). Las BAL que suelen emplearse como cultivos iniciadores en quesos pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Walstra *et al*, 2001). Este tipo de microorganismos también son empleados en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales para la obtención de productos como salchichas, jamones, curados, vinos, cervezas, licores fortificados, aceitunas, encurtidos, entre otros (Carrera, 2015) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.

Productos	Bacterias principales	Usos
Yogurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Provee sabor, gusto suave y delicado y promueve la cuajada, mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud
Bebidas fermentadas a base de leche	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>	Adiciona sabor, contribuye a promover la salud.
Quesos	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueve el cuajado, provee aroma y sabor
Mantequilla madurada	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma
Crema ácida	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Streptococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma. Contribuye a promover salud.

Fuente: Hernández, 2011.

Cuadro 6. Utilización de las principales bacterias ácido lácticas.

Género	Principales especies y aplicaciones
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> . Mantequilla, queso, Yogurt. <i>S. thermophilus</i> . Yogurt, queso.
<i>Pediococcus</i>	<i>P. Cervisiae</i> . Cerveza y carne procesada <i>P. halophilus</i> . Salsa de soya
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citrovorum</i> . Alimentos fermentados, producción de dextran
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> . Yogurt bebidas fermentadas a base de leche <i>L. helveticus</i> . Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada <i>L. acidophilus</i> . Yogurt, bebidas a base de leche fermentadas, preparación de Lactobacillus. <i>L. casei</i> . Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada, preparación de lactobacillus. <i>L. plantarum</i> . Diversos alimentos fermentados, ensilajes. <i>L. fermenti</i> y <i>L. brevis</i> . Productos fermentados
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifitum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> . Leche fermentada, preparación de leche fermentada.

Fuente: Hernández, 2011.

Generalmente la selección de las cepas lácticas autóctonas ha ayudado a obtener productos lácteos que presentan características similares a los productos elaborados con leche cruda. El interés de estudiar los cultivos lácticos autóctonos es debido al empleo en la producción industrial de quesos tradicionales, con el fin de conservar sus propiedades típicas y ser simultáneamente más seguros desde el punto de vista higiénico (Ramos *et al*, 2009).

5.5.2. Selección

Muchos autores afirman que la búsqueda de un cultivo iniciador es un proceso difícil que requiere no solamente de un estudio ecológico de los ecosistemas naturales de fermentación para conocer la microbiota presente, sino también del estudio para determinar las propiedades tecnológicas y fisiológicas de las cepas predominantes, para seleccionar aquellas que poseen las mejores características para ser empleadas a nivel industrial (Nieto, 2010).

Las características deseables de un cultivo iniciador para ser utilizados en la elaboración de quesos son las siguientes: capacidad acidificante, ausencia de patógenos, temperatura de crecimiento óptima, osmotolerancia, habilidad de producir cambios deseados, habilidad de dominar la microbiota competitiva, facilidad de propagación, facilidad de preservación, estabilidad de las propiedades deseables durante los subcultivos y el almacenamiento. Los productos obtenidos deben tener características organolépticas aceptables y propias, competitividad tecnológica y viabilidad económica (Nieto, 2010).

La primera y la principal función de los cultivos en la elaboración de productos lácteos es la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, lo cual conduce a la disminución del pH lo que facilita la coagulación de la leche, texturización de la cuajada y además inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos de manera eficaz (Mora y García, 2007).

5.5.2.1. Acidez y pH

Las condiciones óptimas de crecimiento indican que, a pesar de tolerar valores de pH ácidos, cuando el medio se va acidificando debido a su crecimiento el número de especies capaces de sobrevivir disminuye. La mayoría crece e incluso prefiere valores de pH comprendidos entre 4.0 y 4.5, algunos géneros son capaces de crecer a un pH de 3.9, como *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus brevis*, y otros se desarrollan en un pH de 9.2 y 9.6, como *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* y aquellas del género *Carnobacterium* (Nieto, 2010).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos que son producidos por las BAL provocan una reducción de pH del ambiente, propiciando un efecto inhibitorio de bacterias gram positivas y gram negativas. La forma no disociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana, donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones de hidrogeno hacia el anión correspondiente; de modo que ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Ramírez *et al.*, 2011). El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos radica en la disminución del pH (Gaitan, 2013).

5.5.2.2. Inhibición

Durante el periodo de crecimiento de las BAL se producen sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Esta es una característica para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de alimentos (Gaitán, 2013). Las BAL tienen la capacidad de inhibir ciertos patógenos (cuadro 6), tales como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp (Victoria *et al.*, 2006)

Cuadro 7. Actividad antimicrobiana de diversas cepas de BAL frente a bacterias patógenas y no patógenas

Cepas de BAL	Microorganismo antagonista
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>St. pneumoniae</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> .
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Micrococcus flavus</i> , <i>Salmonella paratyphi A</i> , <i>Ps.aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> .
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>S. aureus</i> .
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Cl. Sporogenes</i>

Fuente: Cabeza, 2006

La actividad antimicrobiana de las BAL se relaciona con la acumulación de los productos finales de los procesos de fermentación, como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno o a la producción de bacteriocinas (Martin *et al.*, 2008). En la leche de cabra, al igual que en la bovina, puede ser un vehículo importante de microorganismos patógenos, incluyendo aquellos debidos a contaminación primaria, como *Staphylococcus aureus* y *enterococos*. En cuanto a la contaminación secundaria, se destacan *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* (Araya *et al.*, 2008).

La acumulación de ácido láctico facilita la coagulación de la leche y la posterior formación de la cuajada, además de prevenir el crecimiento de microorganismos perjudiciales o patógenos. La actividad de los compuestos antimicrobianos que son producidos por las BAL es muy amplio, incluyendo a varias especies pertenecientes al mismo grupo, por ello es de suma importancia que exista una compatibilidad entre cepas, las cuales formen parte de un cultivo iniciador asegurando que el proceso fermentativo no falle por esta causa (Mora y García, 2007).

5.5.3. Grupos de cultivos lácticos

La elaboración de queso implica el desarrollo y control en la fermentación de la leche y la cuajada, la cual se lleva a cabo por microorganismos que han sido especialmente seleccionados, estos pueden ser clasificados en dos grupos: los que se encuentran involucrados en la manufactura y la maduración y aquellos involucrados en la maduración exclusivamente (Villegas, 2004).

Las bacterias que se encuentra involucradas en la manufactura y el afinado, una de sus principales funciones es la producción de ácido láctico, lo cual induce a una reducción de pH de la leche y la cuajada, esta microflora formada por BAL son llamados iniciadores o estárteres. Aquellos microorganismos que únicamente se encuentran involucrados en la maduración incluyen otras bacterias no iniciadoras, levaduras y mohos (Villegas, 2004).

Algunas de las ventajas de los cultivos no se refieren simplemente a la reducción del tiempo de fermentación, sino además disminuye la probabilidad de producir alteraciones y permitir la obtención de productos de mejor calidad organoléptica, más estables y homogéneos. La industria alimentaria que se relaciona con la producción a gran escala de productos fermentados utiliza casi exclusivamente cultivos iniciadores que contienen cepas definidas o el empleo de iniciadores con una mezcla de cepas desconocidas (Nieto, 2010).

El cultivo iniciador es una de los principales factores que permiten presentar la calidad y las propiedades deseadas del producto final, el incorporar el cultivo depende del tipo de queso que se desea elaborar. Si este es de pasta blanda se emplean cultivos de acidificación rápida que se encuentran compuestos por *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. En quesos de pasta dura y firme se emplean cultivos con capacidad proteolítica y lenta producción de ácido (Castillo, 2014).

Las preparaciones que son empleadas como cultivos iniciadores se clasifican de acuerdo a diversos aspectos tecnológicos como lo son: velocidad de acidificación, proteólisis, composición y temperatura de crecimiento (Mora y García, 2007).

Villegas (2004), clasifica al cultivo iniciador en base a dos criterios muy importantes:

1.- Según los productos naturales de su metabolismo:

- a) Cultivos acidificantes. Se encuentran compuestos por bacterias predominantemente acidificantes de una especie o más, como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, juntas; *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, solo o acompañado con *Lactobacillus delbrückii* ssp. *Bulgaricus* y/o *Lactobacillus helveticus*.
- b) Cultivos aromatizantes. Se encuentran especies heterofermentativas además de producir cierta cantidad de ácido láctico, producen sustancias aromáticas, en una mezcla de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*.

2.- Según la pureza del cultivo, en cuanto a tipo y número de especies o subespecies:

- a) De cepa simple: cuando se encuentra una sola especie, *Lactococcus lactis* o *Lactobacillus helveticus*.
- b) De cepa múltiple: bacterias del mismo género, pero de diferentes especies o subespecies. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.
- c) De cepa mixta: mezcla de diferentes géneros, v.g. *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus*.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Aislamiento, identificación y conservación de las BAL

6.1.1. Aislamiento de las BAL

Para llevar a cabo el aislamiento de las BAL se tomaron muestras de leche, cuajo y queso de las queserías en los ejidos el Recreo y Jagüey de Ferniza pertenecientes al municipio de Saltillo y del ejido de Chapultepec ubicado en Arteaga. Para la obtención de las bacterias, se tomaron 10 gr/mL de queso, leche y cuajo, los cuales fueron diluidos en 90 mL de agua peptonada. Las diluciones seriadas se realizaron en cada una de las muestras de leche, cuajo y queso hasta la dilución 10^{-4} en cada una de las muestras. Las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} fueron sembradas por duplicado por el método de superficie en placa en medio agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (figura 4).

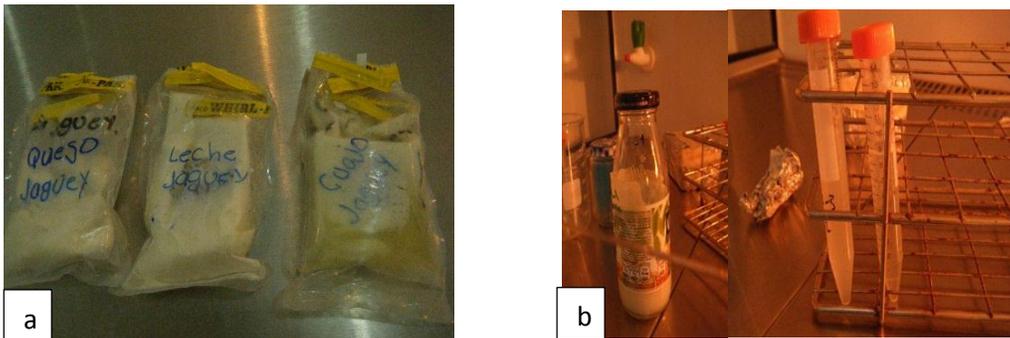


Figura 4. a) Muestras de leche, cuajo y queso para extracción de las cepas, b) dilución de cada una de las muestras

Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis de 24 a 48 h a 35°C . Después del periodo de incubación, al observar el crecimiento de microorganismos en la placa en cada una de las diluciones se seleccionaron cinco colonias con características diferentes de cada muestra, estas fueron identificadas con las iniciales de la muestra proveniente, ejido y número de colonia elegida (figura 5). Cada una de las colonias seleccionadas, fue sembrada en medio de agar MRS por el método de estría cruzada (figura 6) e incubada a una temperatura de 35°C por 24 h en anaerobiosis para su posterior identificación (Heredia, 2011; Tuncer, 2009).

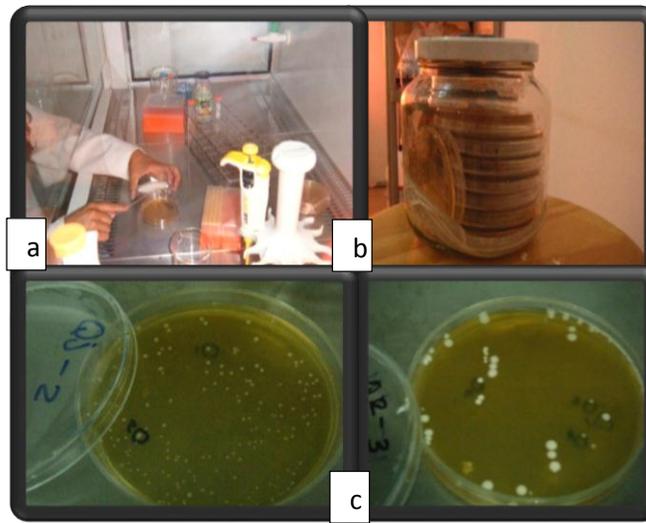


Figura 5. a) Siembra en agar MRS de las muestras diluidas, b) muestras incubadas en anaerobiosis, c) selección de las cinco colonias de cada muestra.

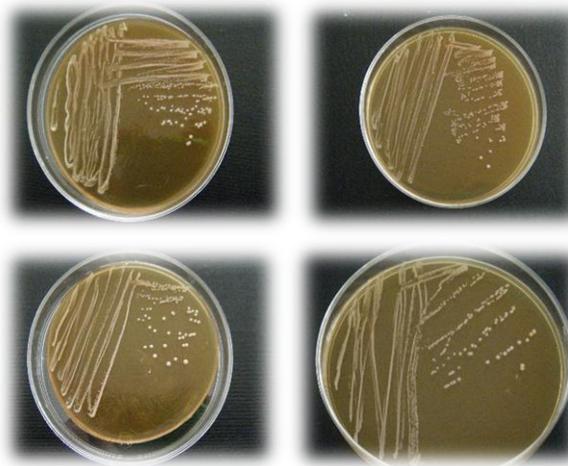


Figura 6. Siembra de las BAL por el método de estría cruzada.

6.1.2. Identificación de las BAL

6.1.2.1. Tinción Gram

La tinción de Gram se llevó a cabo según lo propuesto por Cristian Gram (1884). Para realizar el frotis se tomó una pequeña muestra de cada colonia con la ayuda de un asa bacteriológica, se diluyó en una gota de agua destilada en un portaobjetos y se fijó con calor. Se agregó una gota de cada uno de los colorantes empleados (cristal violeta, lugol,

alcohol-cetona para decolorar y safranina) durante un minuto, los colorantes fueron lavados después con agua destilada. Se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio a 100x. (Mora y García, 2007). Las bacterias seleccionadas, fueron aquellas que al observarse en el microscopio fueron Gram positivas (color azul).

6.1.2.2. Prueba de la catalasa

Para la prueba de la catalasa se utilizó peróxido al 30%, esto se realizó colocando una gota de peróxido sobre un portaobjetos, tomando una muestra de cada una de las colonias, se disolvió en la solución de peróxido y se identificaron aquellas que resultaron ser catalasa positiva por la formación de burbujas y catalasa negativa sin presencia de burbujas, característica propia de las BAL (figura 7) (González, 2011).

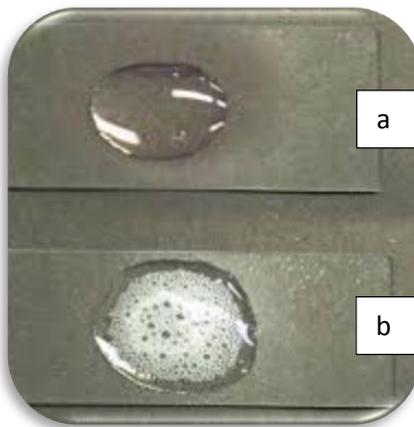


Figura 7. Prueba de la catalasa a) catalasa negativa, b) catalasa positiva

6.1.3. Conservación de las BAL

Cada una de las muestras seleccionadas, según la caracterización indicada anteriormente, fue conservada utilizando el método de congelación empleando una temperatura de -20°C para su posterior uso en las siguientes pruebas.

Para llevar cabo la conservación de las BAL, se inocularon 5 mL de caldo MRS con 50 μL de las BAL aisladas, estas fueron incubadas a 35°C de 18 a 24 h. Después del periodo de incubación, fueron transferidos 1.5 mL del caldo MRS en tubos eppendorf de 2 mL, los cuales fueron centrifugados a 5,000 rpm a 10°C por 5 min. Al término de la

centrifugación se rescató únicamente el paquete celular y el sobrenadante fue desechado. El paquete celular se re-suspendió en una mezcla de 500 μ L de caldo MRS estéril y 500 μ L de glicerol al 40% (v/v), mezclado con la ayuda de un vórtex y finalmente etiquetado para su conservación a -20°C. (Sánchez y Corrales, 2005).

6.2. Caracterización de las BAL

6.2.1. Actividad acidificante

Las cepas de BAL fueron reactivadas en tubos con 2 ml de caldo MRS estéril, agregando el 1% del inóculo (0.02 mL o 20 μ L) (figura 8), incubadas a 35°C durante 24 h en anaerobiosis.



Figura 8. Reactivación de las cepas.

Para la evaluación de la actividad acidificante se utilizaron las cepas reactivadas, leche descremada light de la marca Svelty y tubos de 50 mL. La leche fue preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (110 gr en 890 mL de agua). Una vez preparada la leche, se esterilizó a 121°C durante 15 min. Se agregó el 1% de inóculo (0.50 mL o 500 μ L), los tubos fueron incubados a una temperatura de 35°C durante 24 h (figura 9). La acidez se determinó en cuatro periodos de tiempo, a las 0, 6, 12, 24 y 48 h de incubación realizando tres repeticiones por cepa. El ácido láctico fue determinado por medio de titulación con NaOH al 1% y fenolftaleína como indicador. Los resultados fueron expresados en % de acidez (Guerrero *et al*, 1997).



Figura 9. Incubación de la leche inoculada y titulación de cada una de las muestras a diferentes periodos de tiempo.

6.2.2. Capacidad de Inhibición de bacterias patógenas

Las cepas se reactivaron en tubos con 2 mL de caldo MRS estéril, agregando el 1% del inóculo (0.02 mL o 20 μ L), incubadas a 35°C durante 24 h en anaerobiosis.

Las bacterias patógenas empleadas para llevar a cabo esta evaluación fueron *Salmonella* ssp., *S. aureus* y *E. coli*, la técnica empleada fue la de difusión en hoyo. Las bacterias patógenas fueron reactivadas en 3 mL caldo nutritivo estéril, este fue inoculado con el 1% del material celular (0.03 mL o 30 μ L), se incubaron a 35°C por 24 h. Posteriormente se realizó una mezcla empleando 200 μ L de las bacterias patógenas y 20 mL de agar nutritivo previamente esterilizado y se vertió en cajas petri estériles. Al encontrarse la mezcla solidificada, se realizaron hoyos de 10mm en el agar con ayuda de una micropipeta Pasteur estéril (figura 10).

Los hoyos fueron cubiertos con 180 μ L de material celular de las BAL realizando tres repeticiones para cada cepa. Se incubaron a 35°C por 24 h. El diámetro del halo de inhibición se midió y fue reportado en cm (Vinderola *et al*, 2007).

6.2.3. Producción de CO₂ (identificación bioquímica de las BAL de acuerdo al tipo de fermentación producida)

Para esta prueba se emplearon tubos pyrex con 5 mL de caldo MRS y campanas Durham invertidas (figura 11), los cuales fueron esterilizados a 121°C por 15 min, el medio fue inoculado con el material celular de las BAL al 1% (0.05 mL o 50 μ L), se realizaron tres

repeticiones por cada cepa. Se incubaron a 35°C por 48 h, el gas retenido indica que hay producción de CO₂ (Ramos *et al.*, 2009).

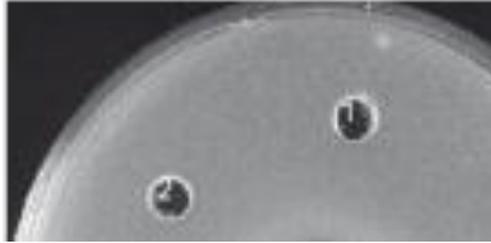


Figura 10. Técnica de difusión en hoyo para inhibición de bacterias.



Figura 11. Tubo estéril con campanas Durham invertidas.

6.2.4. Producción de aroma en leches fermentadas inoculadas con BAL

Las leches fermentadas, las cuales fueron elaboradas a partir de las cepas aisladas, fueron evaluadas mediante una evaluación sensorial, esto con el fin de seleccionar aquellas que son capaces de producir aromas típicos lácteos, ya que estas pudiesen figurar como las responsables de proporcionar el sabor del queso artesanal de cabra.

Para la fermentación de las leches, se utilizó leche light de la marca Svelty en tubos de 15mL, se esterilizaron a 121°C durante 15 min y fueron inoculados al 1% (0.05 mL de inóculo en 5mL de leche) con las cepas de BAL previamente aisladas, se incubaron a 35°C por 24 h. Para la evaluación sensorial de las leches fermentadas, se realizó una prueba de bombardeo utilizando tres jueces expertos, cada uno de los panelistas evaluó el aroma producido por las leches fermentadas, seleccionando así aquellas que

presentaron aromas típicos a lácteos como yogurt, mantequilla, queso, crema, etc. (Heredia, 2011).

6.3. Preparación de BAL para elaboración de queso pasteurizado de cabra

Para llevar a cabo la elaboración de queso artesanal de cabra, se determinaron parámetros importantes, los cuales fueron las curvas de calibración y la de crecimiento de las BAL. Estas técnicas se llevaron a cabo según lo descrito por Díaz (2011). Cabe mencionar que para la elaboración del queso solo se seleccionaron las cepas que, según los jueces expertos, se identificaron como productoras de olores lácticos característicos, así también cepas que presentaran alta acidez, por consiguiente una elevada producción de ácido láctico, obteniéndose como resultado buena capacidad de inhibición de bacterias patógenas.

6.3.1. Curva de calibración

La curva de calibración se obtuvo con el fin de conocer la concentración de UFC/gr o la cantidad de biomasa que se produce en cierta densidad óptica, para así poder llevar a cabo la curva de crecimiento, y observar el tiempo en el que los microorganismos se encuentran en la fase final de crecimiento y la entrada a la fase estacionaria.

Para la obtención de la curva de calibración de las BAL, se emplearon matraces Erlenmeyer de 200 mL, los cuales contenían 70 mL de caldo MRS y fueron inoculados al 1% de cultivo fresco de las BAL seleccionadas en caldo MRS, y los matraces fueron incubados a 35°C. La primera lectura fue tomada después de las 2 h de incubación, todas fueron leídas en un espectrofotómetro a 600 nm, tomando como blanco caldo MRS estéril; las siguientes lecturas fueron tomadas a las 4, 8 y 12 h de incubación.

La siembra en agar MRS es un método de medición de biomasa para determinar el número de células viables (Díaz, 2011), para ello se realizaron diluciones seriadas en cada tiempo de incubación con el fin de disminuir la población celular, posteriormente fueron plaqueadas las diluciones con el fin de contabilizar la cantidad de UFC que se generaron en ese punto de la etapa de crecimiento de las bacterias (figura 12). Se tomaron 1000 µL de las diluciones las cuales fueron extendidas en cajas Petri en medio sólido de agar MRS, incubadas a 35°C de forma invertida. Después del periodo de

crecimiento se realizó el conteo de colonias en aquellas placas en las cuales se observaron colonias contables.



Figura 12. Medición de la densidad óptica y siembra en agar MRS de las BAL.

Al obtener las cuatro lecturas en el espectrofotómetro en cada periodo de tiempo y las colonias que fueron contables, se analizaron cada uno de los datos obtenidos de las dos cepas, en la cuales se emplearon los datos de absorbancia (Y) y UFC/ mL (X).

6.3.2. Curva de crecimiento

Para obtener la curva de crecimiento de las BAL se emplearon matraces de 200 mL, se inocularon 50 mL de caldo MRS con 1% de material biológico de las BAL seleccionadas, fueron incubados a 35°C, para analizar la evolución de su crecimiento, se empleó un espectrofotómetro para medir su densidad óptica cada hora por 24 h, finalmente se graficaron cada una de las lecturas obtenidas para observar la curva de crecimiento que las BAL seleccionadas presentaron. Esto con el fin de cuantificar las BAL al comienzo de la fase estacionaria.

6.4. Elaboración de queso pasteurizado de cabra utilizando las BAL seleccionadas

Los parámetros para la elaboración del queso de cabra fueron: temperatura de pasteurización, porcentaje de inoculación y de NaCl, y se utilizaron según la metodología de Ramos *et al.*, (2009), mientras que el procedimiento se siguió de acuerdo a la metodología usada por Monroy (2014) para la elaboración del queso artesanal de cabra.

El queso de leche de cabra se elaboró utilizando las BAL seleccionadas, de acuerdo a cada una de las pruebas realizadas anteriormente en el laboratorio de microbiología del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN.

Para la elaboración del queso se empleó la siguiente secuencia metodológica: pasteurización de la leche, coagulación, desuerado, salado de la cuajada, moldeado, y maduración. La leche utilizada para la elaboración del queso fue obtenida directamente de los productores de queso artesanal de cabra de los ejidos visitados.

Las cepas seleccionadas para la elaboración del queso se identificaron como QR2 y QJ2. Se prepararon 4 quesos diferentes, el queso con la cepa QR2, el queso con la cepa QJ2, un queso combinando ambas cepas (las cepas se encontraban en la etapa inicial estacionaria) y un queso testigo. La leche fue pasteurizada a 72°C por un min (pasteurización rápida), al finalizar el tiempo, se enfrió rápidamente hasta llegar a 40°C. Posteriormente se llevó acabo la inoculación de la leche al 1% con las bacterias seleccionadas QR2 y QJ2 (9.0 log UFC/ ml 2.3 absorbancia y 9.0 log UFC/mL 1.9 absorbancia respectivamente). Para la elaboración del queso combinado o sinergista se empleó el 0.5% de inóculo de QJ2 y 0.5% de QR2 utilizando la misma proporción de UFC/mL y absorbancia descrita anteriormente, para la inoculación posterior de la leche

El cuajado de la leche se realizó agregando 1mL de cuajo por cada 10 L de leche, se dejó actuar por 10 min, se procedió al corte y desuerado, al obtener la cuajada se agregó NaCl empleando 30g de sal por cada 10 L de leche, la masa obtenida fue moldeada en aros metálicos, se dejó madurar en refrigeración de 4°C durante toda la noche en charolas de acero inoxidable previamente etiquetadas.

6.5. Evaluación sensorial del queso de cabra

La evaluación sensorial se llevó acabo de acuerdo a lo marcado por Hernández (2007). Para la prueba sensorial del queso de cabra inoculado con las BAL seleccionadas se realizó una prueba de diferencia de control, con el objetivo de identificar si existía diferencia alguna de las muestras contra el control empleando, para este caso fue el queso testigo, utilizando un total de 20 jueces semientrenandos.

La evaluación consistió en presentar a los evaluadores pares de muestras de los quesos previamente elaborados en cubos de aproximadamente 2cm^3 (figura 13), en cada par se tenía un control y una de las muestras de los diferentes quesos. En las muestras presentadas a los panelistas se incluyó el placebo (muestra compuesta del control contra el mismo control, con la finalidad de que el panelista encontrara alguna diferencia), para determinar si existía diferencia o no y el grado en el que se encuentra al momento de evaluar empleando una escala categórica numérica. Los panelistas evaluaron la magnitud de la diferencia entre cada muestra y el control, dicha diferencia fue expresada en la escala mostrada en el cuadro 7.



Figura 13. Muestras de quesos y hoja de evaluación presentada a los evaluadores.

Cuadro 8. Escala categórica numérica empleada en la evaluación del queso pasteurizado.

Escala categórica	
0	No diferencia
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	diferencia muy grande

Fuente: Hernández (2007).

6.6. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de actividad acidificante e inhibición de bacterias patógenas fueron analizados con el programa estadístico Minitab, utilizando comparación de Tukey. Los resultados arrojados durante la prueba sensorial del queso de cabra se analizaron mediante un análisis de varianza con un diseño de bloques completamente al azar ($P \leq 0.05$) empleando el software SAS.

VII. - RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Aislamiento e identificación de las de las BAL

Para la identificación correcta de las BAL, de las cepas aisladas de las muestras provenientes de cada una de las queserías se seleccionaron colonias que presentaron una forma redonda y color blanco o cremoso, al realizar la prueba de tinción de Gram se descartaron aquellas que fueron negativas (presentaron color rojo), catalasa positiva y ausencia de citocromos en los microorganismos aislados. Se trabajó solamente con las que resultaron ser catalasa negativa y tinción de Gram positiva como se muestra en la figura 14 (Ramírez, 2005).

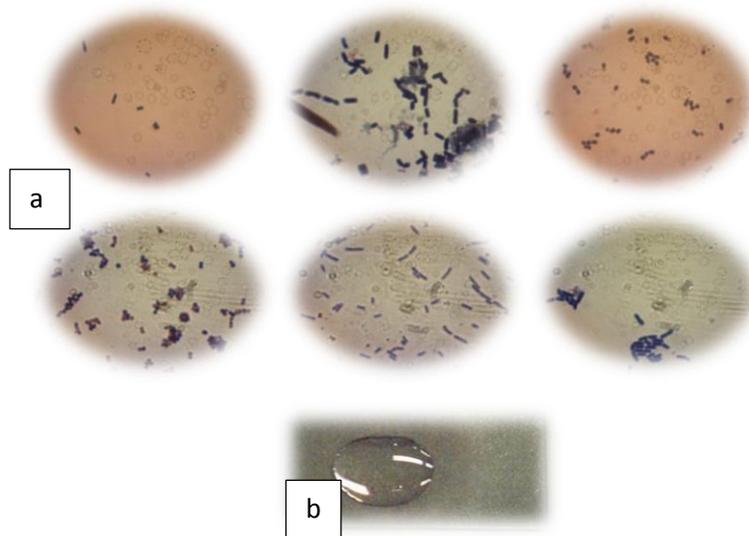


Figura 14. a) Tinción Gram de las cepas seleccionadas, b) prueba negativa de la catalasa.

Se aislaron un total de 27 cepas identificadas como BAL, y se trabajó con las 21 cepas que crecieron en un periodo menor a 24 h. Derivado de esto, se encontró la presencia de morfologías diferentes de cocos y bacilos debido a que esta es una de las principales características de las BAL. Se observaron cocos en racimos, cadenas y tétradas y bacilos cortos, alargados y en cadenas, en algunas hasta más de 5 bacilos. La caracterización e identificación morfológica de las cepas identificadas como BAL se resumen en cuadro 8.

Se obtuvieron un total de 11 microorganismos en forma de bacilos y 10 con forma de cocos, los cuales resultaron Gram positivos y catalasa negativa, principales características de las BAL (Ramírez *et al*, 2011). En cuanto a la observación

macroscópica de las colonias, en su mayoría se observaron pequeñas, de color blanco y textura cremosa como se observa en la figura 15 (Ramírez, 2005; Gaitán, 2013).

Cuadro 9. Caracterización e identificación morfológica de las BAL de cada una de las queserías.

Identificación de las cepas			
Cepa	Tinción Gram	Catalasa	Forma
QR1	+	-	bacilo
QR2	+	-	bacilo
QR3	+	-	bacilo
QR5	+	-	bacilo
CR2	+	-	bacilo
CR4	+	-	coco
LR4	+	-	coco
QJ1	+	-	coco
QJ2	+	-	coco
CJ2	+	-	bacilo
CJ3	+	-	bacilo
CJ4	+	-	coco
LJ1	+	-	coco
LJ2	+	-	coco
LJ4	+	-	coco
QC1	+	-	bacilo
QC4	+	-	coco
QC5	+	-	coco
CC3	+	-	bacilo
CC4	+	-	bacilo
CC5	+	-	bacilo



Figura 15. Colonias de BAL seleccionadas.

7.2. Caracterización de las BAL

7.2.1. Actividad acidificante

La producción de ácido láctico a las 0 y 6 h en cada una de las cepas se observa en las figuras 16 y 17. Los resultados analizados indicaron que en el primer periodo de tiempo la producción de ácido láctico fue estadísticamente semejante en cada una de las cepas desarrollada en un rango de 0.177-0.247% de ácido láctico producido por las BAL; en la segunda evaluación, a las 6 h, se observó que la acidificación del medio o la proliferación de las BAL aumentó de manera similar para las 21 cepas que fueron seleccionadas, con un promedio de formación de ácido láctico de 0.225-0.294 % (ANEXO1).

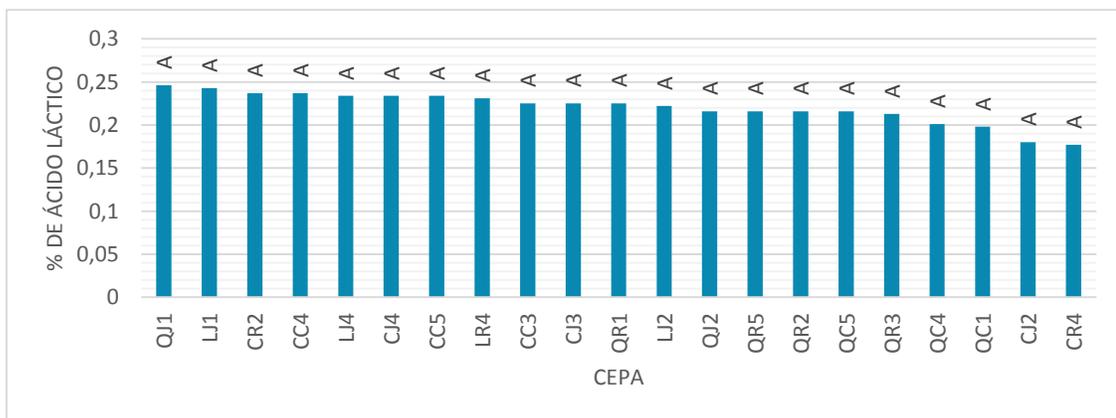


Figura 16. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 0 h de incubación.

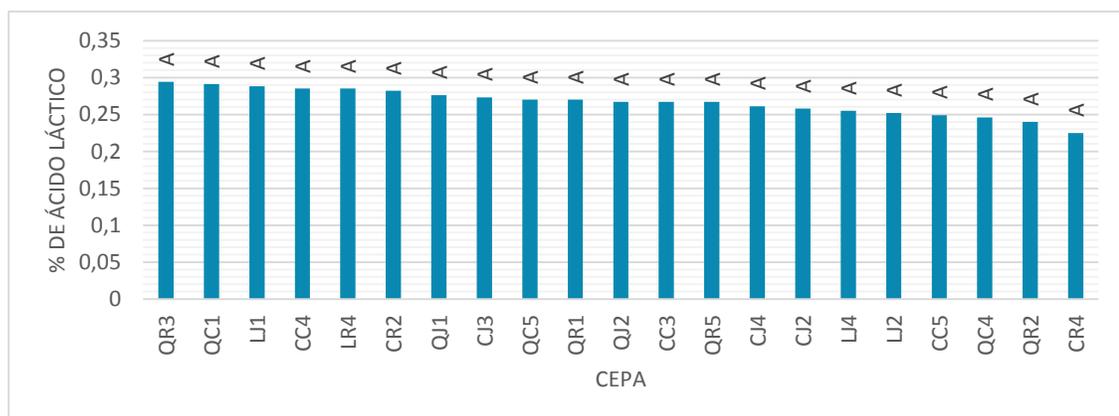


Figura 17. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 6 h de incubación.

A partir de las 12 h de incubación, cómo se observa en la figura 18, comienza a distinguirse diferencia en la producción de ácido láctico entre las BAL. En las figuras 19 y 20 se observa el incremento de ácido láctico en cada una. Las cepas con mayor producción de ácido láctico fueron LJ2 con 0.447% de ácido láctico en a las 12h, CJ4 0.306% de ácido láctico a las 24 h y QC4 con 0.345% de ácido láctico a las 48 h.

Esto nos indicó que estas BAL son los mayores productores de ácido láctico. Por el contrario, los microorganismos o las cepas que presentaron menor acidificación son QR2, CJ3 y CR2, a las 12, 24 y 48 h respectivamente. En algunas cepas, como la QR2, a las 12 h de incubación presentaron la más baja producción de ácido láctico (0.261%), y a las 48 h se observó que se encuentra entre las primeras tres cepas (QC4, QR1 y QR2) que presentaron mayor acidificación con 0.942, 0.921 y 0.897 % de ácido láctico, respetivamente.



Figura 18. Acidificante de las BAL seleccionadas a las 12 h de incubación.

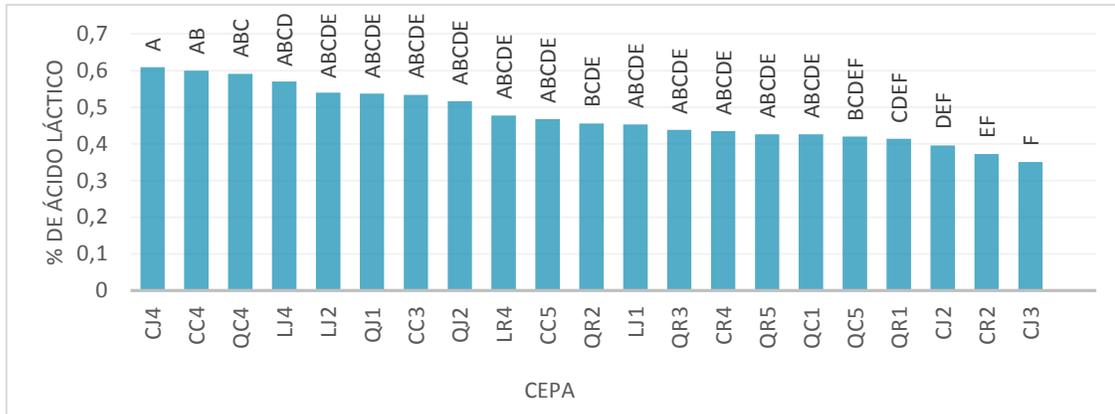


Figura 19. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 24 h de incubación.

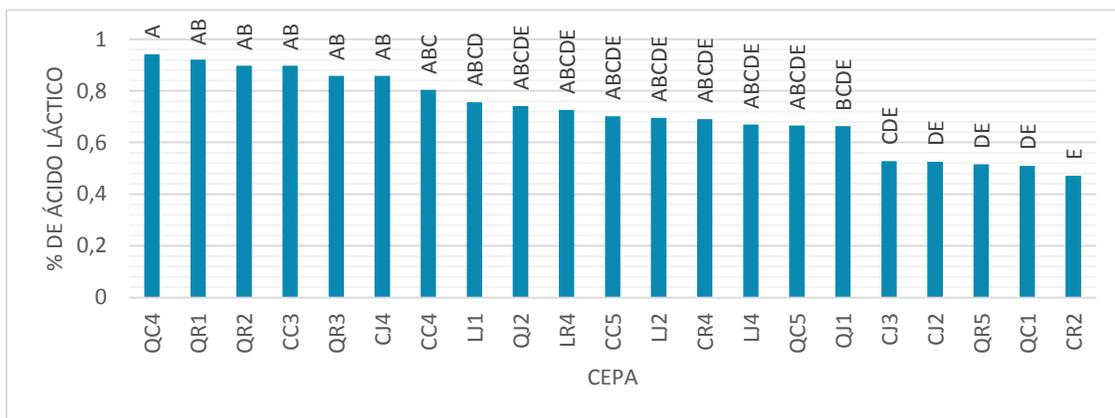


Figura 20. Actividad acidificante de las BAL seleccionadas a las 48 horas de incubación.

Olivera (2011) en su estudio reporta que al realizar la evaluación de la capacidad acidificante de las BAL a las 6 h las cepas con mayor capacidad acidificante fueron *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* y *Streptococcus salivaricus* ssp. *thermophilus*; las cepas del género *Lactobacillus* en su estudio son las que mayor actividad acidificante presentaron, al igual que las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Lactis*; aunque en ciertos estudios por Martins (2008 citado por Olivera, 2011) hace mención del género *Leuconostoc* por presentar baja actividad acidificante.

En el estudio presentado por Latorre (2011) menciona que *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* producen ácido láctico en leche hasta 25^oD después de 6 h de incubación, en un segundo grupo con mayor actividad acidificante se encuentra a *Enterococcus*; por otro lado,

autores marcan que el género *Lactobacillus* no posee buena actividad acidificante, pero son utilizados como cultivos starter debido a las características organolépticas provocadas en el queso.

Para la evaluación de actividad acidificante, Nieto (2008) demostró que *Lactococcus* presenta una acidificación a partir en un periodo de 6 h en un rango entre 0.18 y 0.79 % de ácido láctico y *Lactobacillus* presentó una acidificación entre 0.16 y 0.27 % de ácido láctico. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron que las BAL presentaron un % de ácido láctico a las 6 h entre 0.225-0.294, los cuales se encuentran entre los rangos reportados por diferentes autores y entre las cuales se encuentran bacterias del género *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

La actividad de acidificación de las cepas lácticas es un criterio importante en la elaboración de quesos debido a que nos ayudan en la coagulación y la reducción del crecimiento de microflora no deseada (Tuncer, 2009), además aquellas cepas que presenta una acidificación rápida son considerados como buenos candidatos para proceso de fermentación en productos lácteos como un cultivo iniciador primario y aquellas que presentan una acidificación lenta son empleados como cultivos adjuntos en función de otras propiedades (Akabanda *et al*, 2014).

Para que ciertas bacterias puedan considerarse como cultivos iniciadores, deben tener buena capacidad acidificante. Trabajos previos de Olivera (2011) y Latorre (2011) señalan que la actividad acidificante de cepas como *Lactococcus lactis ssp. lactis* y *Streptococcus* son buenos microorganismos, ya que su capacidad para acidificar es rápida; bacterias como el género *Pediococcus* presentan una baja capacidad de acidificación .

La acidificación contribuye a presentar cambios deseados en los productos finales tales como sabor, aroma y textura (Nieto, 2010). Al evaluar la capacidad de acidificación de las BAL se presentaron texturas diferentes tales como de queso y de yogurt (figura 21).



Figura 21. Texturas presentadas por las BAL durante el periodo de evolución de la actividad acidificante.

7.2.2. Capacidad de Inhibición de bacterias patógenas

El ácido láctico es el principal producto de las BAL con actividad antimicrobiana contra bacterias y mohos (Ramírez, 2005). Las 21 cepas seleccionadas identificadas como BAL fueron empleadas para probar la capacidad de inhibición de bacterias patógenas, como se observa en la figura 22, la formación de halo de inhibición varió de tamaño entre 1.13 y 1.77 cm, lo cual indica que las BAL son capaces de inhibir bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, las cuales fueron empleadas para este ensayo. En algunas cepas la inhibición se presenta con mayor efecto que otras. (ANEXO 2).



Figura 22. Halos de inhibición de las BAL seleccionadas.

En las figuras 23 y 24 se observa que las cepas que presentaron mayor inhibición contra bacterias patógenas fueron QJ2 y QR2 para *Escherichia coli*, con las que se presentó un halo de inhibición de 1.60 y 1.37 cm respectivamente; CJ2 y QR2 para *Salmonella* con un diámetro de inhibición de 1.77 y 1.73 cm respectivamente; y para el caso de *Staphylococcus aureus* se puede apreciar que todas las cepas lo inhibieron de igual manera (figura 25). Las bacterias nativas ácido lácticas presentes en el cuajo, leche y queso de cabra artesanal produjeron una sustancia que inhibió el crecimiento de estos patógenos.



Figura 23. Capacidad inhibitoria de las BAL seleccionadas frente a *Escherichia coli*.

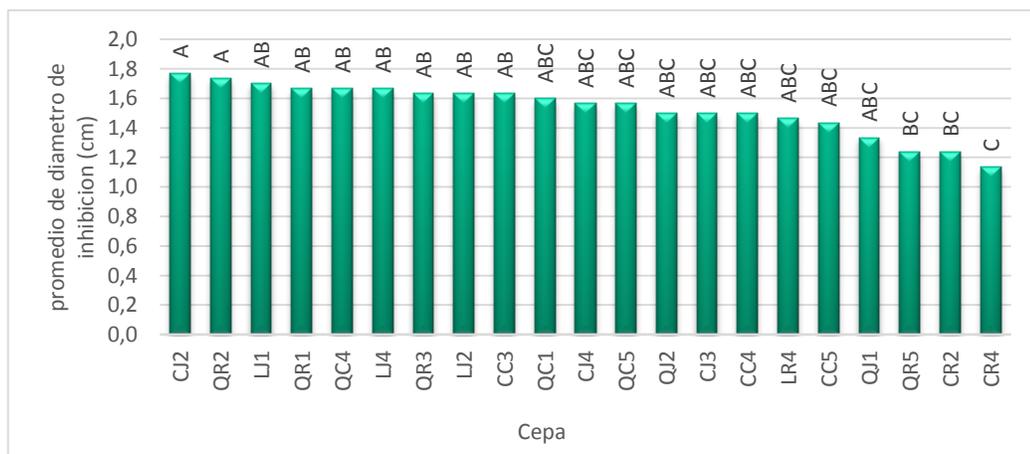


Figura 24. Capacidad inhibitoria de las BAL seleccionadas frente a *Salmonella*.

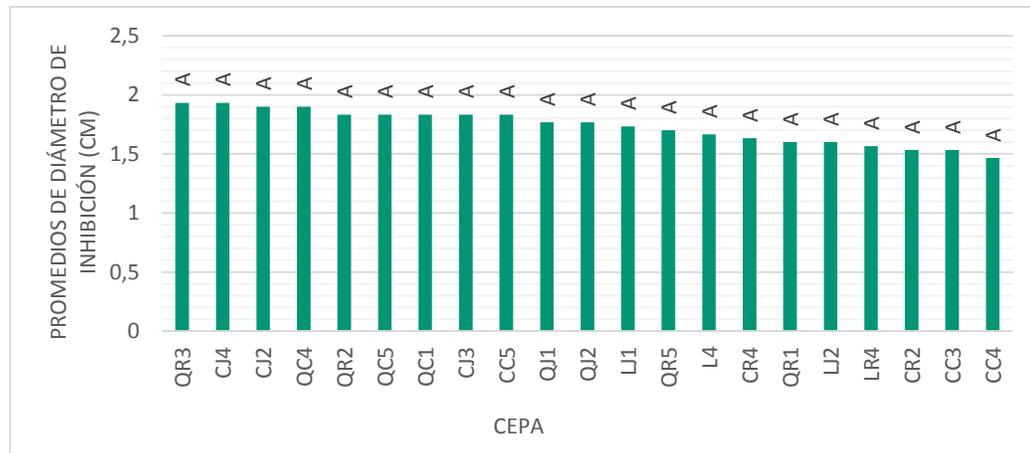


Figura 25. Capacidad inhibitoria de las BAL seleccionadas frente a *Stafilococcus aureus*.

En estudios llevados a cabo por Aguilar y Klotz, (2011) al trabajar con dos cepas de *L. plantarum*, con clave WS4174 y LB279, fueron capaces de inhibir a *E.coli* aproximadamente tres ciclos logarítmicos, debido a que las BAL eran las que intervenían en el cambio de pH, siendo *L. plantarum* LB279 quien acidifico más el medio. Ramírez (2005) al trabajar con BAL y eliminar del medio de crecimiento la glucosa para evitar la producción de ácido láctico, demostró que estas presentaron un efecto inhibitorio contra bacterias patógenas tales como *Vibrio cholerae*, que resultó ser la más sensible; por lo contrario, *E. coli* y *Stafilococcus aureus* presentaron mayor resistencia ya que no fueron inhibidas por ninguna de las cepas de BAL probadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos y comparados con otros estudios se observó que el ácido láctico se considera como un metabolito antimicrobiano, ya que cuenta con una gran capacidad de inhibir a bacterias patógenas. Al ser eliminado este metabolito, como lo demostró Ramírez (2005) en su estudio, no impide el efecto inhibitorio ya que las BAL son capaces de originar bacteriocinas u otros metabolitos con la capacidad de inhibir, pero posiblemente con menor efecto.

La relación entre el pH y la producción de ácido láctico tiene demasiada importancia, al obtener valores bajos de pH es signo de que existe mayor producción de ácido láctico, por lo tanto el sustrato o el medio se encuentra más ácido. Debido a la acidez que se produce en un medio, en este caso la leche, si existen valores muy bajos de pH, la

probabilidad de crecimiento de microorganismos indeseados es casi nula (Ramírez, 2005).

7.2.3. Producción de CO₂ (identificación de las BAL de acuerdo al tipo de fermentación producida)

De acuerdo con los resultados obtenidos de la prueba, en las 21 cepas bacterianas identificadas como BAL ninguna resultó ser productora de gas. Los grupos de BAL *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* *Streptococcus* y junto con algunos *Lactobacillus* son bacterias homofermentativas, es decir, que producen como metabolito final ácido láctico 90-97% (Parra, 2010). El género *Leuconostoc* agrupa a las bacterias heterofermentativas que más CO₂ producen.

Las cepas aisladas de la leche no cuentan con una amplia capacidad de producir CO₂ ya que, por el tipo de metabolismo de azúcares, todas son homofermentativas. Sin embargo, existen otras vías fermentativas en las que se pueden producir gas como la propiónica o la butírica, pero lo hacen en menor cantidad que la vía heterofermentativa. Esto da explicación a la aparición de gas durante el uso de microorganismo que son homofermentativos (Latorre, 2011).

7.2.4. Producción de aromas lácticos en leches fermentadas por BAL

Los tres panelistas expertos seleccionados realizaron la evaluación sensorial de las leches fermentadas por las 21 cepas, previamente aisladas e identificadas, utilizando el método de bombardeo, después de lo cual se agruparon aquellas leches que presentaron olores característicos a lácteos y las que generaron olores desagradables.

De las 21 leches fermentadas 17 presentaron olores agradables a lácteos tales como: a yogurt, queso fresco, jocoque, crema, fermentos, etc.; las 4 restantes se descartaron debido a que produjeron olores desagradables. En el cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de leches fermentadas. Heredia (2011) menciona que *Lactococcus lactis* es una de las principales bacterias lácticas más utilizadas debido a su capacidad de producción de aromas agradables en quesos y otros productos fermentados.

Cuadro 10. Resultados de la evaluación sensorial de producción de aromas lácticos en leches fermentadas por BAL.

PRUEBA SENSORIAL			
CLAVE	P.S.1	P.S 2	P.S.3
LJ2	Yogurt	Fermentado fuerte	Dulce suave
CC5	Feo	feo	feo
CJ4	feo	Mango intenso	Tuna roja
LR4	Queso fresco	fermentado	Levadura olor bajo
QR3	Mango	Olor feo	nopal
QR2	Leche deslactosada	Sin olor	Leche clavel
QC4	Piña	fermentado	Grasa vegetal
CC4	yogurt	Yogurt intenso	Manzana suave
CJ3	Q. asadero recién hecho	Sin olor	durazno
LJ4	Yogurt endulzado	Olor láctico	leche
CR2	Q. fresco	Flores bajo	plástico
QJ2	Yogurt con leche	agrio	fermentado
QJ1	Leche agria	rancio	Alcohol isoamílico
LJ1	Leche bronca	Olor feo	feo
CC3	Floral	yogurt	durazno
QR5	Queso menonita	Mango intenso	crema
QC1	Jocoque	Láctico bajo	levadura
QR1	Leche agria	Floral bajo	Leche deslactosada
QC5	Leche fermentada	fermentado	pera
CJ2	Queso fresco	Flores bajo	yogurt
CR4	Yogurt natural	Láctico intenso	Papaya fermentada

Fuente: elaboración propia. PS= prueba sensorial.

De acuerdo a estos resultados, las cepas consideradas con mejor producción de aroma resultaron ser LJ2, QR2, CC4, LJ4, QJ2 y CR4. Las cepas con olores desagradables fueron CC5, CJ4, LJ1 Y QR3. Las cepas restantes no se tomaron en cuenta ya que presentaron olores tales como nopal, grasa vegetal, mango etc.

En los resultados obtenidos por Nieto *et al* (2009) menciona que la mayoría de las cepas aisladas después de siete días de incubación presentaron aromas típicos a yogurt y mantequilla, los cuales son sabores habituales en el fermentado de leches, presentando sabores a yogurt y ácido en la mayoría de las cepas aisladas y en las otras sabores amargos. Después de 15 de días de incubación se detectó un aumento considerable en los atributos mencionados, especialmente en el sabor ácido y amargo.

7.3 Preparación de BAL para elaboración de queso pasteurizado de cabra

Para este ensayo se seleccionaron las cepas QR2 y QJ2 debido a que, en cuanto a la actividad acidificante, fueron de las cepas con mayor producción de ácido láctico, por lo tanto generaron una mayor inhibición de las bacterias patógenas en estudio.

Otra prueba de importancia para la selección de estas cepas fue la producción de aroma, ya que se obtuvieron cepas con buena capacidad de acidificar el medio e inhibición de bacterias, pero emitieron olores desagradables, por lo tanto se descartaron para las siguientes etapas del estudio. Las cepas QR2 y QJ2 presentaron olores típicos a lácteos.

7.3.1. Curva de calibración

La elaboración de la curva de calibración indicó la concentración de microorganismos obtenidos en cierto periodo de tiempo. Con los resultados obtenidos se conocieron las concentraciones en UFC/mL en cada periodo de tiempo evaluado, medidos a una densidad óptica de 600nm. Entre mayor es el tiempo de incubación la concentración de UFC/mL, o biomasa contenida en el medio, es mayor; por lo tanto, la absorbancia aumenta y el paso de luz transmitida disminuye por la difracción causada por las células, ya que el medio se encuentra más denso o concentrado por el crecimiento de microorganismos.

Para QR2, a las dos horas de incubación presentó una concentración de 7,6 UFC/mL con una absorbancia de 0.4, llegándose a concentrar a las doce horas a 9.4 UFC/mL, por lo tanto se obtuvo una curva de calibración con $R^2= 0,9637$; en un 96% la absorbancia depende del crecimiento bacteriano además de ser positivo como se observa en la figura 26.

En el caso de QJ2 se observó a las dos horas de incubación se obtuvo una concentración de 7.5 UFC/mL hasta llegar a una concentración de 9.5 UFC/mL a las doce horas de incubación. En cuanto a la curva de calibración se obtuvo $R^2=0.94442$, por lo cual en un 94% la absorbancia depende del crecimiento microbiano. El crecimiento de igual manera es positivo (figura 27).

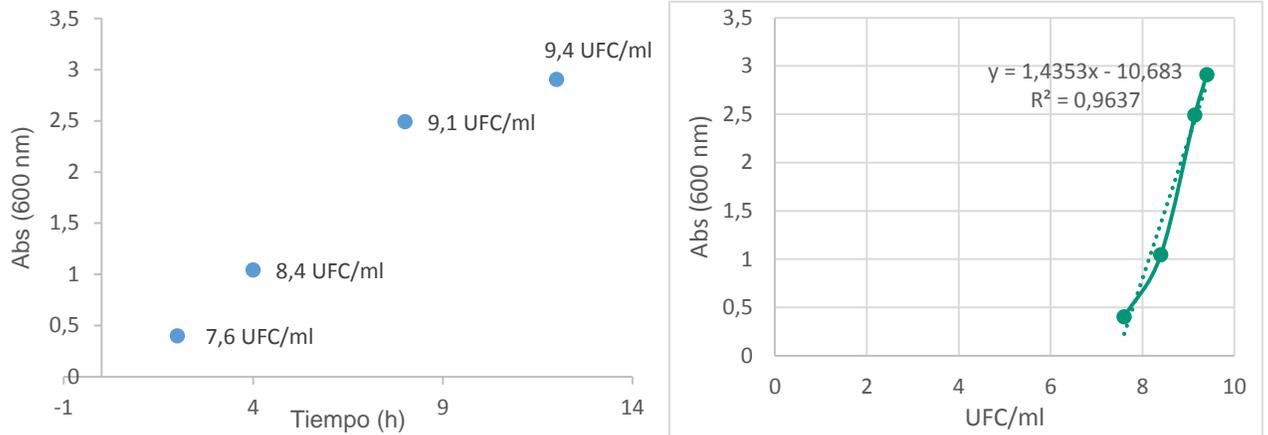


Figura 26. Concentraciones obtenidas en cada periodo de tiempo evaluado y Curva de calibración para QR2.

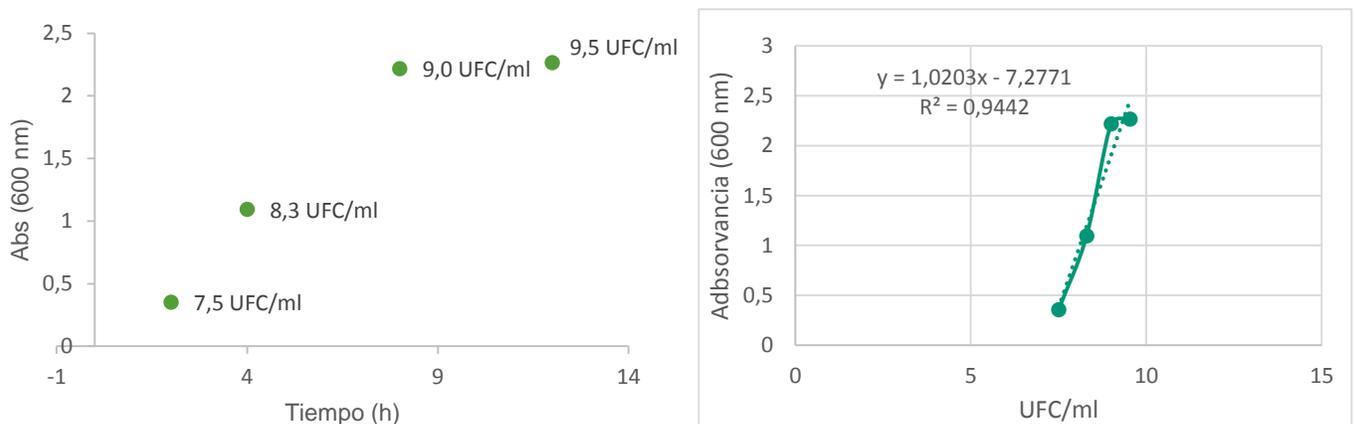


Figura 27. Concentraciones obtenidas en cada periodo de tiempo evaluado y curva de calibración para QJ2.

7.3.2. Curva de crecimiento

Con los datos obtenidos de la curva de calibración se llevó a cabo la curva de crecimiento. Los resultados obtenidos en las gráficas indicaron que para QR2 en un tiempo aproximado de 9 horas y una absorbancia de 2.3, la fase de crecimiento para el microorganismo está finalizando y comienza la fase estacionaria, en este tiempo y a esta lectura se encuentra una cantidad aproximada de 9.0 log UFC/mL. Como se pudo apreciar, únicamente se observaron tres fases: la de adaptación, que se termina a las 2.5

h; la de crecimiento, con un tiempo de 6.5 h; y la fase estacionaria, en un tiempo de 16 h (figura 28).

Para la cepa QJ2, el final de la fase de crecimiento y el inicio de fase estacionaria comienza en un tiempo aproximado de 10 horas y una absorbancia de 1.9, resultando una concentración equivalente a aproximadamente 9.0 log UFC/mL. De igual manera se obtienen únicamente las tres fases adaptación terminando en un tiempo de 2.5 h; crecimiento 7.5 h; y una fase estacionaria de 15 h (figura 29).

El obtener la concentración de UFC/mL en cada una de las cepas de BAL sirvió para llevar cabo la inoculación de la leche y posterior elaboración de queso. Las concentraciones para cada una de las cepas fueron tomadas al inicio de la fase estacionaria ya que en esta fase los microorganismos se encuentran jóvenes para llevar a cabo sus funciones metabólicas y brindar las características en el producto deseado.

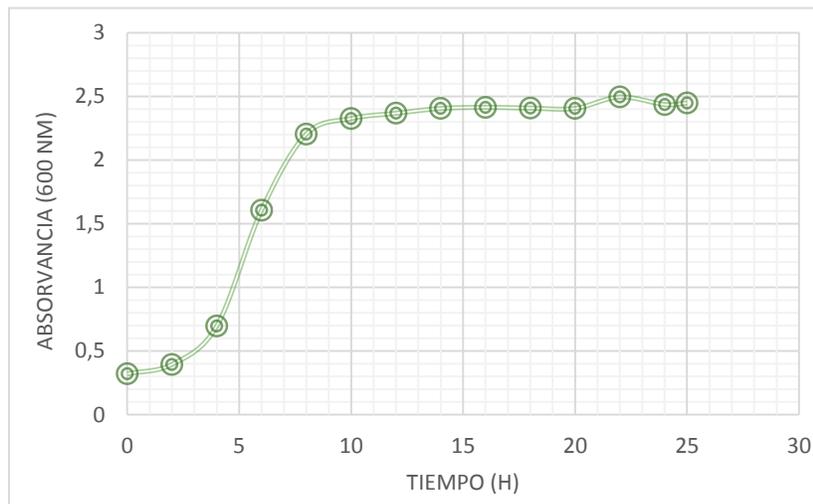


Figura 28. Crecimiento correspondiente a la cepa QR2.

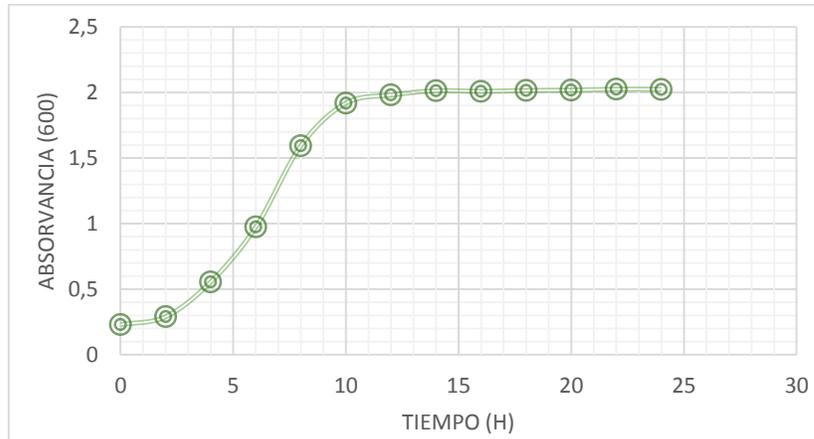


Figura 29. Crecimiento correspondiente a la cepa QJ2.

7.4. Elaboración de queso pasteurizado de cabra utilizando las BAL seleccionadas

De acuerdo a la metodología que marca Monroy (2011) en su trabajo de investigación, por ser un queso artesanal la pasteurización y la inoculación con bacterias son pasos que no se llevan a cabo en el proceso. Como se observó en la metodología, en estos pasos fueron incluidas la pasteurización, con fin de mejorar la calidad higiénica, y la inoculación con BAL para devolver al producto sus propiedades organolépticas generadas por los microorganismos nativos de la leche de cabra (figura 30).

Al aplicar la pasteurización en la leche se redujo la carga microbiana inicial, por lo tanto permitió obtener un producto final con un contenido casi exclusivo de BAL, a diferencia de los quesos artesanales en la cual hongos, levaduras y coliformes se encuentran en concentraciones más altas (Ramos *et al*, 2009).

7.5. Evaluación sensorial del queso de cabra

La evaluación sensorial del queso de cabra artesanal se realizó con la finalidad de que el evaluador encontrara diferencias entre muestras de quesos, los cuales fueron inoculados con las BAL seleccionadas y el control, empleando la prueba de diferencia de control con la ayuda de 20 panelistas semientrenados (figura 31).

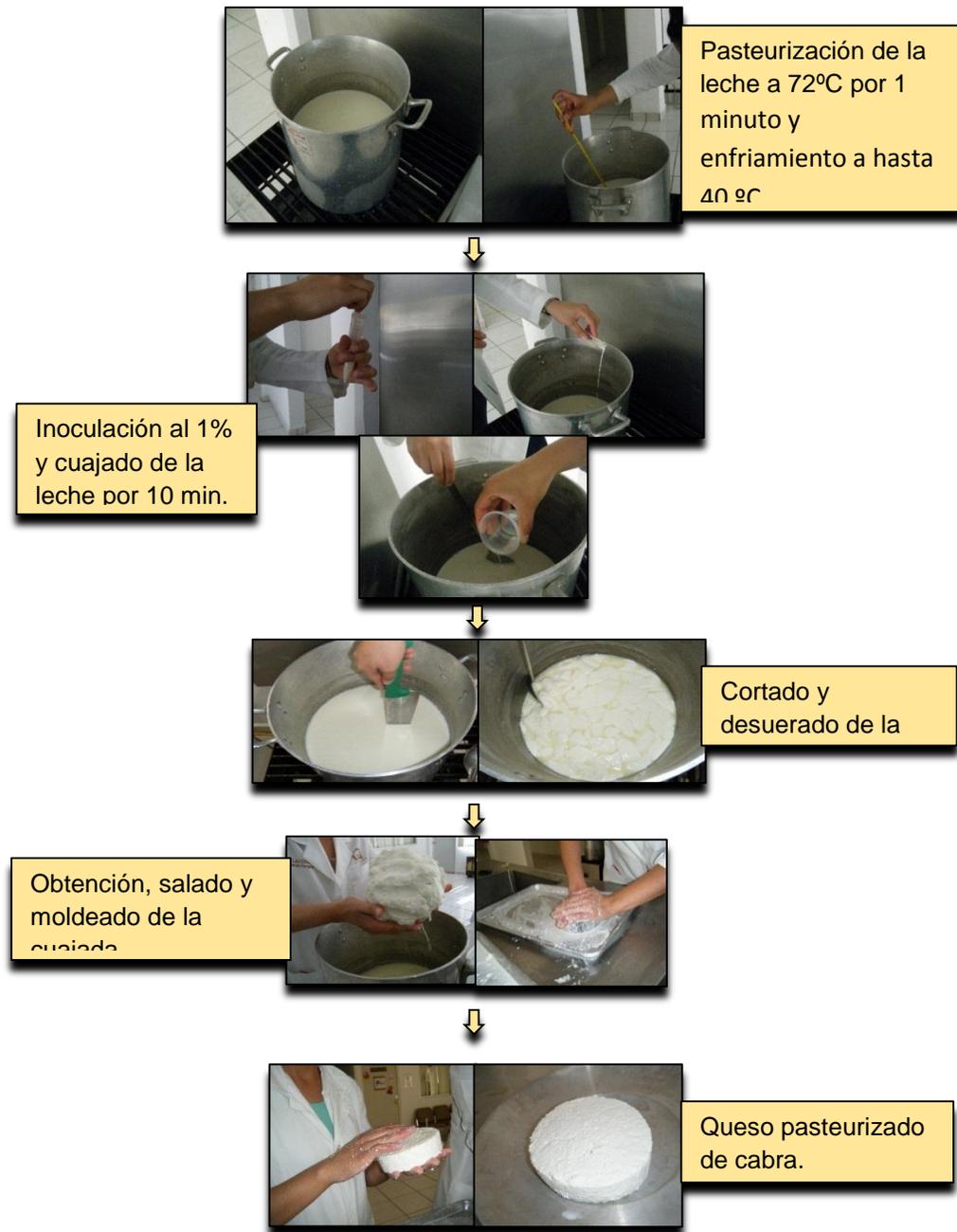


Figura 30. Elaboración de queso pasteurizado de cabra.



Figura 31. Evaluadores del queso pasteurizado de cabra.

En el cuadro 10 se muestra la hoja maestra empleada en la evaluación sensorial en la cual se indica la cantidad de panelista empleados, las permutaciones utilizadas (1-QR2 y 2-QJ2), la codificación de cada una de las muestras y los resultados obtenidos de cada uno de los evaluadores,

Para la evaluación sensorial, los panelistas evaluaron las muestras empleando una escala categórica numérica para medir la magnitud de la diferencia encontrada en las muestras, como se observa en la hoja de evaluación (figura 32). El resultado esperado era que el panelista no encontrara diferencias en el placebo o calificara a este como 0= no diferencia, ya que el placebo se compone de una muestra control contra el mismo control. Algunos panelistas, pudieron detectar el placebo y calificarlo de manera correcta, en algunos casos el placebo fue calificado con una magnitud de diferencia muy alta, es decir que evaluadores encontraron diferencia al evaluar el control contra el mismo control.

Los resultados obtenidos de cada uno de los evaluadores fueron sometidos a un análisis de varianza (ANEXO 3) traducido a forma gráfica (figura 33).

Cuadro 11. Hoja maestra utilizada en la evaluación sensorial del queso elaborado.

PANELISTA	PERMUTACIÓN				CÓDIGO				CALIFICACIÓN			
1	C-C	C-1	C-2	C-COM	222	515	214	729	0	3	4	7
2	C-COM	C-2	C-C	C-1	198	188	498	11	6	2	0	1
3	C-COM	C-C	C-1	C-2	953	111	558	128	6	4	0	5
4	C-C	C-1	C-2	C-COM	590	812	177	38	6	2	5	0
5	C-2	C-COM	C-C	C-1	937	141	204	477	2	2	3	3
6	C-COM	C-C	C-1	C-2	600	637	312	850	3	4	0	3
7	C-2	C-COM	C-C	C-1	247	937	847	963	8	7	5	1
8	C-2	C-COM	C-C	C-1	700	948	938	345	4	5	2	4
9	C-2	C-COM	C-C	C-1	347	324	905	422	2	3	0	2
10	C-1	C-2	C-COM	C-C	846	509	227	567	3	5	5	0
11	C-C	C-1	C-2	C-COM	505	187	916	209	5	6	1	0
12	C-COM	C-C	C-1	C-2	97	979	165	451	7	1	8	9
13	C-COM	C-2	C-C	C-1	538	241	784	312	9	9	1	0
14	C-COM	C-C	C-1	C-2	339	203	227	388	2	0	1	3
15	C-COM	C-2	C-C	C-1	841	219	940	136	9	6	0	1
16	C-COM	C-2	C-C	C-1	226	800	638	89	8	8	1	3
17	C-1	C-2	C-COM	C-C	533	628	642	745	6	7	4	8
18	C-C	C-1	C-2	C-COM	99	676	702	717	0	3	8	6
19	C-1	C-2	C-COM	C-C	638	746	209	902	4	7	8	0
20	C-1	C-2	C-COM	C-C	973	276	726	575	2	4	6	1

Fuente: elaboración propia.

PRUEBA DE DIFERENCIA DE CONTROL
 FECHA: 12/06/2013
 PANELISTA: 9
 NOMBRE: Cabrón M. Flores Bernal
 TIPO DE MUESTRA: QUESO PASTEURIZADO DE CABRA

Instrucciones:
 1.- usted ha recibido 4 pares de muestras, en cada par existe un control etiquetado como C y otra muestra etiquetada con un número de tres dígitos.
 2.- Pruebe las muestras en el estricto orden de arriba hacia abajo, comenzando por el control.
 3.- Indique la magnitud de la diferencia en el sabor de los quesos, entre la muestra y el control, empleando la escala proporcionada en la parte de abajo.
 4.- Enjuague su boca con agua purificada antes de cada evaluación.

0= No diferencia
 1=
 2=
 3=
 4=
 5=
 6=
 7=
 8=
 9= Diferencia muy grande

c. 377 = 2 ✓
 c. 324 = 3 ✓
 c. 905 = 0 ✓
 c. 422 = 2 ✓

Recuerde que en alguno de los pares, el duplicado del control será la muestra.
 Comentarios: La percepción olfativa no note tiene que ver con la cantidad de sal.

¡POR TU COLABORACIÓN MUCHAS GRACIAS!

Figura 32. Hoja de evaluación del queso artesanal de cabra pasteurizado.

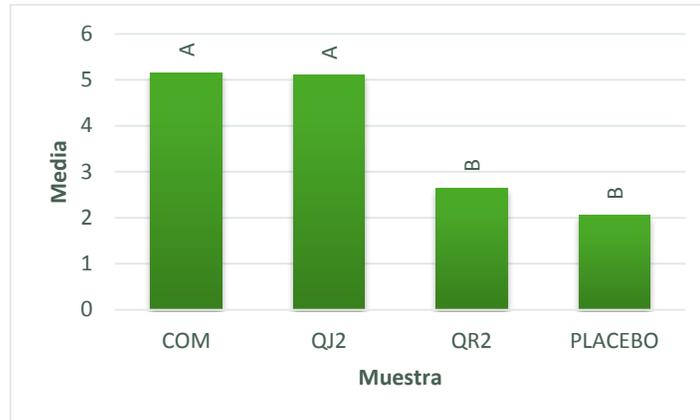


Figura 33. Resultados de la evaluación sensorial de quesos pasteurizados.

Estos resultados indicaron que los quesos inoculados con QJ2 y COM son significativamente diferentes a los quesos inoculados con QJ2 y el placebo. Los quesos que se encuentran en el grupo A (QJ2 y COM) presentaron medias de 5.15 y 5.10 respectivamente, esto quiere decir que presentaron características diferentes, tales como sabor, textura, color, etc, con respecto al control.

Para el caso de los quesos que se englobaron en el grupo B (QJ2 y el placebo) presentaron medias de 2.65 y 2.05, respectivamente. Estos resultados indicaron que no se identificaron diferencias contra el control, es decir, las BAL inoculadas en estos quesos no le brindaron propiedades significativas importantes.

Por lo tanto, las cepas que se incluyeron en el grupo A se consideraron útiles para ser empleadas como cultivos iniciadores, ya que éstas brindan ciertas características que pueden ser empleadas para la elaboración de productos en los que se espera que presenten las mismas características que los quesos artesanales.

Estudios realizados por Alvarado *et al* (2007) demostraron que las cepas aisladas de *Lactobacillus* y *Lactococcus* a partir de un queso artesanal, al ser inoculados en quesos experimentales elaborados a partir de leche pasteurizada, son equivalentes a los que se elaboran con leche cruda, y que estas bacterias son las responsables de proporcionar las características particulares del queso en su estudio.

VIII.- CONCLUSIONES

Las BAL seleccionadas en cuanto a su morfología macroscópica presentaron variaciones, identificándose algunas colonias más pequeñas que otras. En identificación morfológica microscópica presentaron forma cocoide y bacilar, la cual es una de las principales características que identifica a las BAL, además de ser Gram positivas para confirmar la pureza de cada cultivo y ser catalasa negativa.

Las cepas codificadas como QJ2 y QR2 presentaron mejores resultados en cada una de las pruebas bioquímicas realizadas: actividad acidificante, inhibición de bacterias patógenas y presentaron olores agradables; también resultaron ser homofermentativas al no producir CO₂ durante la prueba correspondiente. Por las características presentadas se podría inferir que *Lactococcus lactis* ssp *lactis* puede ser una de las BAL empleadas y otras del género *Lactobacillus*, ya que éste se encuentra presente en la mayoría de los quesos artesanales. Sin embargo, son necesarios estudios más sensibles a fin de corroborarlo.

La determinación de la curva de calibración y de crecimiento permitió conocer las concentraciones en cada tiempo evaluado y la velocidad de crecimiento. Las cepas de BAL presentaron concentraciones similares y velocidad de crecimiento semejante. QJ2 llegó a la fase estacionaria en un tiempo de 10 h, y QR2 en 9h.

Los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada, inoculados con las BAL seleccionadas y analizados mediante una evaluación sensorial, permitieron conocer que la cepa QJ2 junto con el COM generaron las mejores características, es decir, que las propiedades fueron estadísticamente semejantes a la del queso artesanal. Por lo tanto, las cepas aisladas pueden ser empleadas como cultivos iniciadores, siendo adecuadas para producir queso de cabra con características semejantes al artesanal, pero a partir de leche pasteurizada, con sus respectivas ventajas para productores y consumidores.

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, C., y Klotz, B. (2011). Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* por bacterias ácido lácticas: presencia de quórum sensing?. Alimentos Hoy, 13(13), 18-26.

Agudelo C., Ortega R., Hoyo J. L. 2010. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y Bacterias Acido lácticas de yogurt. Facultad de ciencias Agropecuarias. 8(2), pp 8-16.

Akabanda F., Owusu K. J., Tano D. K., Parkouda C. y Jerpersen L. 2014. The Use of Lactic Acid Bacteria Starter Culture in the Production of Nunu, a Spontaneously Fermented Milk Product in Ghana. International Journal of Food Science. 2014.

Alvarado R. C., Chacón R. Z., Otoniel R. J., Guerrero C. B., López C. G. 2007. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. Revista Científica FCV- LUZ. 8(3), pp 301-308.

Araya V., Gallo L., Quesada C., Chaves C. y Arias M. L. 2008. Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuida en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 58(2). Pp 182-186.

Cabeza H. E. A. 2010. Bacterias acido lácticas (BAL) como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Disponible en: <http://documents.mx/documents/bacteriasacido-lcticas-bal-aplicacio-1.html>. (19 de noviembre de 2005).

Carrera V. M. A., 2015. Evaluación del potencial antimicrobiano de cepas de bacterias acido lácticas aisladas de diferentes muestras de leche. Tesis profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ciencia Animal. Saltillo, Coahuila. 77 p.

Castillo C. A. 2014. Elaboración de queso tipo poro con cultivos iniciadores obtenidos durante la producción artesanal del alimento. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Santiago de Querétaro, Querétaro. 96 p.

Cayetano J. y Salem A. Z. M. 2012. Características físicoquímicos del queso de ovino en México. *Researchgate*. Disponible en: http://www.researchgate.net/profile/A_Salem/publication/262697692_Caracteristicas_fisicoquimico_del_queso_de_ovino_en_mexico/links/0deec538850b2ed90d000000.pdf. (16 de mayo de 2015).

Cervantes E. F.; Villegas de Gante A. 2013. Los quesos mexicanos genuinos: alimentos tradicionales elaborados a base de leche cruda. *Slow Food Brasil*. Disponible en <http://www.slowfoodbrasil.com/textos/alimentacao-e-cultura/677-fernando-cervantes-escoto-e-abraham-villegas-de-gante>. (04 de noviembre de 2015)

Charles A. 1986. Ciencia de la leche, principios de técnica lechera. Editorial CECSA. 594 p.

Díaz C. 2011. Adherencia y colonización de *Pseudomonas Fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de ciencia exactas. 262 p.

Espinoza O. A., Cervantes E. F., Villegas de Gante A., Cesin V. A. 2010. Los quesos tradicionales mexicanos: nuevos ilegales. *La jornada del Campo*. Núm. 29.

Farías R., García U. A., García A., y Tovar V. A. 2000. Eficiencia de la pasteurización de la leche de cabra en una mini planta procesadora de queso. *Revista científica FCV-LUZ*. 10(2). Pp 119-123.

Gaitán V. D. M. 2013. Aislamiento y evaluación de bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente. Tesis profesional. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D. C. 64 p.

Godic T. K. y Vengust A. 2007. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food control*. 19(2008). Pp 570-577.

González M.M. 2011. Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos a partir de frutas (uva, manzana y ciruela). Tesis profesional. Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Saltillo, Coahuila. 64 p.

Guerrero L., Muset G., Pacheco L. 1997. Evaluación de las actividades enzimáticas de cultivos comerciales usados para la elaboración de quesos. Revista científica FCV-LUZ. 7(3), pp 209-214.

Heredia C., P., Y. 2011. Caracterización del proceso de producción del queso cocido artesanal y de las principales bacterias acidolácticas generadoras de aroma. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora. 89 p.

Hernández M.A. 2007. Evaluación sensorial de productos agroalimentarios. Impresos GAMA. Texcoco Estado de México. Pp 72-77.

Latorre D. I. 2011. Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesanal teruel. Especialidad. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. 66 p.

Madrid A. 1994. Nuevo Manual de Tecnología Quesera. AMV ediciones. Madrid, España. 379 p.

Mahaut M., Romain J. y Brulé G. 2003. Introducción a la Tecnología Quesera. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 189 p.

Marino M., Maifreni M., Rondidini G. 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 229(2003). Pp 133-140.

Martin C. M. Gomez H. H. Alanís de la O. R. 2008. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. Redalyc. 6(5), pp 1-17.

Martínez M. P., 2015. Calidad microbiológica y fisicoquímica de queso fresco elaborado artesanalmente en diferentes áreas de la región de Saltillo, Coahuila. Tesis profesional. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. 38 p.

Monroy, B., R. 2014. Caracterización microbiológica y química del queso de cabra artesanal de cuatro localidades del sureste de Coahuila. Tesis profesional. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 74 p.

Mora P. N. y García G. A. 2007. Susceptibilidad de Bacterias Acido Lácticas frente a diversos antibióticos. 2007. Tesis profesional. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Pachuca de Soto Hidalgo. 123 p.

Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Palop, LI., Cabezas, L. 2008. Comparative study of methods for the determination of proteolytic activity in lactic acid bacteria and selection of an autochthonous starter to manufacture manchego cheese. *Milchwissenschaft*. 63, pp 61- 63.

Nieto-Arribas P., Sesen S., J.M. Poveda J. M., Palop LI and Cabezas L. 2009. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 107 (2009), pp 1505-1517.

Nieto-Arribas P., Sesen S., J.M. Poveda J. M., Palop LI and Cabezas L. 2010. Diversidad genética y caracterización tecnológica de cepas autóctonas aisladas de queso de D. O. "MANCHEGO", para su selección como cultivo iniciador. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Catilla-La Mancha. Ciudad Real. 269 p.

Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

Olivera J. 2011. Caracterización tecnología de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Tesis profesional. Facultad de Agronomía. Universidad de la Republica. 45 p.

Ortigosa M., Torre P., Izco J. M. 2001. Effect of Pasteurization of Ewe's Milk and Use of a Native Starter Culture on the Volatile Components and Sensory Characteristics of Roncal Cheese. *Journal of Dairy Science*. 84(6). Pp 1320-1330.

Ortiz B. M. 2006. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. Tesis profesional. Universidad autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de soto, Hidalgo. 89 p.

Parra H. R. A. 2010. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Review*. 8(1). Pp 93-105.

Perdomo G. N. 2010. Evaluación de calidad microbiológica de la leche y queso fresco "de prensa" artesanal elaborado en el municipio de Jesús Carranza, Veracruz, México. Tesis profesional. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz, Veracruz. 71 p.

Ramírez C. M. S. 2005. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis profesional. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Químicas. Pachuca de Soto, Hidalgo. 86 p.

Ramírez R. J. C., Rosas U. P., Velázquez G. M. Y., Ulloa J. A. y Arce R. F. 2011. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista fuente*. 2(7). Pp 1-16.

Ramos I. B., Bucio G. A, Bautista M.C., Aranda I. E., Izquierdo R. F. 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Redalyc*. 25(2). Pp 159-171.

Rangel O. S. C. 2011. Identificación y caracterización de los consorcios microbianos del queso crema tropical. Tesis de maestría. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. 78 p.

Rodríguez R., Echeverría M. 2009. Microbiología de la leche. *edUTecNe*. Disponible en: http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf. (16 de mayo de 2015).

Sánchez L.L.C., Corrales L.R.C. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Novva-publicación científica*. 3(4), pp 21-29.

Suárez M. 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 (boyaca). Tesis profesional. Universidad de la Salle. Facultad de Zootecnia. Bogotá D.C. 81 p.

Tucer Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish Tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*. 8(24), pp 7008-7016.

Victoria T., Totosaus A., Guerrero I., Pérez-Chabela M. L. 2006. Efecto de bacterias ácido lácticas termorresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(2), pp 135-141.

Villegas de Gante Abraham. 2004. *Tecnología quesera*. Trillas. México. 398 p.

Villegas, G., A. y Cervantes, E., F. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revaloración de los quesos artesanales mexicanos. *Redalyc. Estudios sociales*. Número 38. Pp 146-164.

Vinderola G., Capellini B., Vilareal F., Suárez V., Quiveroni A. y Reinheimer J. 2007. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LTW- Food Science and Technology*. 41(2008), pp 1678-1688.

Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A. y Van Boekel M.A.J.S.2001. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Editorial ACRIBA. Zaragoza, España. 730 p.

X.- ANEXOS

10.1 ANEXO 1. Promedios y desviaciones estándar de la actividad acidificante de cada una de las muestras recolectadas de los ejidos.

Cuadro 12. Promedios y desviaciones estándar del ejido El Recreo

Producción de ácido láctico (h)	LR4	QR2	QR3	QR5	CR4	QR1	CR2
0	0.231±0.018	0.216±0.009	0.213±0.031	0.216±0.023	0.177±0.010	0.225±0.023	0.237±0.022
6	0.285±0.028	0.240±0.010	0.294±0.051	0.267±0.049	0.225±0.009	0.270±0.045	0.282±0.013
12	0.348±0.005	0.261±0.015	0.318±0.057	0.330±0.044	0.291±0.052	0.291±0.037	0.306±0.023
24	0.477±0.015	0.456±0.018	0.438±0.066	0.426±0.022	0.435±0.031	0.414±0.0412	0.372±0.051
48	0.726±0.112	0.897±0.111	0.858±0.081	0.516±0.059	0.690±0.042	0.921±0.028	0.471±0.081

Cuadro 13. Promedios y desviaciones estándar del ejido Jagüey de Ferniza.

Producción de ácido láctico (h)	LJ2	LJ1	QJ1	QJ2	LJ4	CJ3	CJ2	CJ4
0	0.222±0.036	0.243±0.0155	0.246±0.018	0.216±0.032	0.234±0.023	0.225±0.009	0.180±0.018	0.234±0.045
6	0.252±0.039	0.288±0.009	0.276±0.020	0.267±0.020	0.255±0.013	0.273±0.022	0.258±0.022	0.261±0.047
12	0.447±0.0259	0.360±0.023	0.327±0.010	0.363±0.013	0.387±0.045	0.318±0.031	0.309±0.0289	0.306±0.039
24	0.540±0.086	0.453±0.068	0.537±0.036	0.516±0.058	0.570±0.037	0.351±0.041	0.396±0.023	0.609±0.073
48	0.696±0.097	0.756±0.018	0.066±0.013	0.741±0.027	0.669±0.066	0.528±0.157	0.525±0.027	0.858±0.165

Cuadro 14. Promedio y desviaciones estándar del ejido Chapultepec.

Producción de ácido láctico (h)	QC1	QC5	CC5	CC4	QC4	CC3
0	0.198±0.032	0.216±0.009	0.234±0.018	0.237±0.020	0.201±0.013	0.225±0.027
6	0.291±0.022	0.270±0.032	0.249±0.013	0.285±0.010	0.246±0.018	0.267±0.040
12	0.312±0.022	0.309±0.027	0.342±0.015	0.318±0.005	0.345±0.018	0.348±0.013
24	0.426±0.0511	0.420±0.013	0.468±0.100	0.600±0.027	0.591±0.150	0.534±0.022
48	0.510±0.0511	0.666±0.047	0.702±0.073	0.804±0.046	0.942±0.139	0.897±0.150

10.2 ANEXO 2. Promedios y desviaciones estándar de la capacidad de inhibición de bacterias patógenas.

Cuadro 15. Promedios y desviaciones estándar de *Salmonella*.

	Cepas							
El Recreo	LR4	QR2	QR3	QR5	CR4	QR1	CR2	
Promedios y desviaciones estándar	1,47 ±0,21	1,37±0,12	1,63±0,006	1,23±0,006	1,13±0,12	1,67±0,21	1,23±0,21	
Jagüey de Ferniza	LJ2	LJ1	QJ1	QJ2	LJ4	CJ3	CJ2	CJ4
Promedios y desviaciones estándar	1,63±0,06	1,7±0,10	1,33±0,15	1,50±0,20	1,67±0,15	1,50±0,10	1,77±0,06	1,57±0,12
Chapultepec	QC1	QC5	CC5	CC4	QC4	CC3		
Promedios y desviaciones estándar	1,60±0,10	1,57±0,35	1,43±0,21	1,50±0,26	1,67±0,15	1,63±0,066		

Cuadro 16. Promedios y desviaciones estándar de *E.coli*.

	Cepas							
El Recreo	LR4	QR2	QR3	QR5	CR4	QR1	CR2	
Promedios y desviaciones estándar	1,43±0,06	1,37±0,15	1,27±0,12	1,47±0,006	1,50±0,10	1,60±0,10	0,93±0,12	
Jagüey de Ferniza	LJ2	LJ1	QJ1	QJ2	LJ4	CJ3	CJ2	CJ4
Promedios y desviaciones estándar	1,33±0,66	1,47±0,06	1,27±0,06	1,60±0,10	1,17±0,66	1,37±0,21	1,37±0,06	1,27±0,06
Chapultepec	QC1	QC5	CC5	CC4	QC4	CC3		
Promedios y desviaciones estándar	1,40±0,10	1,27±0,15	1,47±0,12	1,40±0,10	1,40±0,20	1,20±0,10		

Cuadro 17. Promedios y desviaciones estándar de *Stafilococcus aureus*.

	Cepas							
El Recreo	LR4	QR2	QR3	QR5	CR4	QR1	CR2	
Promedios y desviaciones estándar	1,57±0,40	1,83±0,06	1,93±0,15	1,70±0,10	1,63±0,12	1,60±0,26	1,83±0,06	
Jagüey de Ferniza	LJ2	LJ1	QJ1	QJ2	LJ4	CJ3	CJ2	CJ4
Promedios y desviaciones estándar	1,60±0,20	1,73±0,12	1,77±0,29	1,77±0,06	1,67±0,21	1,83±0,15	1,90±0,10	1,93±0,12
Chapultepec	QC1	QC5	CC5	CC4	QC4	CC3		
Promedios y desviaciones estándar	1,83±0,12	1,83±0,66	1,83±0,15	1,47,0,06	1,90±0,10	1,53±0,15		

10.3 ANEXO 3. Resultados estadísticos de la evaluación sensorial de queso pasteurizado de cabra, analizados con el programa estadístico SAS, análisis de varianza, diseño completamente al azar.

The SAS System 11:04 Thursday, June 15, 2015 1

The ANOVA Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
juez	20	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
muestra	4	COM QJ2 QR2 placebo

Number of Observations Read 80
Number of Observations Used 80

The SAS System 11:04 Thursday, June 15, 2015 2

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: magnitud

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	22	295.3750000	13.4261364	2.32	0.0058
Error	57	330.1125000	5.7914474		
Corrected Total	79	625.4875000			

R-Square 0.472232
Coeff Var 64.38910
Root MSE 2.406543
magnitud Mean 3.737500

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
juez	19	137.7375000	7.2493421	1.25	0.2520
muestra	3	157.6375000	52.5458333	9.07	<.0001

The SAS System 11:04 Thursday, June 15, 2015 3

The ANOVA Procedure
Dunnett's t Tests for magnitud

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error for comparisons of all treatments against a control.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 57
Error Mean Square 5.791447
Critical Value of Dunnett's t 2.41323
Minimum Significant Difference 1.8365

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

muestra Difference Between Simultaneous 95%

Comparison	Means	Confidence Limits
COM - placebo	3.1000	1.2635 4.9365 ***
QJ2 - placebo	3.0500	1.2135 4.8865 ***
QR2 - placebo	0.6000	-1.2365 2.4365

The SAS System 11:04 Thursday, June 15, 2015 4
 The ANOVA Procedure
 t Tests (LSD) for magnitud

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	57
Error Mean Square	5.791447
Critical Value of t	2.00247
Least Significant Difference	1.5239

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	muestra
A	5.1500	20	COM
A	5.1000	20	QJ2
B	2.6500	20	QR2
B	2.0500	20	placebo