

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**

“CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL  
QUESO COCIDO ARTESANAL Y DE LAS PRINCIPALES  
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS GENERADORAS DE AROMA”

POR:

**PRISCILIA YAZMÍN HEREDIA CASTRO**

TESIS APROBADA POR LA:

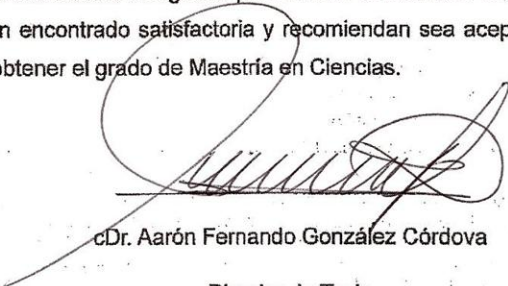
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

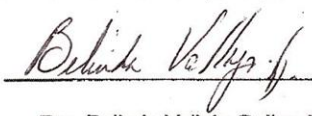
## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de Priscilla Yazmín Heredia Castro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



cDr. Aarón Fernando González Córdova

Director de Tesis



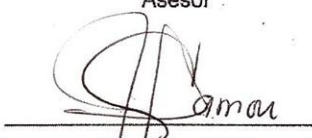
Dra. Belinda Vallejo Galland

Asesora



Dr. Adrián Hernández Mendoza

Asesor



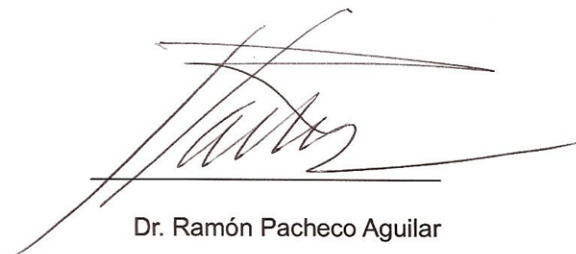
Dr. Juan Pedro Camou

Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin el permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación por escrito del Director de la tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo representa para mí una de las etapas más enriquecedoras en mi vida, por las enseñanzas, el esfuerzo y la motivación de finalizar mis estudios de posgrado. Durante mis estudios en CIAD y hasta la conclusión de esta tesis, hubo personas que colaboraron y que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible la culminación de este trabajo e incluso también hay quienes las merecen por haber plasmado una huella en mi vida.

A Dios por permitirme llegar hasta aquí, por llenar mi vida de fortaleza, salud, dicha y bendiciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado para poder realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

A mi Director, el cDr. Aarón Fernando González Córdova, por apoyarme en todo lo necesario para concluir este trabajo, por aceptarme como su estudiante de maestría, por sus consejos, opiniones. Gracias por todo.

A mis asesores, la Dra. Belinda Vallejo Galland, el Dr. Adrián Hernández y el Dr. Juan Pedro Camou, por todos sus correcciones, observaciones y comentarios, necesarios para finaliza este trabajo.

Al Dr. Adrián Hernández además de su aportación como asesor, fue indispensable su apoyo en diferentes etapas en este trabajo, así como la colaboración de la M. en C. Carmen Estrada Montoya, M. en C. Ricardo Reyes Díaz y la Dra. Ma. de Jesús Torres Llenez.

A mis compañeros de laboratorio, Clemencia García, Jesús Sosa, Lizzete Paz, Vanessa Saracho, Sarahí Rangel, Lilia Beltrán, Lourdes Santiago, Montserrat Vargas, Fausto Cantú, José Carlos Rodríguez, Érika Rivera y Roberto Rodríguez que, de alguna forma también me apoyaron para poder culminar este estudio.

A la Dra. Gloria Yepiz y la Dra. Ana María Calderón por su apoyo como coordinadoras de docencia.

Al personal de CIAD que siempre me atendieron, en especial a don Gerardo Reyna, Luis Conde, Fernando Leyva, Faly Gil Lamadrid, Laura García, Verónica Araiza, Argelia Marín, Héctor Galindo, José Antonio y Héctor Cota.

A todos mis compañeros de generación por su amistad incondicional, sobre todo a Rita Paz, Judith Peralta, Gabriela García, David Vargas, Cynthia y Miriam Luévano, Rosina Cabrera, Margarita Ramírez, Bertha Leal, Salvador Carrasco y Blanca Castañeda.

## DEDICATORIA

*Este trabajo esta dedicado a mi mamá la Sra. Yolanda Isela Castro Talamantes a quien agradezco de todo corazón por su amor, apoyo, comprensión exigencias, regaños, consejos y la motivación de salir adelante y ayudarme a culminar una etapa más en mi vida. Gracias por compartir y acompañarme en todos mis momentos tristes y felicies.*

*A mi sobrina Dannita Fierro Heredia por llenar de luz mi vida-*

*A mi novio Jesús Sosa Castañeda, por todo su apoyo y motivación para terminar este trabajo.*

# CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>3</b>
2.1 QUESOS Y SU FORMA DE ELABORACIÓN.....	3
2.1.1 <i>Coagulación de la leche</i> .....	4
2.1.2 <i>Desuerado</i> .....	5
2.1.3 <i>Maduración o afinado de la cuajada</i> .....	6
2.2 QUESOS MEXICANOS.....	7
2.3 QUESO COCIDO.....	10
2.4 MICROBIOLOGÍA DEL QUESO.....	11
2.4.1 <i>Microorganismos patógenos</i> .....	12
2.4.2 <i>Bacterias ácido lácticas</i> .....	13
2.4.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas .....	14
2.4.2.2 Características de las bacterias ácido lácticas. ....	14
2.5. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS FORMADORAS DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y DE SABOR	17
2.6. CULTIVOS LÁCTICOS INICIADORES .....	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>

6.1 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO .....	25
6.2 AISLADO DE LAS BAL.....	26
6.4 ELABORACIÓN DE LECHE FERMENTADAS .....	32
6.5 EVALUACIÓN SENSORIAL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
7.1 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO .....	33
7.1.1 <i>Análisis Fisicoquímicos</i> .....	39
7.1.1.1 Leche.....	39
7.1.1.2 Suero .....	42
7.1.1.3 Cuajada .....	44
7.1.1.4 Queso .....	46
7.1.2 <i>Análisis microbiológicos</i> .....	48
7.1.2.1 Leche.....	48
7.1.2.2 Suero .....	53
7.1.2.3 Cuajada .....	58
7.1.2.4 Queso .....	63
7.2 AISLADO DE BAL.....	68
6.3 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS BAL .....	68
7.5 EVALUACIÓN SENSORIAL .....	71
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>77</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>73</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DE ALGUNAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	16
<b>TABLA 2.</b> CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE UTILIZADA PARA LA PREPARACIÓN DE QUESO COCIDO EN DIFERENTES QUESERÍAS.....	34
<b>TABLA 3.</b> CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA LECHE UTILIZADA PARA LA PREPARACIÓN DE QUESO COCIDO EN DIFERENTES QUESERÍAS.....	41
<b>TABLA 4.</b> CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE SUERO OBTENIDO DE LA ELABORACIÓN DEL QUESO COCIDO EN DIFERENTES QUESERÍAS.....	43
<b>TABLA 5.</b> CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE CUAJADA OBTENIDA EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COCIDO EN DIFERENTES QUESERÍAS.....	45
<b>TABLA 6.</b> CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL QUESO COCIDO PREPARADO EN DIFERENTES QUESERIAS.....	47
<b>TABLA 7.</b> CEPAS AISLADAS DE LAS QUESERÍAS ANALIZADAS.....	68
<b>TABLA 8.</b> MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAS QUESERÍAS MUESTREADAS.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ESTRUCTURA DE LA CUAJADA .	5
<b>FIGURA 2.</b> ZONAS DE PRODUCCIÓN DE LOS DIFERENTES QUESOS MEXICANOS ARTESANALES	8
<b>FIGURA 3.</b> PRINCIPALES PROCESOS PARA LA FABRICACIÓN DE VARIOS QUESOS MEXICANOS ELABORADOS CON LECHE CRUDA	9
<b>FIGURA 4.</b> PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO COCIDO	10
<b>FIGURA 5.</b> DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA	24
<b>FIGURA 6.</b> CRECIMIENTO DE LAS BAL EN AGAR COLUMBIA	28
<b>FIGURA 7.</b> SUSPENSIÓN DE LA BACTERIA (A) Y TURBIDEZ DE FLUIDO DE INÓCULO (B)	29
<b>FIGURA 8.</b> MORFOLOGÍA COLONIAL DE LAS BACTERIAS	31
<b>FIGURA 9.</b> DIAGRAMA DE ELABORACIÓN DEL QUESO COCIDO ARTESANAL BASADO EN LA DOCUMENTACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENTES QUESERÍAS EN 2009-2010	33
<b>FIGURA 10.</b> RECEPCIÓN DE LA LECHE EN: (A) QUESERÍA 1, (B) QUESERÍA 2 Y (C) QUESERÍA 3	35
<b>FIGURA 11.</b> FORMACIÓN DE CUAJADA EN: (A) QUESERÍA 1, (B) QUESERÍA 2 Y (C) QUESERÍA 3	37
<b>FIGURA 12.</b> COCCIÓN DE LA CUAJADA EN: (A) QUESERÍA 2, (B) QUESERÍA 3 Y (C) QUESERÍA 4	38
<b>FIGURA 13.</b> FORMACIÓN DE CUAJADA:	44
<b>FIGURA 14.</b> PRESENCIA DE MÉSOFILOS AEROBIOS, HONGOS Y LEVADURAS EN LA LECHE UTILIZADA PARA LA PREPARACIÓN DE QUESO COCIDO DE DIFERENTES QUESERÍAS	49
<b>FIGURA 15.</b> PRESENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN LA DE LECHE UTILIZADA PARA LA PREPARACIÓN DE QUESO COCIDO DE DIFERENTES QUESERÍAS	50
<b>FIGURA 16.</b> CONTEO DE BAL EN LECHE UTILIZADA PARA LA PREPARACIÓN DE QUESO COCIDO DE DIFERENTES QUESERÍAS	52
<b>FIGURA 17.</b> PRESENCIA DE MÉSOFILOS AEROBIOS, HONGOS Y LEVADURAS EN EL DE SUERO OBTENIDO EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COCIDO EN DIFERENTES QUESERÍAS	54

<b>FIGURA 18.</b> PRESENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN EL DE SUERO OBTENIDO EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COCIDO EN DIFERENTES QUESERÍAS. ....	55
<b>FIGURA 19.</b> CONTEO DE BAL EN SUERO OBTENIDO EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COCIDO DE DIFERENTES QUESERÍAS. ....	57
<b>FIGURA 20.</b> PRESENCIA DE MÉSOFILOS AEROBIOS, HONGOS Y LEVADURAS EN LA DE CUAJADA CRUDA OBTENIDA EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COCIDO DE DIFERENTES QUESERÍAS. ....	59
<b>FIGURA 21.</b> PRESENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN EL DE CUAJADA CRUDA OBTENIDA EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COCIDO DE DIFERENTES QUESERÍAS. ....	60
<b>FIGURA 22.</b> CONTEO DE BAL EN CUAJADA CRUDA OBTENIDA EN LA ELABORACIÓN DE QUESO COCIDO EN DIFERENTES QUESERÍAS. ....	62
<b>FIGURA 23.</b> PRESENCIA DE MÉSOFILOS AEROBIOS, HONGOS Y LEVADURAS EN EL QUESO COCIDO ELABORADO DE DIFERENTES QUESERÍAS.....	64
<b>FIGURA 24.</b> PRESENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN EL QUESO COCIDO ELABORADO EN DIFERENTES QUESERÍAS. ....	65
<b>FIGURA 25.</b> CONTEO DE BAL DE QUESO COCIDO ELABORADO EN DIFERENTES QUESERÍAS .....	67

## RESUMEN

En México se conocen por lo menos treinta diferentes tipos de quesos artesanales elaborados a partir de leche cruda, práctica que contraviene lo establecido por la NOM-121-SSA1-1994. El queso Cocido es uno de ellos y se produce en el noroeste de México, particularmente en el estado de Sonora. La microflora nativa de este queso no se ha caracterizado y se sabe que el proceso de elaboración es heterogéneo, lo que genera que en el mercado exista con una gran variabilidad composicional y sensorial de este queso. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue Caracterizar el proceso de producción de queso Cocido artesanal e identificar los grupos de bacterias ácido lácticas involucradas en el desarrollo de sus características. Para alcanzar este objetivo el trabajo fue dividido en tres etapas: (1) se documentó y caracterizó el proceso de elaboración en diferentes queserías de la región con diferentes niveles de tecnificación de su proceso, (2) se aislaron las BAL involucradas en el proceso y (3) se identificó fenotípicamente la microflora aislada. Los resultados encontrados mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la composición físico-química de los quesos y en su calidad sanitaria de acuerdo al nivel tecnológico de las queserías muestreadas. Se aislaron un total de 144 cepas de BAL de los diferentes puntos muestreados. Posteriormente las cepas aisladas fueron inoculadas en leche y por medio de evaluación sensorial por su capacidad de producir aromas típicos a lácteos. De acuerdo a la identificación fenotípica se encontró que los géneros predominantes fueron los Lactobacilli, Lactococci, Streptococci, y Enterococci, sobresaliendo por su abundancia *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *L. lactis ssp. lactis* y *cremoris* con la evaluación sensorial se logró seleccionar a 78 cepas que fueron capaces de producir aroma típicos lácteos. Nuestros resultados evidenciaron que los diferentes niveles de tecnificación en el proceso artesanal para la elaboración del queso Cocido, genera que los quesos obtenidos sean muy variables en su composición y calidad sanitaria. Sin embargo, a pesar de esto las BAL encontradas son coincidentes independientemente de las condiciones de las queserías.

# 1. INTRODUCCIÓN

En México se empezó a elaborar el queso desde los tiempos de La Colonia, cuando los españoles introdujeron al continente una gran variedad de especies animales productoras de leche. Desde entonces, la producción y consumo de quesos ha ido en aumento, de tal manera que en la actualidad existe en el mercado una gran variedad de quesos genuinos, los cuales son elaborados con leche cruda o pasteurizada por la pequeña y mediana industria, utilizando métodos artesanales y recetas propias que proveen a este alimento de características particulares y distintivas de cada región. Sin embargo, la heterogeneidad en los procesos artesanales de producción origina que estos tipos de quesos presenten una gran diversidad en su composición y una gran variabilidad en sus propiedades sensoriales.

Uno de los quesos artesanales que cuenta con gran aceptación entre los consumidores del noreste de México es el queso Cocido. Éste queso es considerado un queso fresco, de cuajada semidura-blanda, y de textura lisa. Es elaborado tradicionalmente de forma artesanal con leche cruda de vaca, lo que trae consigo dos desventajas. La primera es que, no cumple con los requisitos señalados en la Norma Oficial Mexicana (NOM-121-SSA1-1994), la cual establece que a excepción de los quesos añejados, todos los quesos deben ser elaborados con leche pasteurizada. Debido a esto, la calidad sanitaria del queso Cocido está generalmente comprometida. La segunda, es que al ser un queso elaborado con practicas artesanales, la calidad sensorial del mismo es muy variable, y depende de un gran número de factores relacionados entre sí, que incluyen tanto las características físico-químicas y microbiológicas de la materia prima, como las diferentes etapas de elaboración en el proceso de elaboración. En este sentido,

hasta el día de hoy, no se encuentra reportado en la literatura ningún estudio referente a la caracterización de estos factores.

Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue caracterizar el proceso de producción de queso Cocido artesanal e identificar los grupos de bacterias ácido lácticas involucradas en el desarrollo de sus características.

## 2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### 2.1 Quesos y su forma de elaboración

El queso es un alimento muy apreciado debido a sus cualidades nutritivas y sensoriales; ha sido elaborado desde hace siglos a partir de leche de cabra, oveja, vaca y otros rumiantes (Villegas de Gante, 2008). Se puede definir como un producto fermentado o no, obtenido por coagulación de la leche, la cual se obtiene en forma de gel más o menos deshidratado. Este gel contiene casi toda la materia grasa y una fracción variable de sustancias minerales (Veisseyre, 1988).

Debido a la gran variedad de quesos que existen y al gran número de características a considerar, no hay un esquema de clasificación unánime aceptado a nivel internacional para todos ellos (Gallardo *et al.*, 2009). Las clasificaciones toman como base diversas características y propiedades, tales como su contenido de grasa, el tipo de pasta, su consistencia de la pasta, el grado de maduración, el tipo de leche utilizada hasta su forma de elaboración (Dubach, 1998).

En el proceso de elaboración del queso existen tres fases esenciales: la coagulación de la leche, el desuerado y la maduración. Durante éstas, la masa del queso experimenta fenómenos bioquímicos complejos que se traducen en nuevos atributos sensoriales del producto, por ejemplo color, sabor, aroma y textura (Lucey *et al.*, 2003).

### 2.1.1 Coagulación de la leche

La coagulación de la leche consiste en la desestabilización o desnaturalización de las proteínas de la leche (Walstra *et al.*, 1999). El contenido total de proteínas se encuentra entre 2.8 y 3.5%, correspondiendo alrededor de 80% las caseínas. Entre éstas, las más importantes son las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ . Las caseínas se asocian en estructuras quasi-esféricas, y éstas se agregan por medio de un material formado por fosfato-cálcico, dando origen a las llamadas micelas de caseínas. Estas micelas forman la fase coloidal proteica de la leche que es necesario perturbar para elaborar el queso (Gallardo *et al.*, 2009). Para llevar a cabo la coagulación de la leche se emplean básicamente dos métodos. El enzimático, o por acidificación (Baduí, 1999).

La coagulación ácida ocurre por la acumulación de ácidos orgánicos tales como el ácido láctico, acético y cítrico, producidos durante la fermentación de la leche por la acción de distintos microorganismos (Hernández *et al.*, 2003). Al haber una mayor concentración de dichos ácidos, se produce una desmineralización gradual y una pérdida de la estructura de las micelas de caseínas, al migrar el calcio y los fosfatos hacia el plasma (fase acuosa) por acción de los iones hidrógeno ( $H^+$ ), que son proporcionados por el ácido. De esta manera, a medida que va descendiendo el pH desde 6.8 (pH normal de la leche) a 5.0, la estructura micelar se desintegra progresivamente (Gallardo, *et al.*, 2009).

Por otra parte la coagulación enzimática se realiza por la adición de un conjunto de enzimas proteolíticas, principalmente quimosina y pepsina. A este conjunto de enzimas, se le denomina cuajo común o renina, y es extraído del estómago de los terneros (Walstra *et al.*, 1999). Las enzimas actúan cuando las condiciones de la leche (sustrato) son adecuadas, éstas atacan a la  $\kappa$ -caseína, que junto con las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$  forman la micela. La  $\kappa$ -caseína precipita en presencia del ión  $Ca^{++}$ , iniciándose así la formación de una red o malla tridimensional de fosfo-caseinato que es el principio de la cuajada (Gallardo *et al.*, 2009).



La red de fosfo-caseinatos de calcio, desde su formación, experimenta una contracción gradual (sinéresis) que expulsa una gran porción de la fase acuosa de la leche original en forma de suero; éste contiene la mayor cantidad de lactosa, proteínas séricas, minerales, así como microorganismos (Walstra *et al.*, 1999). Asimismo, como se puede observar en la Figura 1, el gel formado atrapa la mayor parte de la materia grasa (más del 80%), cierta proporción de suero, sustancias solubles y microorganismos (Gallardo *et al.*, 2009). Algunos factores que afectan la coagulación enzimática son la temperatura, el pH y los contenidos de calcio y fosfatos de la leche (Farkye, 2004).

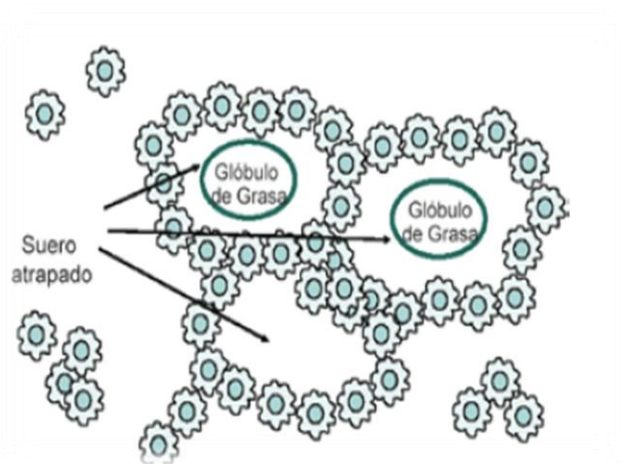


Figura 1. Estructura de la cuajada (Gallardo *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Desuerado

En esta etapa, se lleva a cabo la deshidratación parcial del gel por sinéresis debido a la contracción de las micelas y grasa de la leche. Cuando la leche se ha coagulado, se debe de cortar el coágulo en porciones muy pequeñas y homogéneas denominadas “granos de cuajada”, esto va a depender del tipo de queso que se este elaborando. El corte de la cuajada se debe hacer en forma vertical y luego en forma

horizontal hasta que la cuajada queda convertida en cubos pequeños, este procedimiento ayuda a eliminar el suero (Hernández *et al.*, 2003).

### **2.1.3 Maduración o afinado de la cuajada**

La maduración del queso es un fenómeno muy complejo que involucra una degradación de los componentes de la cuajada. Entre los mecanismos bioquímicos más importantes que se presentan en el queso durante este proceso están la glicólisis, lipólisis y la proteólisis (Hernández *et al.*, 2003); y los agentes responsables son los enzimas procedentes de:

**La leche:** Contiene proteasas y lipasas, así como otros sistemas enzimáticos. Su papel en la maduración es limitado, ya que su concentración es baja y en algunos casos son termosensibles y presentan un pH óptimo de actividad alejado del pH de la cuajada (Ballesteros, *et al.*, 2006).

**El cuajo o agente coagulante:** El cuajo es un enzima proteolítica que no sólo interviene en la formación del coágulo, sino también en su evolución posterior. Su participación dependerá de la tecnología de elaboración de cada variedad, según las diferentes variedades de cuajo utilizadas y retenidas en la cuajada (Goulsworthy *et al.*, 1996).

**La flora microbiana:** Los microorganismos intervienen en la maduración liberando a la cuajada sus enzimas exógenas y, tras su lisis o ruptura, mediante sus enzimas endógenas. La cuajada contendrá microorganismos procedentes de la leche, si se parte de la leche cruda, de los fermentos adicionados y otros que se desarrollen en la superficie y el interior. La flora microbiana se encuentra en constante evolución, presentándose distintos grupos microbianos a lo largo de la

maduración del queso. La población microbiana de un queso es extremadamente densa, sobrepasando a menudo los  $10^9$  microorganismos por gramo. El período de maduración puede comprender desde una o dos semanas hasta más de un año. Los quesos blandos, con un alto contenido en agua, sufren períodos cortos de maduración. Las condiciones física y químicas influirán sobre la actividad microbiana y enzimática, de la que depende esencialmente la maduración del queso (Sánchez-Ponte, 2003).

Dentro de los quesos madurados se encuentra el queso Cotija, Roquefort, Parmesano y Camembert. Cabe señalar que algunos quesos están listos para su consumo inmediatamente después de su fabricación, por lo que no requieren un periodo de maduración. Un ejemplo de quesos no madurados es el queso Fresco, su elaboración termina con el desuerado y es consumido solamente salado o sazonado con especias (Baduí, 1999).

## 2.2 Quesos mexicanos

En México se conocen al menos treinta tipos de quesos diferentes, algunos son producidos con leche pasteurizada, pero la mayoría son elaborados con leche cruda, se manufacturan por la pequeña o mediana industria bajo métodos artesanales, rústicos y carentes de control de calidad (Villegas de Gante, 2004). Es por ello que el producto final muestra una heterogeneidad composicional, sensorial y una limitada conservación. A pesar de estas desventajas en México, la población en general muestra cierta preferencia por el consumo de quesos artesanales elaborados a partir de leche cruda (Torres Llanez, 2002), como lo muestra la Figura 2. Los quesos de mayor circulación comercial son: queso Fresco, Chihuahua, Oaxaca y panela (Villegas de Gante, 1993).



Figura 2. Zonas de producción de los diferentes quesos mexicanos artesanales (Villegas de Gante, 2004).

Los quesos mexicanos artesanales son elaborados con leche de vaca o de cabra y algunos aditivos permitidos por las normas vigentes tales como cuajo, colorante de achiote, cloruro de calcio y sal común. Se fabrican por todo el territorio nacional y poseen una larga tradición que se remonta a décadas o hasta siglos. Muchos de estos productos han nacido regionalmente, y siguen siendo productos locales, otros se han difundido en el país y poco en el extranjero. Son productos que expresan la diversidad geográfica y cultural del país (Cervantes *et al.*, 2008). En la Figura 3 se presentan los principales procesos de elaboración de la mayoría de los quesos mexicanos artesanales.

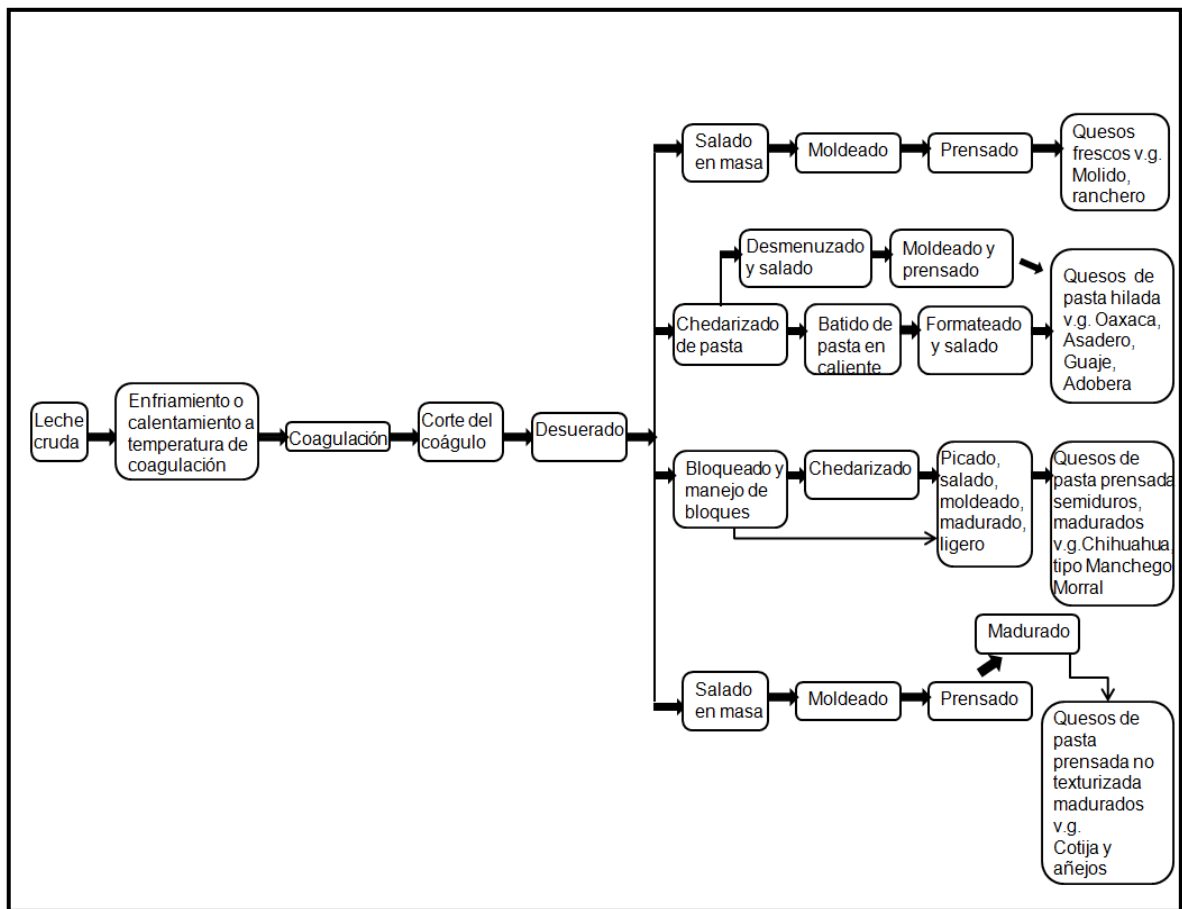


Figura 3. Principales procesos para la fabricación de varios quesos mexicanos elaborados con leche cruda (Villegas de Gante, 2004).

Una de las principales problemáticas que presentan los quesos mexicanos artesanales, es la falta de estandarización en las etapas de procesamiento, las cuales pueden diferir de un productor a otro, debido a la calidad de la leche, las condiciones ambientales (v.g., temperatura), la habilidad de trabajadores, los equipos e instalaciones de proceso, y a que no presentan un control sanitario y normativo adecuado. Este es el caso del queso Cocido artesanal elaborado en el Noroeste del país.

### 2.3 Queso Cocido

El queso Cocido es un queso de pasta filata y de acuerdo a su grado de maduración el queso Cocido es considerado un queso fresco. Se encuentra comercialmente en diferentes presentaciones: bola, en bloques, o como discos aplanados. Es elaborado tradicionalmente con leche cruda de vaca y presenta un cuajado ácido-enzimático prolongado a temperatura ambiente. La pasta es blanda, blanca o ligeramente amarilla de acuerdo al contenido de grasa (Cervantes *et al.*, 2008). El sabor ácido y proceso de cocción de la pasta (temperaturas superiores a 60 °C), le proporcionan características únicas que lo distingue de los demás quesos.

Este queso se produce principalmente en el Estado de Sonora, tanto en forma artesanal como en pequeñas y medianas industrias; (Villegas de Gante, 2004). El proceso artesanal de elaboración de este queso involucra diferentes etapas de importancia para la obtención de las características finales de este producto. En la Figura 4 se muestran los pasos generales para elaborar queso cocido con leche cruda.

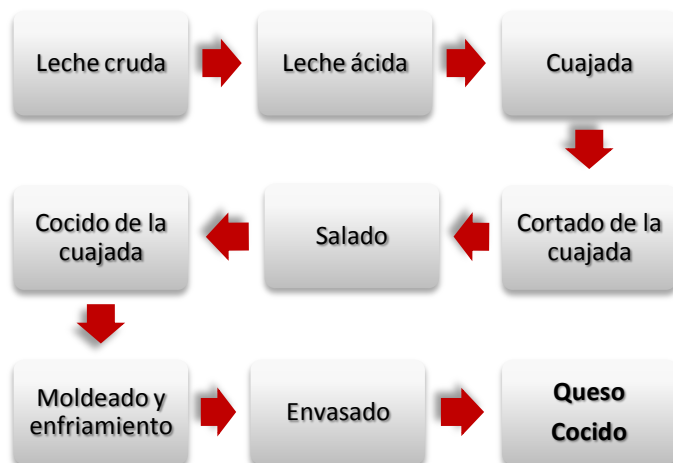


Figura 4. Proceso de elaboración del queso Cocido (Villegas de Gante, 2004).

Un punto importante en el proceso de elaboración de este queso es la acidificación de la leche cruda, la cual puede ser por adición de suero fermentado (24- a 48 hrs a temperatura ambiente). La fermentación subsecuente ocurre de forma natural, gracias a las bacterias ácido lácticas propias del suero fermentado usado para la acidificación. Éstas confieren al producto propiedades sensoriales de sabor únicas, dando a este queso un gran potencial comercial (Villegas de Gante, 1993).

Como se mencionó anteriormente, la problemática general que presentan los quesos mexicanos artesanales es la heterogeneidad de la composición de la leche empleada, las variaciones en los métodos de elaboración y la falta de normas técnicas de referencia, hacen que este queso en particular no presente una composición determinada, aunque sí parecida entre ejemplares. De igual forma, la calidad sanitaria y sensorial del producto, también varía en función de la forma de elaboración (Villegas de Gante, 2004).

#### 2.4 Microbiología del queso

La leche cruda puede considerarse un producto vivo, ya que contiene un gran número de microorganismos por mililitro, esto es a lo que se le denomina carga microbiana. Los microorganismos que están presentes en la leche y sus derivados (leches fermentadas, quesos, cremas) están involucrados en su conservación, así como en la impartición de características sensoriales deseables y no deseables (Villegas de Gante, 2004).

La microflora de la leche cruda está compuesta por diferentes microorganismos mesófilos, psicrófilos y termófilos. El grupo de las bacterias mesófilas es el que se encuentra con mayor frecuencia en la leche, conformado principalmente por las bacterias lácticas. (Adams y Moss, 2000). La microflora inicial del queso no es la

misma de la leche que llega a las queserías, ésta es modificada por diversas acciones. Generalmente se incrementa en el número y tipos de microorganismos por los procedimientos, artesanales o industriales, los equipos utilizados y las manipulaciones que se hagan con la leche y los procesos de fabricación (Remes, 1998).

La leche cruda cuenta con bacterias patógenas potencialmente peligrosas para la salud humana (Cremonesi y col., 2009). Para disminuir posibles riesgos, la norma oficial mexicana NOM-243-SSA1-2005, establece que la leche para elaboración de productos lácteos, deberá ser sometida a tratamientos térmicos, que garanticen su inocuidad.

#### **2.4.1 Microorganismos patógenos**

Los microorganismos patógenos de mayor importancia en la industria quesera en México y América Latina son *Campylobacter sp*, *Salmonella sp*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Así como los microorganismos termodúricos como *Bacillus lichinoformis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* (Torres-Llañez, 2002).

En México, de acuerdo a la Secretaría de Salud en 1994, los microorganismos que definen la calidad de los quesos son coliformes totales y fecales, *Staphylococcus aureus*, hongos y levaduras, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Estos microorganismos son los principales causantes de brotes de enfermedades en México relacionados con la leche y el consumo de queso sin pasteurizar (Moreno, 2007). En el caso del queso Fresco, que es de alto consumo en el estado de Sonora, este ha presentado una incidencia de *L. monocytogenes* del 4.0% en el 2000, incrementándose a un 9.9% en 2001. Hasta el momento se desconoce el



punto exacto donde se llevó a cabo su contaminación, lo cual implica un riesgo para la aparición de brotes de listeriosis en el Estado (Moreno, 2007).

Otro producto de alto consumo en el estado de Sonora es el queso Cocido, su elaboración está sujeta a un control de calidad empírico y no cumple con los requisitos señalados en la Norma Oficial Mexicana (NOM-121-SSA1-1994). Sin embargo, no se conoce o por lo menos no se tiene registrado brotes de enfermedades relacionadas por consumo de este producto.

#### **2.4.2 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son un grupo de bacterias Gram-positivas. Estos microorganismos fermentan lactosa e incrementan el contenido de ácido láctico. Tienen en común características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Los géneros de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* se utilizan tradicionalmente como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos como el yogur y distintas variedades de queso y bebidas (Vuyst *et al.*, 1994).

Las BAL son consideradas como benéficas, ya que permiten el desarrollo de sabor, aroma y textura, características sensoriales presentes en diversos productos lácteos como lo son el queso, yogur y leches fermentadas entre otros. Estas propiedades son muy importantes para la industria láctea, ya que permiten elaborar productos con mejores características y de mayor agrado a los consumidores (Marino *et al.* 2003).

#### 2.4.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas

Una clasificación muy útil de las BAL, considera ciertos criterios de agrupamiento, como morfología, temperatura de crecimiento y la naturaleza de la fermentación (Villegas de Gante, 2004).

Según su morfología se clasifican en cocos y bacilos y, de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento, se clasifican en mesófilas (20-30°C) y termófilas (35-45°C). Estas comprenden varios géneros como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Walstra *et al.*, 1999).

De acuerdo a la naturaleza de la fermentación pueden ser homolácticas o heterolácticas. Las homolácticas u homofermentativas, degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato (Cabeza, 2008). Dentro de este grupo se encuentran, las bacterias mesófilas *L. casei*, *L. plantarum*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. diacetilactis* y las bacterias termófilas *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* (Villegas de Gante, 2004). Las heterolácticas o heterofermentativas degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub>, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético (Cabeza, 2008). En este grupo se encuentran, las bacterias mesófilas *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *L. brevis* (Villegas de Gante, 2004).

#### 2.4.2.2 Características de las bacterias ácido lácticas.

Las BAL forman una familia muy heterogénea, cuyo hábitat común es la leche y se caracterizan por lo siguiente: son Gram-positivas, no esporuladas, microaerófilas o anaerobias facultativas. También se caracterizan por tener diferentes propiedades: no reducen nitratos ni producen catalasa, presentan poca

actividad proteolítica (Bedolla-Bernal, 2004). En la Tabla 1 se resumen las características importantes de algunas BAL.

En términos generales, las BAL tienen necesidades nutrimentales complejas, por lo que requieren de ciertos factores de crecimiento, tales como: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones por las que abundan en un medio rico nutricionalmente como la leche. Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia a valores bajos de pH ( $\text{pH} \leq 5$ ), sin embargo, conforme decrece el valor de pH, un mayor número de especies resultan inhibidas (Cabeza, 2008).

Tabla 1. Características importantes de algunas bacterias ácido lácticas.

Propiedad	<i>Lactococcus lactis ssp.</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	
	<i>lactis</i>	<i>cremoris</i>		<i>helveticus</i>	<i>acidophilus</i>
<b>Temperatura de cremiento (°C)</b>					
Mínima	8 - 10	8 - 10	20	20 - 22	20 - 22
Óptima	28 - 32	22	40	42	37
Máxima	40	37 - 39	50	54	45 - 48
<b>Homofermentativa</b>	+	+	+	+	-
<b>Heterofermentativa</b>	-	-	-	-	+
<b>Producción de ácido láctico</b>					
% en leche	0.9	0.9	0.9	2.5	1
<b>Formación de CO<sub>2</sub></b>	-	-	-	-	+

Fuente: Walstra *et al.* (1999)

Para la tecnología quesera existen cerca de una decena de especies de BAL importantes. Éstas difieren entre sí de acuerdo a: el tipo de fermentación láctica que desarrollan, los azúcares que fermentan, el grado de acidez que alcanzan, la temperatura óptima para su crecimiento, la capacidad que tienen para sobrevivir el tratamiento de pasteurización, la función que tienen como cultivo láctico y el comportamiento frente a los distintos niveles de sal (Bylund, 2003).

## 2.5. Bacterias ácido lácticas formadoras de compuestos responsables de sabor y aroma

Los componentes específicos del sabor y aroma de un queso son muy difíciles de distinguir. Éstos se hallan en una mezcla equilibrada y compleja, difícil de reproducir artificialmente. El número de compuestos definidos formados durante el proceso de maduración, que se han logrado identificar en algunos quesos es enorme. Un ejemplo de esto es el queso Cheddar, del cual se han identificado más de 180 compuestos diferentes (Villegas de Gante, 2004).

El sabor en quesos frescos es el resultado de la acción de las bacterias. Las bacterias ácido lácticas convierten lactosa a ácido láctico y esto con la producción de diacetil y posiblemente acetaldehído. En los quesos madurados el sabor se da por las interacciones entre bacterias iniciadoras, enzimas de la leche, del cuajo y lipasas acompañantes y de la microflora secundaria. Se ha reportado que los quesos elaborados a partir de leche cruda presentan mejor calidad en el sabor y aroma, que los quesos elaborados con leche pasteurizada (Beuvier y col., 1997).

El aroma de los productos lácteos fermentados es determinado principalmente por una combinación única de compuestos orgánicos volátiles. El aroma en el queso está constituido por compuestos volátiles como son ésteres, alcoholes, aldehídos,

cetonas, sulfuros y ácidos grasos libres. Mientras que el gusto, está formado por los compuestos no volátiles principalmente por péptidos, aminoácidos libres, sales, lactosa y ácidos orgánicos (Molina, *et al.*, 1999).

El sabor y aroma típicos en los productos lácteos fermentados es el resultado de la transformación enzimática de los principales componentes de la leche como la caseína, grasa, lactosa y citrato a componentes volátiles. (Gutiérrez, 2008). Ejemplos de algunos componentes volátiles generadores de sabor y aroma son dimetilsulfuro, 3-metilbutanal, metional, diacetilo, ácido propiónico, ácido butírico, ácido acético y butanona (Smit y col., 2005).

*Lactococcus lactis* es una de las bacterias lácticas más utilizadas en la producción de queso y otros productos fermentados. Tiene un sistema proteolítico complejo que junto con otras enzimas convierten a la caseína en péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos son los principales precursores de compuestos volátiles, que son metabolizados a aldehídos, cetonas, aminas y alcoholes (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2007).

## 2.6. Cultivos lácticos iniciadores

En procesos industrializados de elaboración de quesos, la leche empleada es pasteurizada, después ciertas BAL son inoculadas con el fin de producir una fermentación controlada que lleve a la obtención de productos de alta calidad sensorial. Estas bacterias constituyen los cultivos lácticos indispensables en la elaboración de quesos estandarizados (Villegas de Gante, 2004).

Un cultivo iniciador puede estar constituido por uno o más tipos de cepas de BAL que se adicionan a la leche para fermentarla (Walstra *et al.* 1999). Se adiciona al queso en proporciones definidas para provocar la disminución del pH. La acidez del medio promueve la sinéresis de la cuajada, además ayuda al drenado del suero para darle textura y cuerpo al queso (Olvera, 1999). La elección del cultivo iniciador dependerá de la variedad del queso a elaborar (Scott, 1998).

Las principales BAL usadas en cultivos lácticos para desarrollar sabores y aromas en productos lácteos fermentados son: *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp.cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y otras bacterias como *Propionibacterium casei*.

Como se mencionó anteriormente, dentro de las principales funciones de los cultivos iniciadores es la fermentación de la lactosa, la cual es importante durante la coagulación y textura de la cuajada. Por otro lado, algunas enzimas de estos cultivos, como son las proteasas y lipasas, las cuales ayudan en la maduración de algunos quesos y también ayudan en la producción de gas y en la producción de los compuestos de sabor y aroma (Robinson, 1996).

La industria emplea cultivos iniciadores comerciales en la elaboración de productos lácteos, debido a la necesidad de estandarizar procesos de producción de quesos y de otros productos lácteos fermentados y tener así un control de calidad y sanitario adecuado. Sin embargo, estos cultivos no pueden igualar el sabor y aroma de productos lácteos artesanales, elaborados con leche cruda (Gutiérrez, 2008). Debido a esto, la industria tiene interés por nuevos cultivos lácticos que pueden ser específicamente seleccionados de entre un gran número de productos lácteos artesanales como son los quesos (Ramírez y col. 2005).

En diversos estudios se ha propuesto el uso de cepas aisladas de productos artesanales para emplearlas como cultivos iniciadores, por su habilidad de producir sabor y aroma diferentes a los del cultivo industrial (Cabezas y col. 2007). La biodiversidad natural de estas cepas ofrece nuevas posibilidades de investigación, para el desarrollo de cultivos iniciadores de gran interés para la industria láctea (Ayad y col. 2004).

Debido a esto, en los últimos años se han aislado, identificado y caracterizado BAL de ciertos quesos artesanales de diferentes países, esto, con el propósito de crear cultivos lácticos para proteger el sabor único característico de los mismos. Por ejemplo: el Azul de cabra (España), queso blanco en escabeche (Turquía), Zlata (Serbia), Comté (Francia), Montasio (Italia) y queso Fresco (México) entre otros (Alegría y col., 2009; Dagdemir y Ozdemir, 2008; Veljovic y col., 2007; Bouton y col., 1998; Marino y col., 2003 ;Torres Llanez y col., 2006).



### **3. JUSTIFICACIÓN**

El queso Cocido en Sonora convencionalmente se prepara a partir de leche cruda, por lo que no cumple con los requisitos señalados por la norma oficial mexicana (NOM-121-SSA1-1994). Adicionalmente, el proceso de elaboración típicamente consiste en diferentes etapas de procesamiento no estandarizadas, que pueden diferir de un productor a otro. Estos factores contribuyen no sólo a que exista una amplia variabilidad en la composición y calidad sensorial de los quesos en el mercado, sino que además no garantiza productos libres de microorganismos patógenos. Estas desventajas ponen en evidencia la falta de estudios que permitan la caracterización de la microflora nativa y el proceso de fabricación de este tipo de queso, lo que favorecería la preparación de un producto final con una identificación precisa y con claras similitudes en apariencia y otros atributos sensoriales, pero principalmente en los requisitos básicos de microbiología.

## **4. HIPÓTESIS**

La adecuada estandarización del proceso de producción de queso Cocido, aunado a la apropiada selección de las bacterias ácido lácticas involucradas podría contribuir a la producción de queso Cocido con características similares a las del queso elaborado por forma artesanal.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Caracterizar el proceso de producción de queso Cocido artesanal e identificar los grupos de bacterias ácido lácticas involucradas en el desarrollo de sus características.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar y documentar el proceso de producción de queso Cocido artesanal.
2. Determinar la composición fisicoquímica y calidad sanitaria de las materias primas involucradas en el proceso artesanal del queso Cocido.
3. Aislar y caracterizar fenotípicamente las bacterias ácido lácticas presentes en las diferentes etapas de elaboración del queso Cocido artesanal.
4. Seleccionar sensorialmente a las bacterias ácido lácticas capaces de generar aromas típicos lácteos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo esta investigación, el trabajo experimental se dividió en tres etapas, las cuales se muestran en la Figura 5:

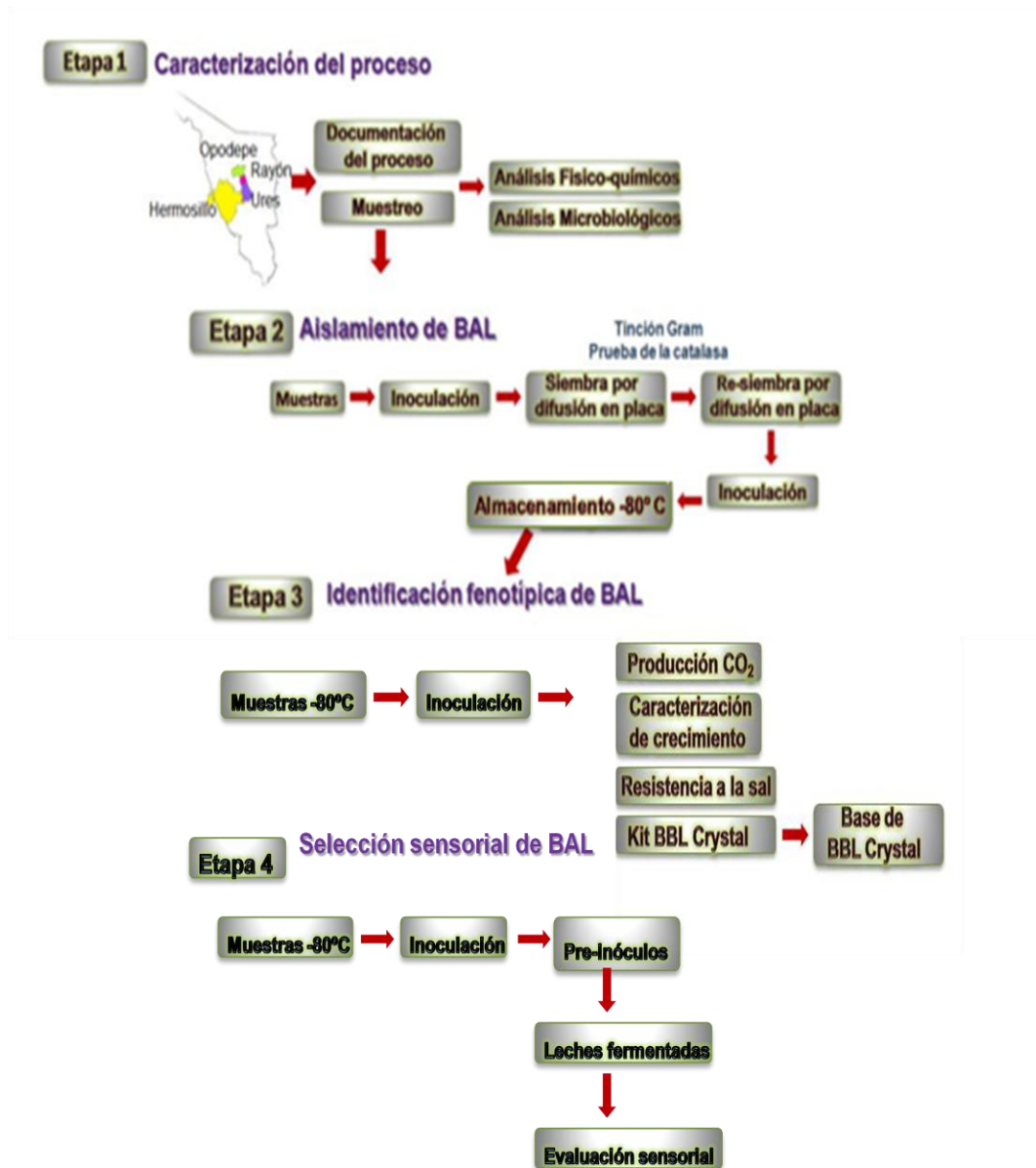


Figura 5. Diagrama general de la metodología empleada

## 6.1 Caracterización del proceso

Se documentó el proceso de elaboración del queso Cocido de cuatro queserías con diferentes niveles tecnológicos en regiones representativas de producción en el estado de Sonora: Hermosillo, Opodepe, Rayón y Ures. Para ello, se realizaron tres muestreos en cada una de las queserías, tomando por duplicado muestras de leche, suero, cuajada y queso, a las cuales se les realizaron determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas. También se registró la temperatura y el pH en las distintas etapas de elaboración del queso Cocido, así como el volumen de leche, suero fermentado para la acidificación, y cuajo utilizados en el proceso.

### **6.1.1 Análisis Fisicoquímicos**

Para la caracterización fisicoquímica de cada una de las muestras se realizaron los siguientes análisis por triplicado: proteína total (método Kjeldahl), grasa total (método Babcock), humedad, ceniza, acidez y pH, de acuerdo a la metodología establecida por la AOAC (2002).

### **6.1.2 Análisis Microbiológicos**

El procedimiento general del análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la metodología establecida en la NOM-121-SSA1-1994 para quesos, y la NOM-155-SCF1-2003 para leche. La determinación de coliformes totales y fecales se llevó a cabo mediante la técnica del número más probable (NMP). Inoculando en caldo lauril sulfato con tubos Durham incubados a 35°C por 48 h; posteriormente, de los tubos

positivos en los que se presentó crecimiento y producción de gas, se resembraron en caldo bilis verde brillante (2%) y caldo EC-mug, y fueron incubados a 35 °C y a 44.5 °C, respectivamente, por 48 h. El conteo de mesófilos aerobios se determinó en agar para conteo en placa (PCA, Difco™), incubado a 37°C por 48 h. Los hongos y levaduras, se determinaron por vaciado en placa en agar papa dextrosa (PDA, Difco™) acidificado con ácido tartárico al 10%, e incubados a 25°C por 5 días. La cuantificación de las bacterias ácido lácticas se realizó empleando la metodología propuesta por Marino y col. (2003), y por Dagdemir y Ozdemir (2008). Para ello, 10 g o mL de las muestras (leche, suero, cuajada y queso) se diluyeron y homogenizaron individualmente en 90 mL de una solución peptonada (1%). Se prepararon diluciones seriadas en la misma solución, y determinadas alícuotas fueron sembradas por vaciado en placa y/o difusión en su respectivo medio de cultivo específico. Así, los *Lactobacillus* fueron cuantificados en agar MRS (Difco™) incubando a 37°C por 48 h, en una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub>. Para la cuantificación de *Lactococcus* y *Streptococcus* se utilizó agar M17 (Difco™) enriquecido con lactosa (5%), incubando a 30°C y 42°C, respectivamente por 48 h.

## 6.2 Aislado de las BAL

Para llevar a cabo el aislamiento de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, se tomó una asada de aproximadamente 20 µl muestras de leche, suero, cuajada y queso; se inocularon en tubos con caldo MRS, y M17 (enriquecido con lactosa al 5 %), y se incubaron a 37 °C, 30 °C y 42 °C, respectivamente, durante 24 h (Marino y col. 2003; Dagdemir y Ozdemir 2008; Duan y col. 2008). Una vez transcurrido el periodo de incubación, se realizó una resiembra por el método de estriado en placa en sus respectivos medios y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C, 30 y 42 °C, respectivamente por 48 h. Cada una de las resiembras se realizó por duplicado. De cada placa se tomó una colonia y se analizó mediante tinción de Gram, y los ensayos de actividad de catalasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%), y

oxidasa por el método indirecto utilizando el reactivo de Kovacs (ver ANEXOS). Las colonias que fueron Gram (+), catalasa y oxidasa (-) fueron purificadas dos veces por cultivos subsecuentes en placas de agar MRS, y M17 bajo las condiciones de incubación establecidas anteriormente (Marino y col. 2003; Dagdemir y Ozdemir 2008; Duan y col. 2008).

Después de 24 h de incubación, se tomó una asada de cada tubo con crecimiento y se realizó una siembra por el método de estriado en placa en agar MRS (Difco) incubadas en condiciones de anaerobiosis a 37 °C para *Lactobacillus* y M17 (Difco) con 5% de lactosa para *Lactococcus* y *Streptococcus* a 30 y 42 °C respectivamente por 48 h. Cada una de las siembras se realizó por duplicado.

Se tomaron en promedio cinco colonias elegidas al azar de las placas específicas para bacterias ácido lácticas, las cuales se inocubaron en los caldo M17 a 30 y 42°C (enriquecido con Lactosa al 5%) y MRS a 37°C por 24 h (Marino, *et al.*, 2003).

Finalmente, de cada placa se seleccionaron cinco colonias al azar y se almacenaron a -80 °C en glicerol al 80% (v/v) en su apropiado medio de cultivo líquido para su posterior caracterización bioquímica (Marino, *et al.*, 2003).

## 6.2 Identificación fenotípica de las BAL

Las cepas aisladas se identificaron por medio de sus características bioquímicas utilizando el kit de identificación comercial BBL CRYSTAL™ GP (Beckton-Dickinson Microbiology Systems), para bacterias Gram-positivas (*Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*) y el kit BBL CRYSTAL™ ANR, para

bacterias anaerobias (*Lactobacillus*). El kit BBL CRYSTAL contiene 30 pocillos para las reacciones, de los cuales 29 son sustratos deshidratados y un control fluorescente (Torrez-Llanez, 2006).

De acuerdo a las indicaciones del proveedor provistas en el kit, cultivos puros de no más de 24 h fueron sembrados en placas de agar Columbia adicionadas con 5% de sangre de carnero (Difco™). Después del tiempo de incubación, se seleccionaron pequeñas colonias de color blanco o grisáceo (Figura 6) con un cotonete estéril.

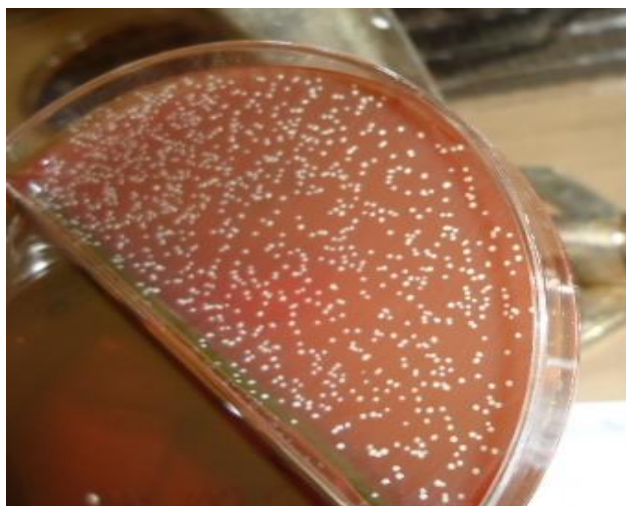


Figura 6. Crecimiento de las BAL en agar Columbia.

Las colonias seleccionadas se suspendieron en fluido de inóculo del kit BBL Crystal (Figura 7a) y se agitaron en un vórtex por 10 a 15 s. La turbidez del fluido se ajustó a un patrón de MacFarland No. 4, como lo muestra la Figura 7b. Los pozos en la base del kit se rellenaron con el fluido de inóculo, y se dejó incubar a 37 °C por 4 h para los dos sistemas BBL Crystal.



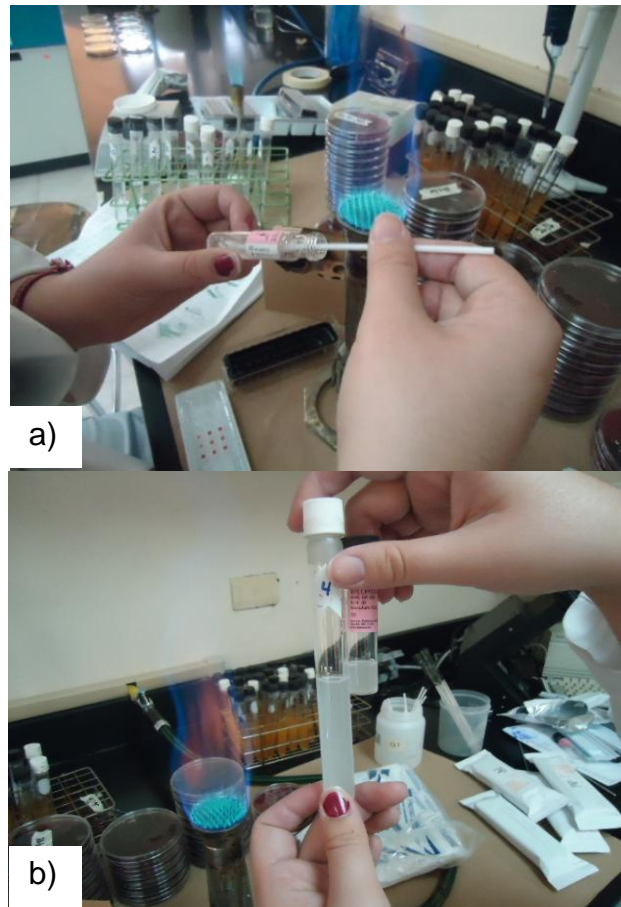


Figura 7. Suspensión de la bacteria (a) y turbidez de fluido de inóculo (b).

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se examinaron los pocillos en el visor BBL cristal. Para determinar los cambios de color se usó la luz blanca del visor y para la presencia de fluorescencia se utilizó la luz UV en la caja de iluminación del panel. Un pocillo con substrato fluorescente se consideró positivo únicamente si la intensidad de la fluorescencia observada en el pocillo es mayor que la del pocillo de control negativo. La serie de colores que resultó de las 29 reacciones se convirtió en un número de perfil de diez dígitos, este se comparó con el software de códigos del sistema BBL Crystal para su identificación (Torres-Llenez, 2006).

Adicionalmente, a las bacterias aisladas se les realizaron las pruebas bioquímicas de indol, producción de CO<sub>2</sub>, crecimiento a diferentes pH y resistencia a varias concentraciones de sal (Dagdemiir y Ozdemiir, 2008; Duan y col., 2008).

**Prueba del indol.** Se inocularon las cepas aisladas en caldo de triptófano a 37 °C por 24 h. Después de este tiempo se le adicionaron cinco gotas del reactivo de Kovacs. Los resultados positivos se denotan por la presencia de un anillo color rojo o rojo-violeta en la superficie de la capa de alcohol en el cultivo. Un resultado negativo se muestra amarillo.

**Producción de CO<sub>2</sub>.** Para determinar la producción de CO<sub>2</sub>, se emplearon los caldos de MRS y M17 a pH 6.5 utilizando tubos Durham invertidos, incubados a 30, 37 y 42°C por 24 h.

**Crecimiento a diferentes pH.** Las cepas aisladas se inocularon al 1% en caldos MRS y M17 a pH de 2.5, 3.5, 4.5 y 6.5 por 24 h a 30, 37 y 42°C

**Resistencia a la sal.** Las cepas aisladas fueron inoculadas en caldo MRS y M17 a pH de 6.5 adicionados con diferentes concentraciones de NaCl (3 y 6% p/v), y fueron incubados durante 24 h.

La morfología colonial fue caracterizada de acuerdo al tipo de superficie, forma, borde y el color de cada una de las cepas aisladas como lo muestra la Figura 8.

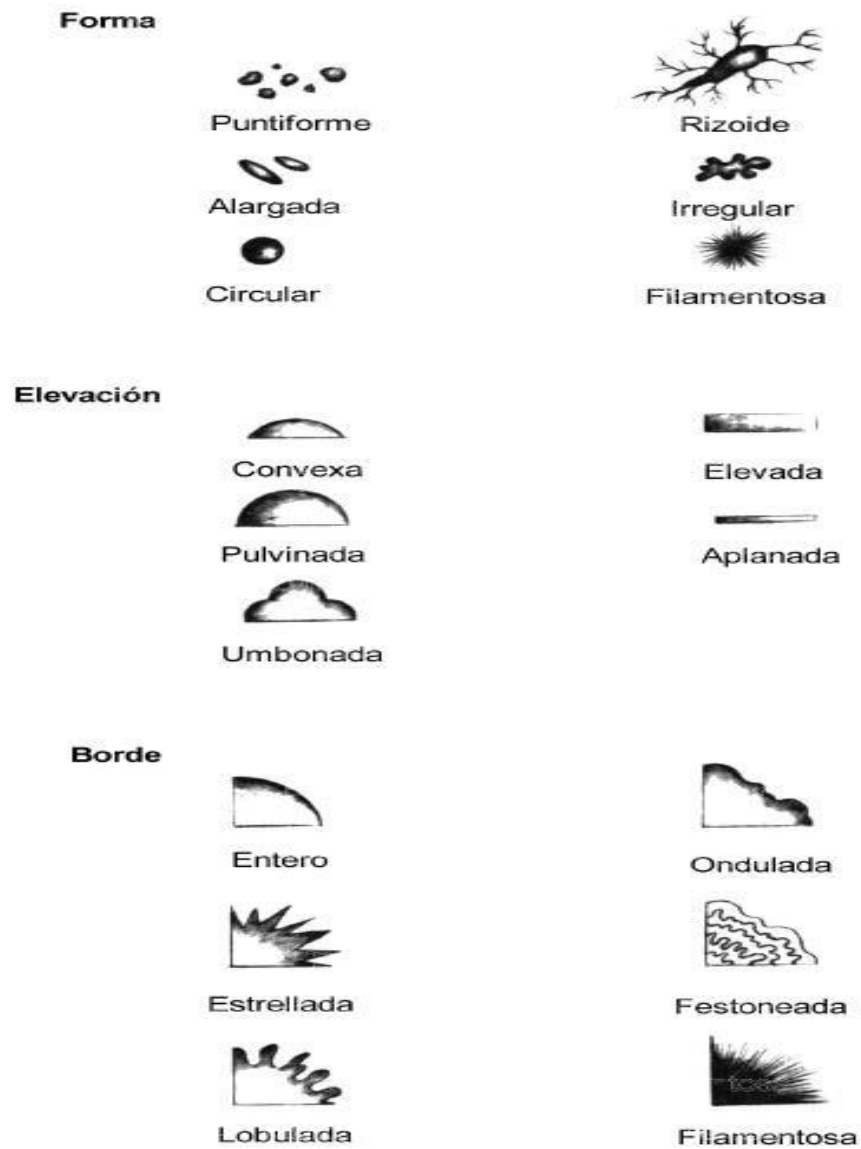


Figura 8. Morfología colonial de las bacterias (Castañeda, 2004).

#### 6.4 Evaluación sensorial de leches fermentadas

Se aplicó un análisis sensorial a leches fermentadas elaboradas a partir de cada una de las diferentes cepas aisladas para seleccionarlas por su capacidad de producir aromas típicos a lácteos, ya que estas pudieran ser las responsables del sabor típico, característico del queso Cocido. Para la elaboración de las leches fermentadas, se utilizó leche descremada en polvo Organic Valley® USDA Organic Grade A (La Farge, WI, EUA). Esta se reconstituyó al 10% (p/v) y se esterilizó a 110°C por 10 min. Cada una de las cepas aisladas se inoculó individualmente (0.05 mL de inóculo en 5 mL de leche) y se incubó a 30, 37 y 42 °C por 24 h. Este procedimiento se repitió dos veces para obtener pre-inóculos frescos de las cepas aisladas. Posteriormente, para preparar las leches fermentadas, una alícuota (3% v/v) de los pre-inóculos se transfirió a la leche en polvo estéril, y se incubó a temperaturas de 30, 37 y 42 °C por 24 h (González-Córdova y col., 2010).

La evaluación sensorial de las leches fermentadas se llevó a cabo mediante un análisis discriminativo con un panel de seis expertos (n=6). Cada panelista evaluó el aroma de las leches fermentada y seleccionó a aquellas que presentaban aromas a típicos lácteos, como a yogur, mantequilla, queso, crema, etcétera..

#### 6.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, fueron analizados mediante un diseño completamente al azar, utilizando el análisis de varianza de una sola vía al 95% de confianza. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey- Kramer, a un nivel de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico NCSS, 2007.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización del proceso

En la Figura 9, se muestra el diagrama de elaboración del queso Cocido que se obtuvo de los muestreos realizados en las queserías de Hermosillo (Quesería 1), Ures (Quesería 2), Rayón (Quesería 3) y Opodepe (Quesería 4). En general, el proceso de elaboración del queso Cocido presentó una gran variabilidad en su forma de elaboración, desde el método de acidificación utilizando ácido cítrico para acidificar la leche o suero fermentado (obtenido del proceso de 3 días anteriores), hasta la temperatura de manejo de la leche, el cocido de la cuajada y la cantidad de cuajo utilizado.

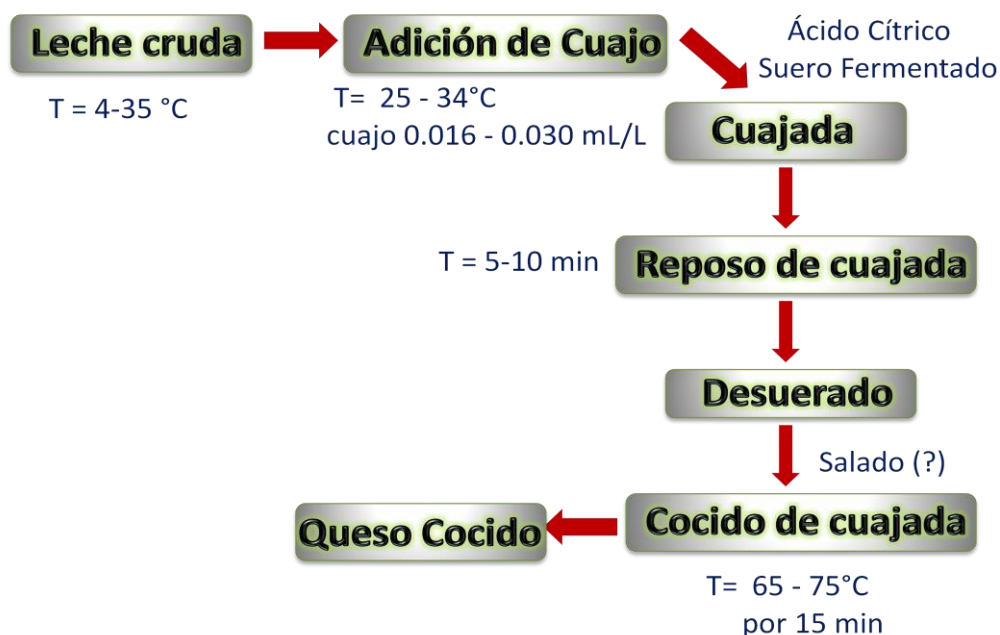


Figura 9. Diagrama de elaboración del queso Cocido artesanal basado en la documentación del proceso de diferentes queserías en 2009-2010.

Las diferentes características registradas de la leche utilizada en las diferentes queserías muestreadas se pueden observar en la Tabla 2, e incluyen: temperatura de recepción, lugar de procedencia, pH de recepción, volumen y el tratamiento térmico utilizado al inicio del proceso de elaboración del queso, entre otras.

Tabla 2. Características de recepción y preparación de la leche utilizada para la elaboración de queso Cocido en diferentes queserías

<b>Leche</b>	<b>Quesería 1</b>	<b>Quesería 2</b>	<b>Quesería 3</b>	<b>Quesería 4</b>
<b>Lugar de procedencia</b>	Hermosillo	Baviácora	Carbó	Ganado de traspatio
<b>°T de recepción</b>	4 - 7°C	7 -10°C	10 -13°C	35 °C
<b>pH de recepción</b>	6-6.2	6	6	6.3
<b>Volumen</b>	2000 L	1500 L	400 L	100 L
<b>Tratamiento térmico</b>	Pasteurización lenta (65 °C por 30 min.	ninguno	Ninguno	Ninguno
<b>Adición de cultivos</b>	Cultivos termófilo	ninguno	Ninguno	Ninguno
<b>Tipo de acidificación</b>	Ácido cítrico	Suero fermentado de 72 h a pH 3	Suero fermentado de 72 h a pH 3	Suero fermentado de 72 h a pH 3.5
<b>°T adición de cuajo</b>	34-35°C	34°C	25-27°C	35°C
<b>Cantidad de cuajo</b>	0.035 mL/L	0.030 mL/L	0.023 mL/L	0.016 mL/L

Fuente: Proceso observado en diferente queserías de la región, 2010.

Las diferencia de temperatura en la recepción de leche (Figura 10), el uso de cultivos y el tratamiento térmico, son similares a los reportados por Tunick y col., 2008 con respecto a la elaboración de queso Chihuahua. Durante la elaboración de este queso se manejan rangos de temperatura entre 4 y 23 °C en la recepción de la leche, algunos de estos quesos son elaborados con leche pasteurizada y se les adiciona cultivos (no se menciona el tipo de cultivo que utilizan). Al igual que el queso Cocido, el proceso de elaboración del queso Chihuahua tiene variaciones en el proceso y falta una estandarización en su elaboración.



Figura 10. Recepción de la leche en: (a) Quesería 1, (b) Quesería 2 y (c) Quesería 3.

Por otro lado, en comparación con el queso Oaxaca el proceso de elaboración de este se encuentra estandarizado y el tipo de leche que se utiliza es pasteurizada, además se utiliza un cultivo termófilo (*Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*), y la leche es acidificada mediante la adición de un ácido orgánico (acético, láctico o cítrico) (Villegas de Gante, 2004).

Con respecto a la adición de cuajo, las cantidades empleadas (0.016-0.035 mL/L de leche), son muy diferentes a las utilizadas en la preparación de queso Fresco (0.15 mL/L de leche) (Torres-Llanez y col., 2002) y de queso Chihuahua (0.13mL/L de leche) (Tunick y col., 2008). En el caso del queso Oaxaca no se establece el uso de cuajo (Villegas de Gante, 2004).

Después de la adición de cuajo, se adicionó el ácido cítrico (pH de 2.5) en la quesería 1, mientras que y en las queserías 2, 3 y 4 se adicionó suero fermentado de 72 h (pH entre 3 y 3.5), esto se hace hasta la formación de la cuajada (Figura 11). Es importante señalar que ninguna de las queserías tiene establecida o estandarizada la cantidad exacta requerida para la formación de la cuajada, lo que provoca que se tengan variaciones en el producto final. En el queso Oaxaca se adiciona el ácido (acético, láctico y cítrico) a pH de 5.6, pero tampoco se establece la cantidad que se le adiciona a este queso (Villegas de Gante, 2004). Porque lo importante es que lleve la leche a cierto pH. No se puede especificar la cantidad de ácido porque no todas las leches llegan con la misma acides o pH.





Figura 11. Formación de cuajada en: (a) Quesería 1, (b) Quesería 2 y (c) Quesería 3.

Con respecto a la cocción de la pasta, en la quesería 1 y quesería 2 ( Figura 12a) se utilizan chaquetas de calentamiento (75 °C), en la quesería 3 (Figura 12b) la cocción se realiza con hornillas de calentamiento (65 °C) y en la quesería 4 (Figura 12c) con leña (madera de chito) a 55 °C. En las cuatro queserías el tiempo de cocción es por 15 min. En comparación con el queso Chihuahua, la cocción de la pasta es a 30- 45 °C por 5 – 90 min y en el queso Oaxaca se utiliza baño maría a 72 – 75 °C, esta temperatura es similar a la que se utiliza en el queso Cocido en quesería 1 y 2.

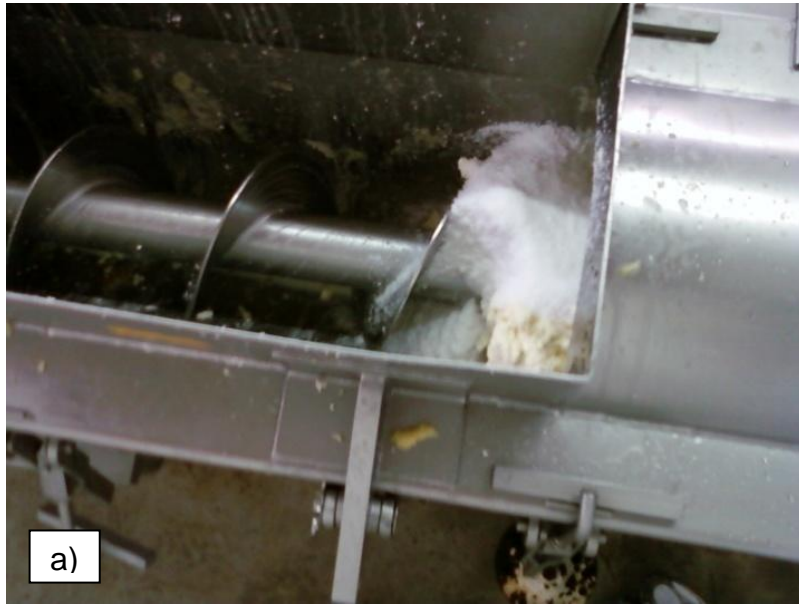


Figura 12. Cocción de la cuajada en: (a) Quesería 2, (b) Quesería 3 y (c) Quesería 4.

## 7.1.1 Análisis Físicoquímicos

### 7.1.1.1 Leche

Los resultados físicoquímicos de leche empleada para la producción del queso Cocido mostraron que no hubo diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ), en cuanto acidez, humedad, sólidos totales y cenizas, como se puede observar en la Tabla 3. Sin embargo, se presentaron diferencias con respecto a pH, grasa y proteína.

El pH presentó rangos entre 6.47-6.60 y aunque estadísticamente presenta diferencia, está no es relevante para el proceso, debido a que como primer paso en la elaboración del queso, se disminuye el pH de la leche a 5 cuando se adiciona el suero fermentado o el ácido cítrico.

En el componente de proteína, la leche de la quesería 1 fue la que presentó mayor cantidad con respecto a las demás. El porcentaje de proteína en leche establecido por la norma general del Codex para leche (Codex Standard 243-2003) es 3.0-3.5%, lo que significa que los porcentajes de proteína que presentan las leches de queserías 1, 3 y 4 están dentro del rango permitido, en cambio la leche de queserías 2 fue la que presentó la menor cantidad de proteína y su valor está por debajo de lo permitido por el Codex.

En el contenido de grasa, la leche de la quesería 2 fue la que presentó mayor contenido con respecto a las queserías 1, 3 y 4, las cuales presentaron porcentajes por debajo del límite permitido por el Codex de (3.5%).

La variabilidad en las características fisicoquímicas en la leche, pueden deberse al sistema de producción que se tenga y principalmente a la alimentación del ganado (Villegas de Gante, 2004). Además de que la forma de elaboración de queso Cocido es artesanal, no se cuenta con una estandarización de materias primas ni proceso.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la leche utilizada para la preparación de queso Cocido de diferentes queserías.

<b>Quesería</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez (% ácido láctico g/L)</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Sólidos Totales (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>	<b>Grasa (%)</b>	<b>Proteína(%)</b>
<b>Quesería 1</b>	6.47 ±0.08 <sup>a</sup>	1.66 ±0.02 <sup>a</sup>	87.89±0.02 <sup>a</sup>	12.10±0.03 <sup>a</sup>	0.69±0.007 <sup>a</sup>	2.92±0.27 <sup>a</sup>	3.36±0.62 <sup>c</sup>
<b>Quesería 2</b>	6.59 ±0.01 <sup>b</sup>	1.75 ±0.18 <sup>a</sup>	88.84±0.60 <sup>a</sup>	11.15±0.60 <sup>a</sup>	0.75±0.07 <sup>a</sup>	3.16±0.26 <sup>bc</sup>	2.79±0.34 <sup>ab</sup>
<b>Quesería 3</b>	6.59 ±0.01 <sup>b</sup>	1.71±0.02 <sup>a</sup>	88.28±0.21 <sup>a</sup>	11.71±0.21 <sup>a</sup>	0.96±0.06 <sup>a</sup>	2.80±0.08 <sup>ab</sup>	3.09±0.13 <sup>bc</sup>
<b>Quesería 4</b>	6.60 ±0.01 <sup>b</sup>	1.68±0.01 <sup>a</sup>	89.20±0.08 <sup>a</sup>	10.79±0.08 <sup>a</sup>	0.83±0.09 <sup>a</sup>	2.92±0.05 <sup>c</sup>	3.08±0.07 <sup>a</sup>

\*\*Porcentaje promedio ± DE. Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05). El experimento se realizó por triplicado.

### 7.1.1.2 Suero

Los resultados fisicoquímicos de suero mostraron que no hubo diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ), en cuanto pH, acidez y proteína, como lo muestra la Tabla 4. Mientras que si, se presentaron diferencias con respecto a humedad, sólidos totales, grasa y cenizas.

La humedad del suero en las diferentes queserías, fue de 94.17 – 96.08, siendo la quesería 4 la que presentó mayor porcentaje. Estos resultados son similares a los obtenidos por Alais en 1985, quien reporto porcentajes de humedad en el suero de leche de alrededor de de 94 a 95 %. Sin embargo, los valores que se obtuvieron se encuentran por arriba de lo establecido en la NOM-035-SSA1-1993.

De acuerdo al contenido de grasa, la quesería 1 presentó un porcentaje de 0.73 siendo la más representativa de las 4 queserías. Este valor está por debajo de lo establecido por la NOM-035-SSA1-1993 (2.5 %) pero es superior al porcentaje de grasa en suero ácido (0.04 %), reportado por Scott en 1991.

Se debe considerar que es difícil hacer una comparación, ya que de acuerdo a los resultados que se obtuvieron en el análisis fisicoquímico del suero muestran grandes variaciones, ya que este va depender del tipo de leche, proceso y del queso que se desea obtener.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de suero obtenido de la elaboración del queso Cocido de diferentes queserías.

Quesería	pH	Acidez (% ácido láctico g/L)	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína(%)
<b>Quesería 1</b>	5.88 ±0.43 <sup>a</sup>	1.72 ±0.01 <sup>a</sup>	94.17±0.14 <sup>a</sup>	5.82±0.14 <sup>b</sup>	0.46±0.07 <sup>c</sup>	0.73±0.07 <sup>b</sup>	0.72±0.02 <sup>a</sup>
<b>Quesería 2</b>	5.44 ±0.01 <sup>a</sup>	1.85 ±0.27 <sup>a</sup>	94.55±0.95 <sup>ab</sup>	5.44±0.95 <sup>ab</sup>	0.50±0.01 <sup>c</sup>	0.66±0.14 <sup>ab</sup>	0.89±0.22 <sup>a</sup>
<b>Quesería 3</b>	5.46 ±0.01 <sup>a</sup>	1.79±0.04 <sup>a</sup>	95.86±0.53 <sup>b</sup>	4.13±0.53 <sup>a</sup>	0.41±0.03 <sup>b</sup>	0.49±0.06 <sup>ab</sup>	0.83±0.05 <sup>a</sup>
<b>Quesería 4</b>	5.43 ±0.01 <sup>a</sup>	1.75±0.02 <sup>a</sup>	96.08±0.59 <sup>b</sup>	3.91±0.59 <sup>a</sup>	0.34±0.02 <sup>a</sup>	0.46±0.04 <sup>a</sup>	0.77±0.11 <sup>a</sup>

\*\*Porcentaje promedio ± DE. Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05). El experimento se realizó por triplicado.

### 7.1.1.3 Cuajada

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de la cuajada de las diferentes queserías, no hubo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) en el contenido de grasa, cenizas y acidez como se observa en la Tabla 5. Sin embargo, el contenido de grasa de las diferentes muestras analizadas fue menor al 15.08 % reportado por Torres-Llanez *et al.* (2006) en el queso Fresco.

El pH de la cuajada de las diferentes queserías, presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), siendo la quesería 1 la que presentó un mayor valor de pH (5.67). De forma general los valores de pH fueron mayores al reportado por Reyes – Díaz (2010) en el queso Fresco (pH 5.3). Por otra parte, la humedad de la cuajada en las diferentes queserías, fue de 62.82 – 68.16, donde queserías 3 y 4 presentaron mayor el porcentaje, mostrando un gel menos firme en comparación con quesería 1 y 2 como se puede observar en la Figura 13 (a, b y c). El porcentaje El % de humedad en la cuajada de las queserías 3 y 4 fue similar al reportado por Torres-Llanez *et al.* (2006) donde el porcentaje de humedad en la cuajada es de 67.5.

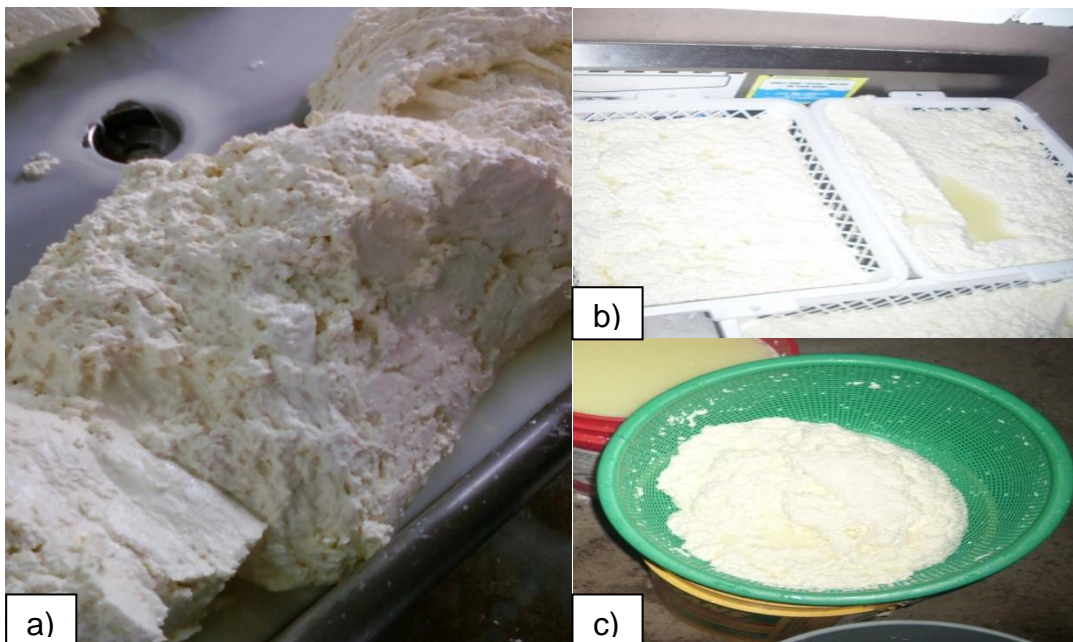


Figura 13. Formación de cuajada: (a) Quesería 2, (b) Quesería 3 y (c) Quesería 4.



Tabla 5. Características fisicoquímicas de cuajada cruda obtenida en la elaboración de queso Cocido de diferentes queserías.

Quesería	pH	Acidez (% ácido láctico g/L)	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína(%)
<b>Quesería 1</b>	5.67 ±0.04 <sup>b</sup>	1.95 ±0.003 <sup>a</sup>	62.91±2.14 <sup>a</sup>	37.08±2.14 <sup>b</sup>	1.81±0.47 <sup>a</sup>	13.27±0.91 <sup>a</sup>	18.38±1.35 <sup>c</sup>
<b>Quesería 2</b>	5.48 ±0.01 <sup>a</sup>	2.08 ±0.33 <sup>a</sup>	62.82±2.50 <sup>a</sup>	37.17±2.50 <sup>b</sup>	1.53±0.04 <sup>a</sup>	14.33±1.45 <sup>a</sup>	16.38±1.18 <sup>b</sup>
<b>Quesería 3</b>	5.48 ±0.01 <sup>a</sup>	1.98±0.14 <sup>a</sup>	68.02±0.35 <sup>b</sup>	31.97±0.34 <sup>a</sup>	1.94±0.19 <sup>a</sup>	12.22±0.25 <sup>a</sup>	14.11±0.57 <sup>a</sup>
<b>Quesería 4</b>	5.45 ±0.02 <sup>a</sup>	1.96±0.008 <sup>a</sup>	68.16±0.23 <sup>b</sup>	31.83±0.23 <sup>a</sup>	1.98±0.03 <sup>a</sup>	12.72±0.19 <sup>a</sup>	14.35±0.02 <sup>a</sup>

\*\* Porcentaje promedio ± DE. Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). El experimento se realizó por triplicado.

#### 7.1.1.4 Queso

Los resultados del queso mostraron que no hubo diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ), en pH, humedad, sólidos totales, grasa y cenizas, como se puede observar en la Tabla 6. Sin embargo, se presentaron diferencias con respecto a acidez y proteína.

La acidez del queso de la quesería 1 fue de 3.48 g/L, siendo superior a los demás. Estas diferencias se pueden deber al tipo de acidificación que maneja cada una de las queserías. La acidez que presentaron estos quesos fue muy similar, con respecto al queso Oaxaca (queso de pasta cocida) que presenta una acidez entre 3.2 y 3.5 g/L (Villegas de Gante, 2008)

En el componente de proteína, el queso de la quesería 1 presentó un porcentaje de 20.61, siendo similar al 22 % del queso Chihuahua reportado por Van Hekken y Farkye (2003) y al 21.3 % del queso Oaxaca establecido por Villegas de Gante (2008). Pero es menor al 23.8-27.6 % reportado por Tunick y col., (2008).

En la Norma general del CODEX para el queso (Codex Standard 283-1978), se hace una clasificación de los quesos tomando en cuenta el porcentaje de humedad sin materia grasa (HSMG), aquellos con una HSMG de 54 y 69% son considerados como firmes /semiduros. Los quesos analizados en este estudio tuvieron una HSMG entre 53 y 59%, por lo que se encuentran dentro de esta clasificación. Además, según las características de maduración, se clasifican como no madurados/frescos (FAO/WHO, 1978).

Tabla 6. Características fisicoquímicas del queso Cocido preparado de diferentes queserías.

Quesería	pH	Acidez (% ácido láctico g/L)	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína(%)
<b>Quesería 1</b>	5.68 ±0.12 <sup>a</sup>	3.48 ±0.10 <sup>b</sup>	53.75±4.44 <sup>a</sup>	46.23±4.45 <sup>a</sup>	2.37±0.40 <sup>a</sup>	19.61±2.67 <sup>a</sup>	20.61±2.09 <sup>b</sup>
<b>Quesería 2</b>	5.49 ±0.10 <sup>a</sup>	2.95 ±0.15 <sup>a</sup>	55.79±1.19 <sup>a</sup>	44.20±1.19 <sup>a</sup>	2.28±0.09 <sup>a</sup>	17.22±1.50 <sup>a</sup>	20.08±1.01aa <sup>b</sup>
<b>Quesería 3</b>	5.51 ±0.02 <sup>a</sup>	3.10±0.15 <sup>a</sup>	59.79±0.13 <sup>a</sup>	40.24±0.18 <sup>a</sup>	2.67±0.09 <sup>a</sup>	15.72±0.19 <sup>a</sup>	17.15±0.12 <sup>a</sup>
<b>Quesería 4</b>	5.48 ±0.02 <sup>a</sup>	3.14±0.03 <sup>ab</sup>	59.45±0.75 <sup>a</sup>	40.54±0.75 <sup>a</sup>	2.75±0.03 <sup>a</sup>	15.72±0.41 <sup>a</sup>	18.00±0.25 <sup>ab</sup>

\*\*Porcentaje promedio ± DE. Medias con diferente literal en la misma columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05). El experimento se realizó por triplicado.

## 7.1.2 Análisis microbiológicos

### 7.1.2.1 Leche

En la Figura 14 se muestran los análisis microbiológicos de leche de las diferentes queserías. En el caso de mesófilos aerobios se tienen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), siendo quesería 3 y 4 la que presenta los conteos más altos de  $8.89 \pm 0.86$  log UFC/mL. Los resultados obtenidos sobrepasan el límite permitido por la NOM-091-SSA1-1994 que es de 4.47 log UFC/g. Por otro lado, no hubo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el caso de hongos y levaduras, y la NOM-091-SSA1-1994 no establece un límite permisible, pero un estudio realizado por Renye y col., 2007, reportan un conteo entre 4.24 – 5.90 log UFC/g para hongos y levaduras, siendo este rango mayor al 2.96 – 3.71 log que presentan la leche de las diferentes queserías analizadas.

En el análisis de coliformes totales y fecales (NMP/g) no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ), como se observa en la Figura 15; sin embargo, sobrepasan los límites permitidos por la FDA de 0.47 log NMP/g. No se hace comparación con la NOM-091-SSA1-1994 porque no establece los límites para coliformes totales y fecales. Aunque no se especifican los límites propiamente en leche, si se reportan para coliformes totales en placa 10 UFC/mL. En comparación con otros estudios sobre microorganismos indicadores en leche, se reportó un conteo de 3.74 log NMP/g (Oliszewski y col., 2007), siendo este dato mayor a 3.32 log NMP/g que presentó quesería 4.

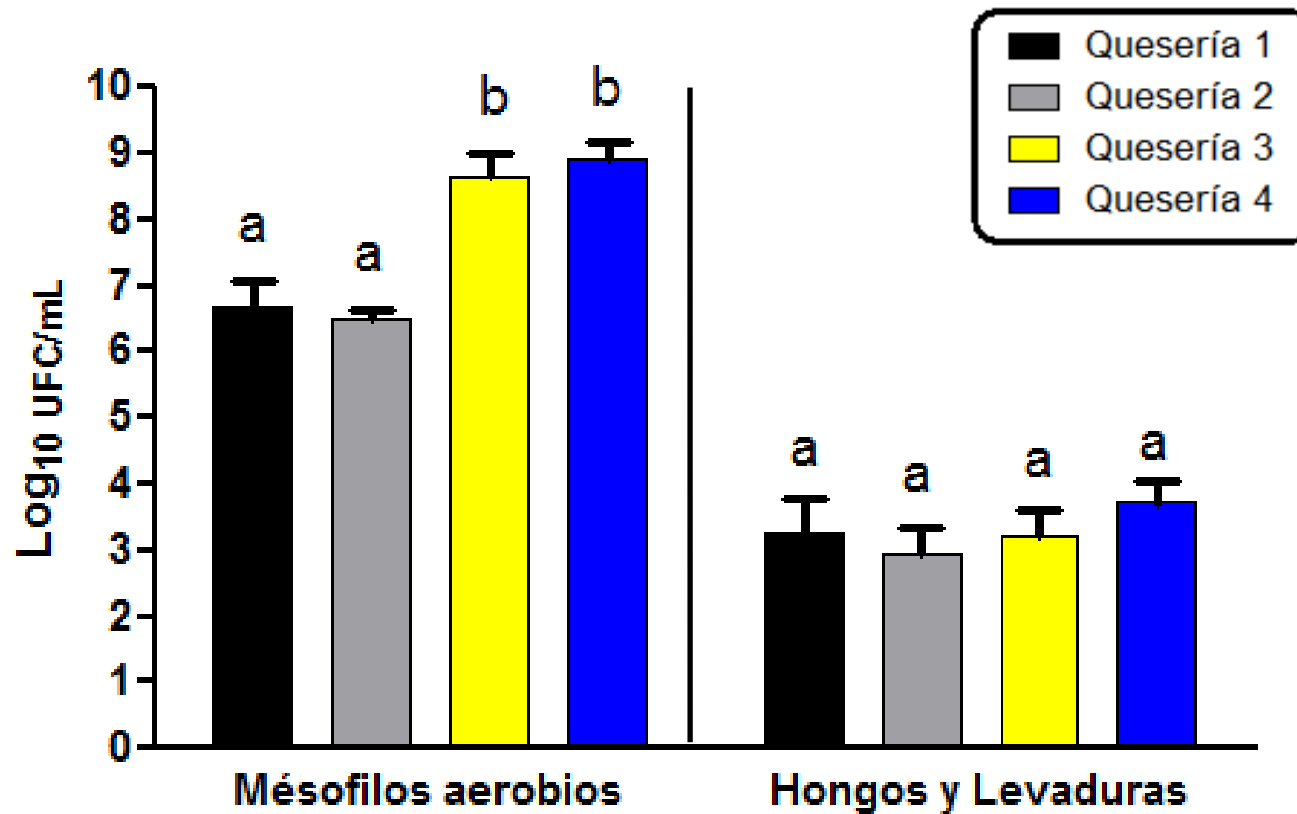


Figura 14. Presencia de mésofilos aerobios, hongos y levaduras en la leche utilizada para la preparación de queso Cocido de diferentes queserías.

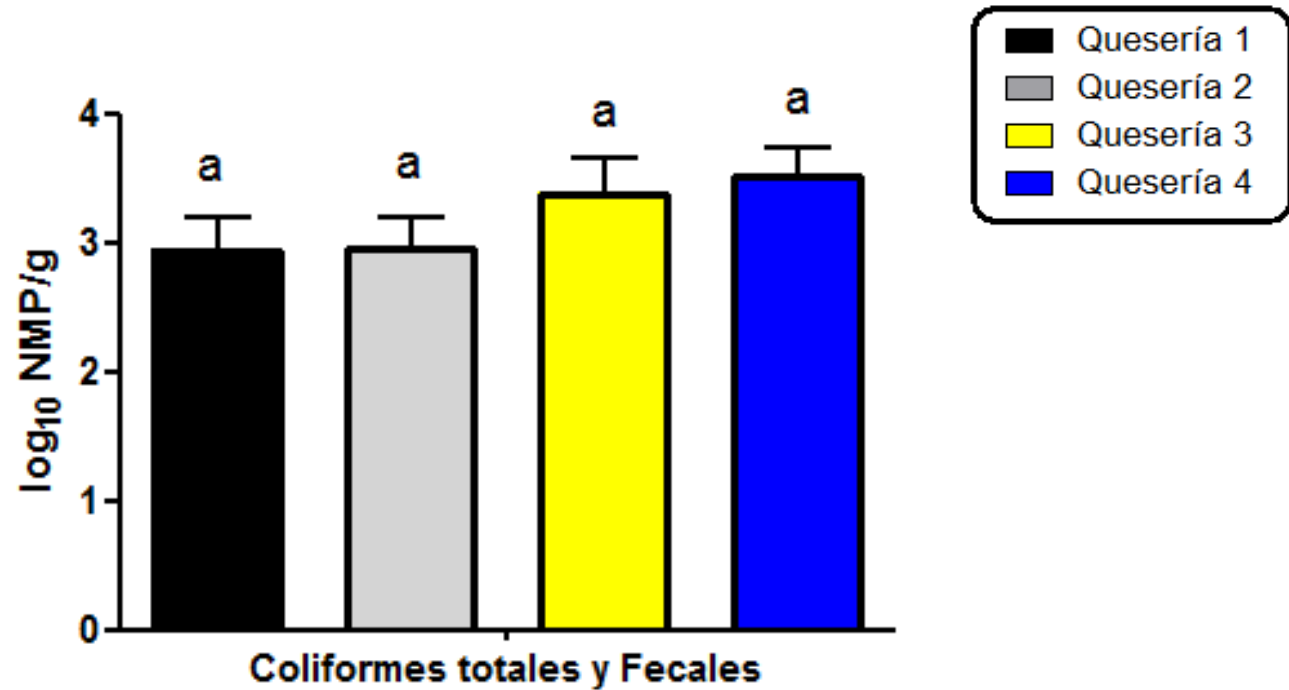


Figura 15. Presencia de coliformes totales y fecales en la de leche utilizada para la preparación de queso Cocido de diferentes queserías.

En el conteo de bacterias ácido lácticas en la leche de las diferentes queserías, no se presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) en ninguno de los géneros analizados. En un estudio sobre queso Crema Tropical, reportaron un conteo de 3.78 log UFC/mL de *Lactobacillus* en leche cruda (Ramos-Izquierdo y col., 2009), siendo este conteo menor a 7.35 log UFC/mL que presentó la quesería 4.

De acuerdo con datos reportados en leche cruda por Renye y col., en 2007 para el conteo de *Lactobacillus* fue de 7.13- 8.88 log UFC/mL, para *Lactococcus* de 6.85-9.07 log UFC/mL y para *Streptococcus* de 6.91-8.88 log UFC/mL, siendo estos rangos superiores a los que se obtuvieron en la leche de las diferentes queserías analizadas, como lo muestra la Figura 16.

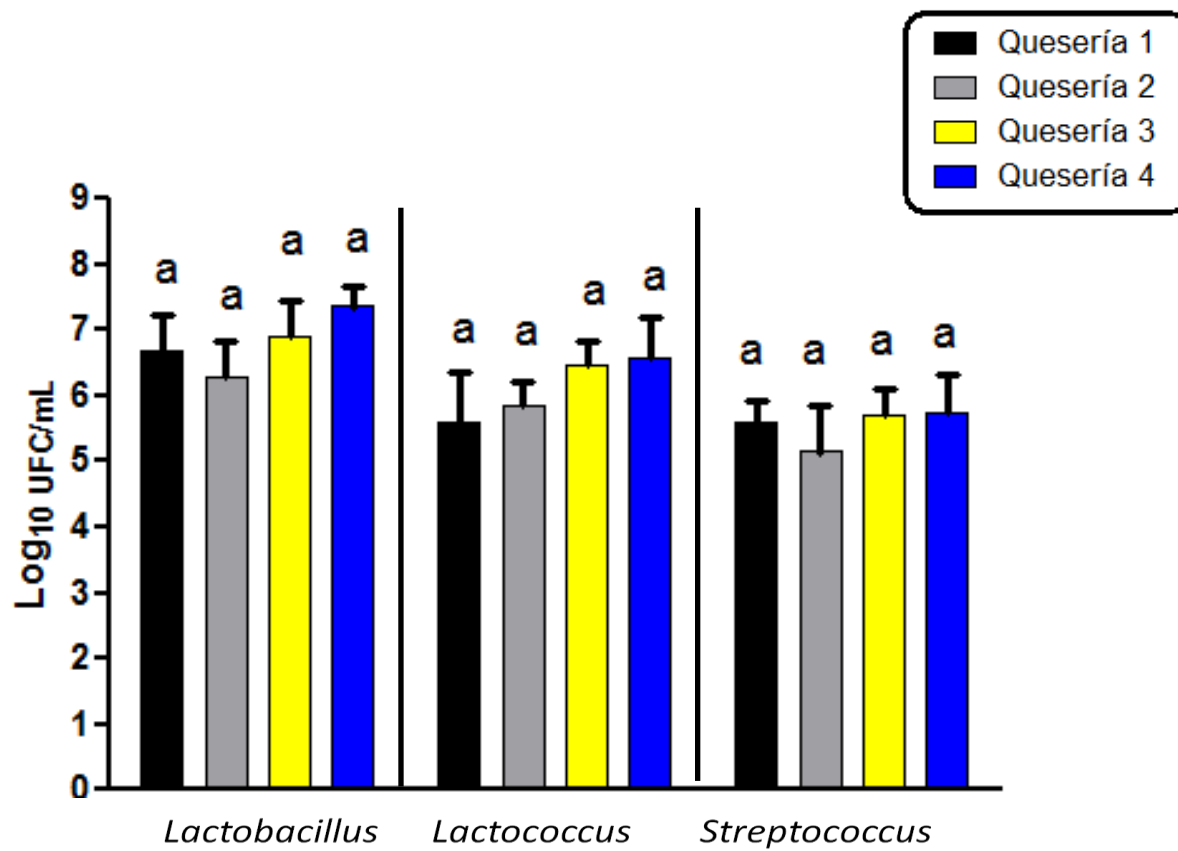


Figura 16. Conteo de BAL en leche utilizada para la preparación de queso Cocido de diferentes queserías.



### 7.1.2.2 Suero

Los resultados de los análisis microbiológicos de suero para mésofilos (Figura 17) aerobios presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las queserías. De forma particular, la quesería 4 presentó un conteo de 8.26 log UFC/mL, valor similar al conteo que se obtuvo de mésofilos aerobios en leche. La NOM-035-SSA1-1993 no establece límites permisibles para mésofilos.

Los análisis de hongos y levaduras (Figura 17) no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ). Al igual que en el caso de los mésofilos, la quesería 4 presentó el conteo más alto (3.26 log UFC/g), el cual está por encima del límite permisible de 2.69 log UFC/g establecido por la NOM-035-SSA1-1993.

Como se puede observar en la Figura 18. Para el caso de coliformes totales y fecales en suero analizado de las diferentes queserías, no se presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) en el suero analizado de las diferentes queserías. Los conteos observados fueron similares a los de leche, esto puede deberse a que el suero se almacena en los mismos recipientes donde se guarda la leche. De acuerdo a lo establecido en la NOM-035-SSA1-1993 el límite máximo permitido es de 2 NMP/g, esto es menor al obtenido en este análisis ( $\geq 3.0$  log NMP/g en todas las queserías).

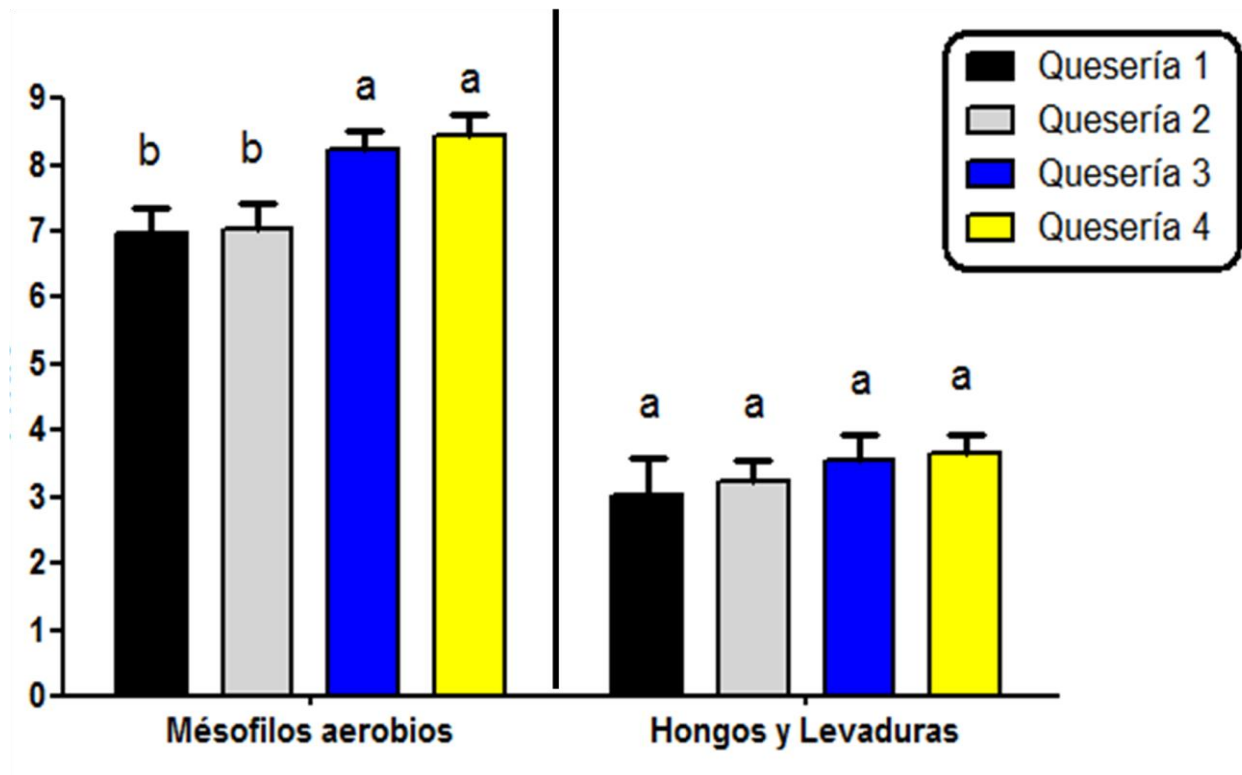


Figura 17. Presencia de mésofilos aerobios, hongos y levaduras en el de suero obtenido en la elaboración de queso Cocido en diferentes queserías.

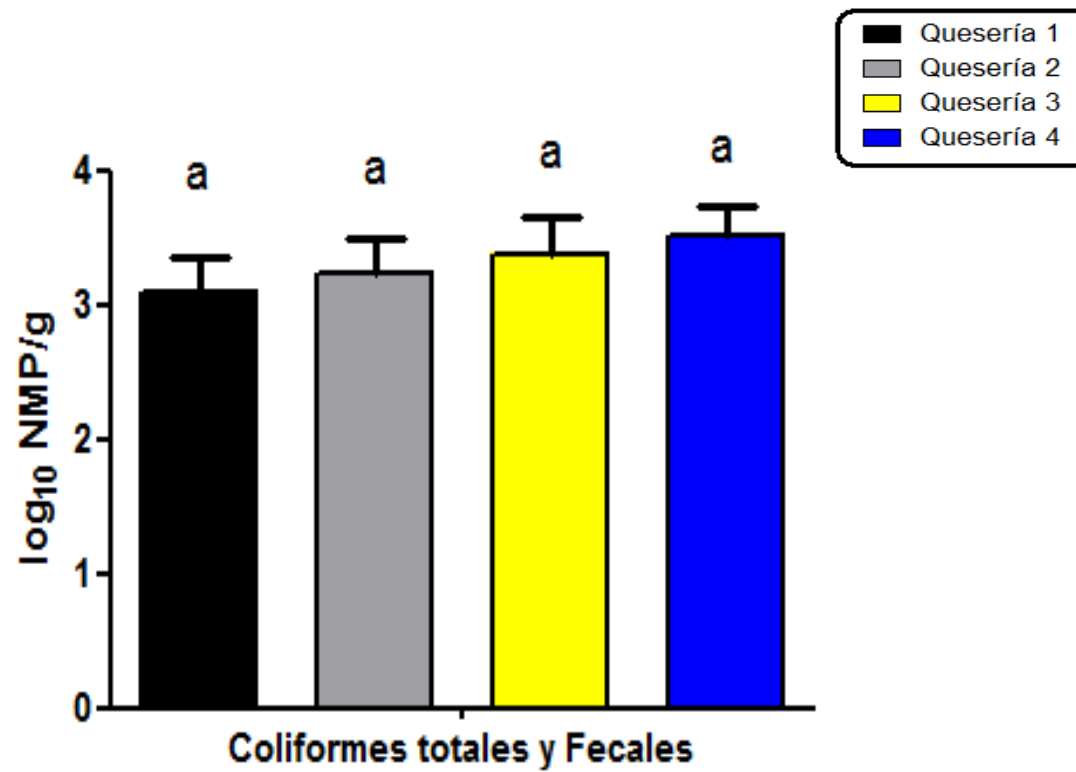


Figura 18. Presencia de coliformes totales y fecales en el de suero obtenido en la elaboración de queso Cocido en diferentes queserías.

Para el conteo de BAL, se presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los tres géneros de bacterias analizados (Figura 19). La cuenta de *Lactobacillus* de la quesería 3 presentó el conteo más alto (7.89 log UFC/mL) con respecto a todas las queserías. En un estudio relacionado (Olstorpe y col., 2008) se analizó la cuenta de *Lactobacillus* en suero de leche, los autores reportaron un valor (7.1 log UFC/mL), menor al reportado en este trabajo para la quesería 3. Con respecto al conteo de *Lactococcus* el rango para las cuatro queserías fue de 5.79 – 6.68 log UFC/mL. Al igual que la cuenta total de *Lactobacillus*, la quesería 3 presentó el conteo más alto. Se presentó el mismo caso para el conteo de *Streptococcus* (6.22 – 7.44 log UFC/mL) para las cuatro queserías analizadas.

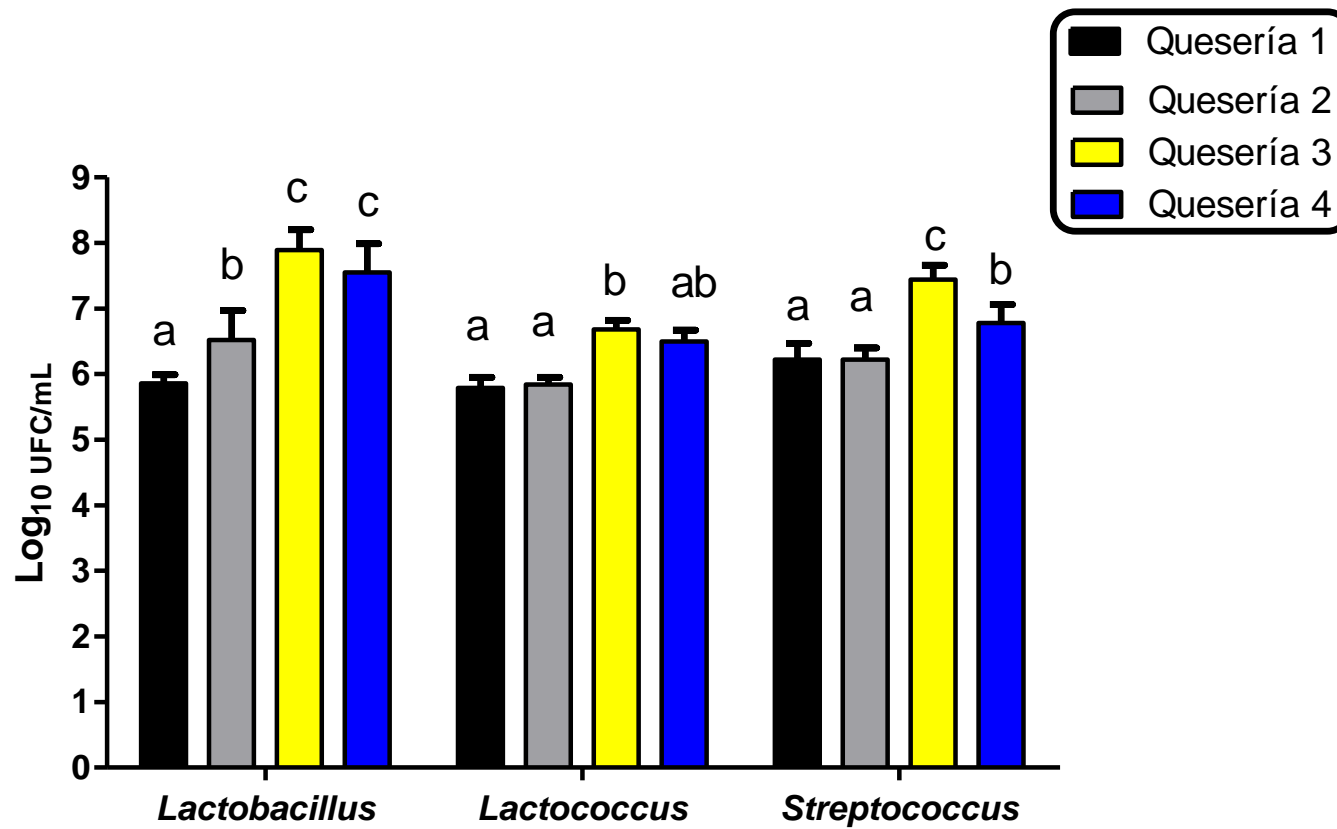


Figura 19. Conteo de BAL en suero obtenido en la elaboración de queso Cocido de diferentes queserías.

### 7.1.2.3 Cuajada

Los resultados de los análisis de mesófilos aerobios y hongos y levaduras (Figura 20) en la cuajada de las diferentes queserías presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Las muestras de la quesería 3 presentaron el conteo más alto (7.82 log UFC/mL) para mesófilos aerobios con respecto a las demás. En comparación con datos obtenidos por Marino y col., (2003) el conteo de mesófilos en la cuajada fue menor (7.42 log UFC/g) al reportado para la quesería 3.

Para el conteo de hongos y levaduras (Figura 20), la quesería 4 presentó el conteo más alto de 3.20 log UFC/g con respecto a las demás queserías, siendo mayor al reportado por Marino y col., (2003) de 3.02 log UFC/g.

Se puede observar en la Figura 21, la quesería 1 presentó la cuenta de coliformes fecales y totales significativamente ( $p \leq 0.05$ ) más bajo en la cuajada de las diferentes queserías (2.10 log NMP/g) evaluadas, este dato fue menor (4.71 log NMP/g) al reportado por Marino y col., (2003) en queso italiano artesanal.

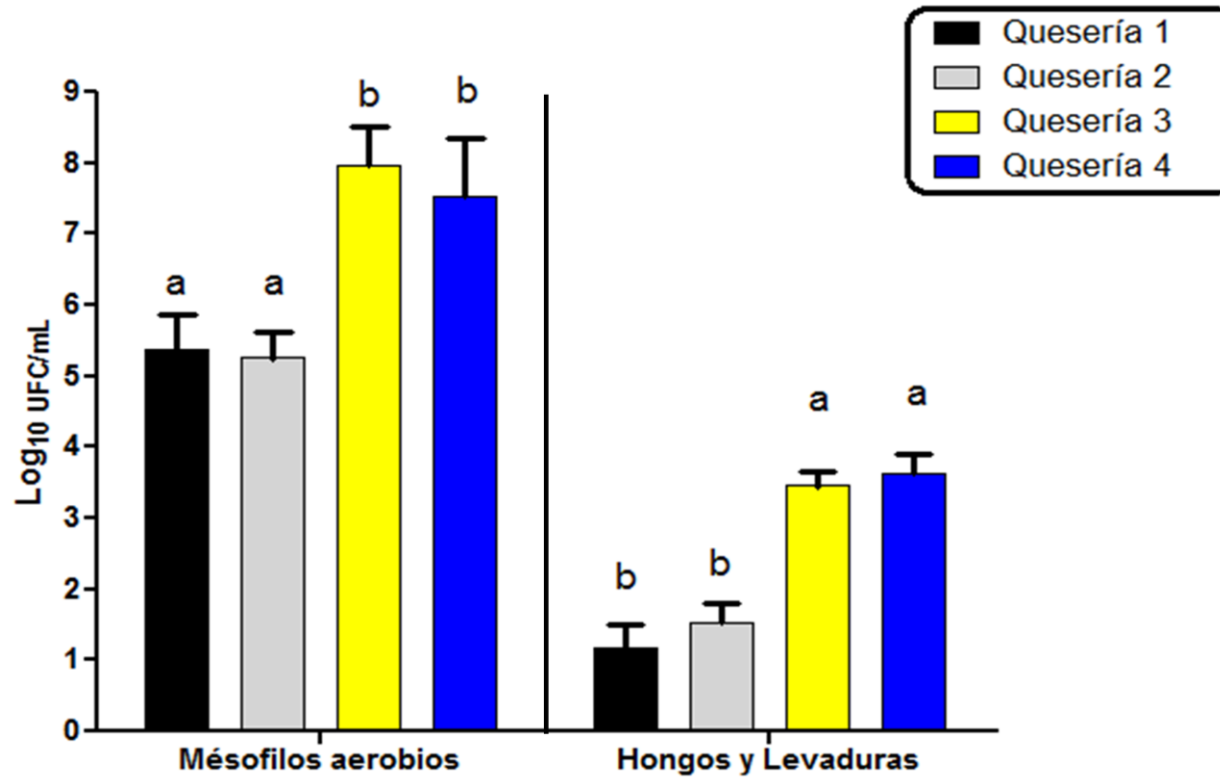


Figura 20. Presencia de mésofilos aerobios, hongos y levaduras en la de cuajada cruda obtenida en la elaboración de queso Cocido de diferentes queserías.

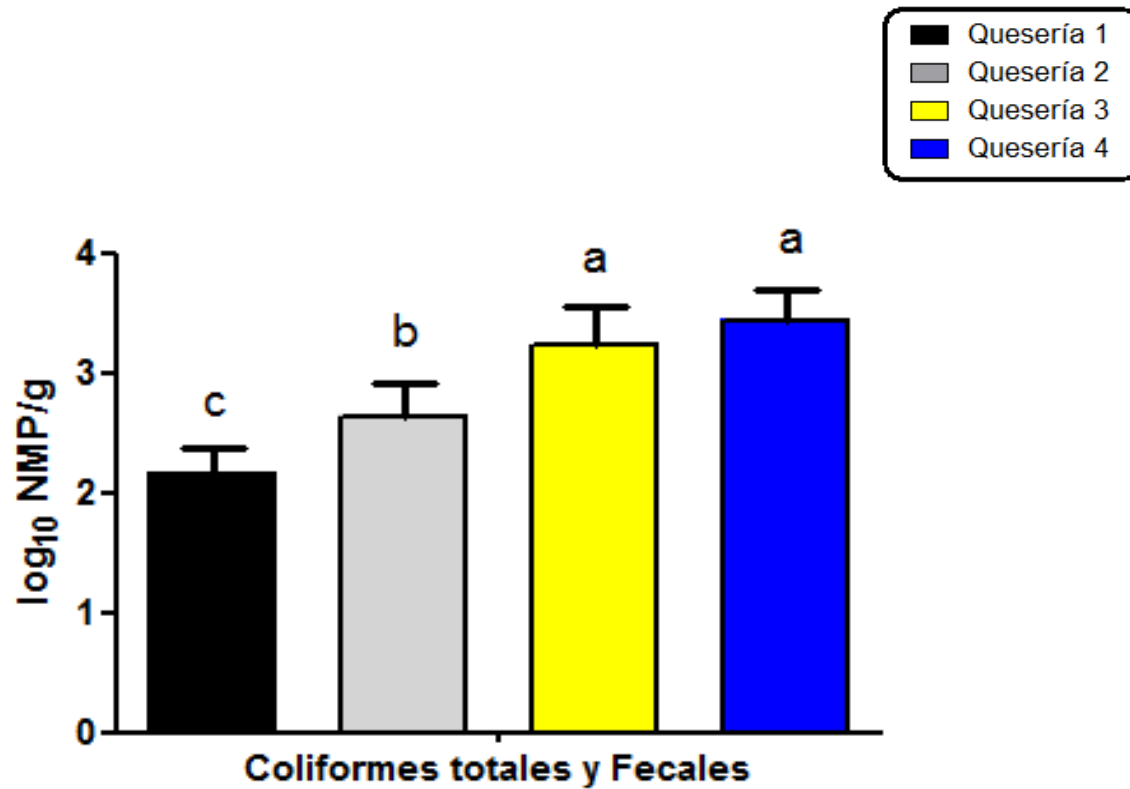


Figura 21. Presencia de coliformes totales y fecales en el de cuajada cruda obtenida en la elaboración de queso Cocido de diferentes queserías.



Para el conteo de BAL (Figura 22) se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los tres géneros determinados (*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*). En el caso de *Lactobacillus*, la quesería 4 presentó el conteo más alto (8.18 log UFC/mL), siendo mayor al reportado por Torres-LLanez y col., (2003) en queso Fresco (7.99 log UFC/mL), para *Lactococcus* el conteo más alto fue de 7.60 log UFC/g observado en la quesería 4, siendo este dato menor al reportado por Torres-LLanez y col., (2006) pero similar al obtenido por Marino y col., (2003) en queso madurado. En el conteo de *Streptococcus* se determinó una concentración celular (6.37 log UFC/g), menor a la reportado por de Torres- LLanez y col., (2003) de 5.51 log UFC/mL.

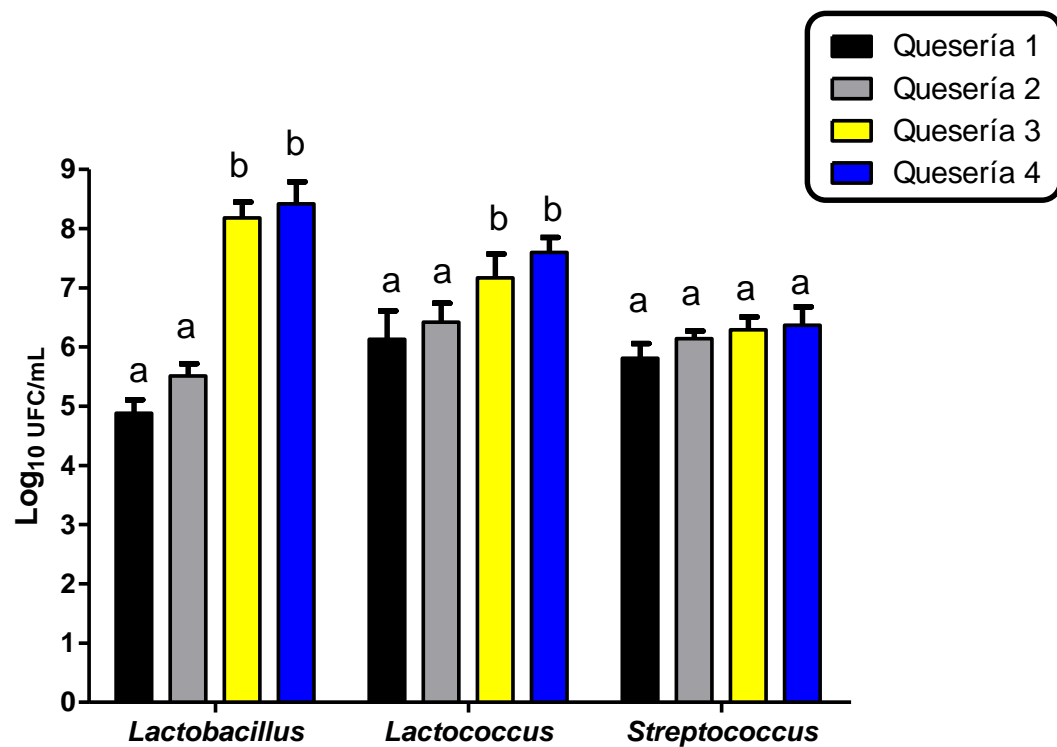


Figura 22. Conteo de BAL en cuajada cruda obtenida en la elaboración de queso Cocido en diferentes queserías.

#### 7.1.2.4 Queso

En la Figura 23 se muestran los análisis microbiológicos realizados a quesos Cocido de cada una de las queserías. Las queserías 3 y 4 presentaron cuentas de hongos y levaduras de 2.59 y 2.61 log UFC/mL, respectivamente, las cuales están por debajo del límite permisible por la NOM-121-SSA1-1994 (2.69 log UFC/g).

Para el caso de mésofilos aerobios, la norma no presenta los límites permisibles, sin embargo, de acuerdo con el estudio en queso Chihuahua realizado por Tunick y col., (2008), el contenido de mésofilos aerobios observado fue de 9.61 log UFC/mL, dicho valor es superior al determinado en cualquiera de las cuatras queserías evaluadas, por ejemplo el de quesería 3 que presenta el conteo más alto (7.26 log UFC/mL).

Para el conteo de coliformes totales y fecales no se presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) como se muestra en la Figura 24, en donde quesería 1 y 2 están por debajo del límite permisible por la NOM-121-SSA1-1994 que establece que los quesos no madurados deben de tener un máximo de 2 NMP/g para coliformes totales y fecales, sin embargo quesería 3 y 4 no cumplen con los límites permisibles de esta norma.

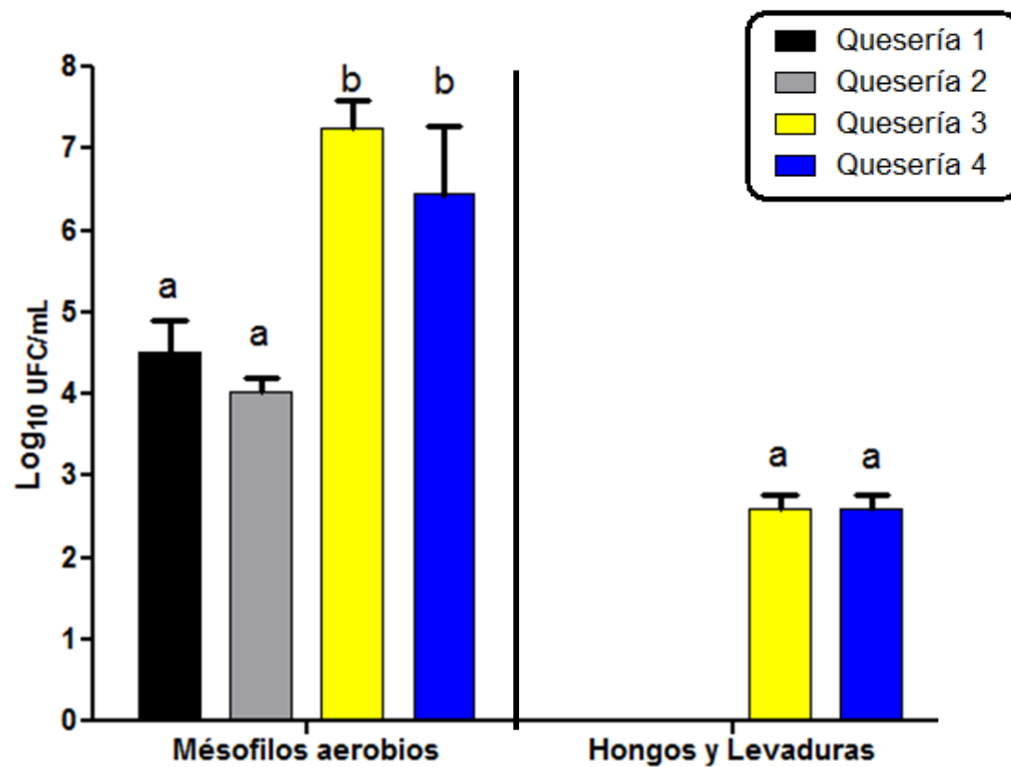


Figura 23. Presencia de mésofilos aerobios, hongos y levaduras en el queso Cocido elaborado de diferentes queserías

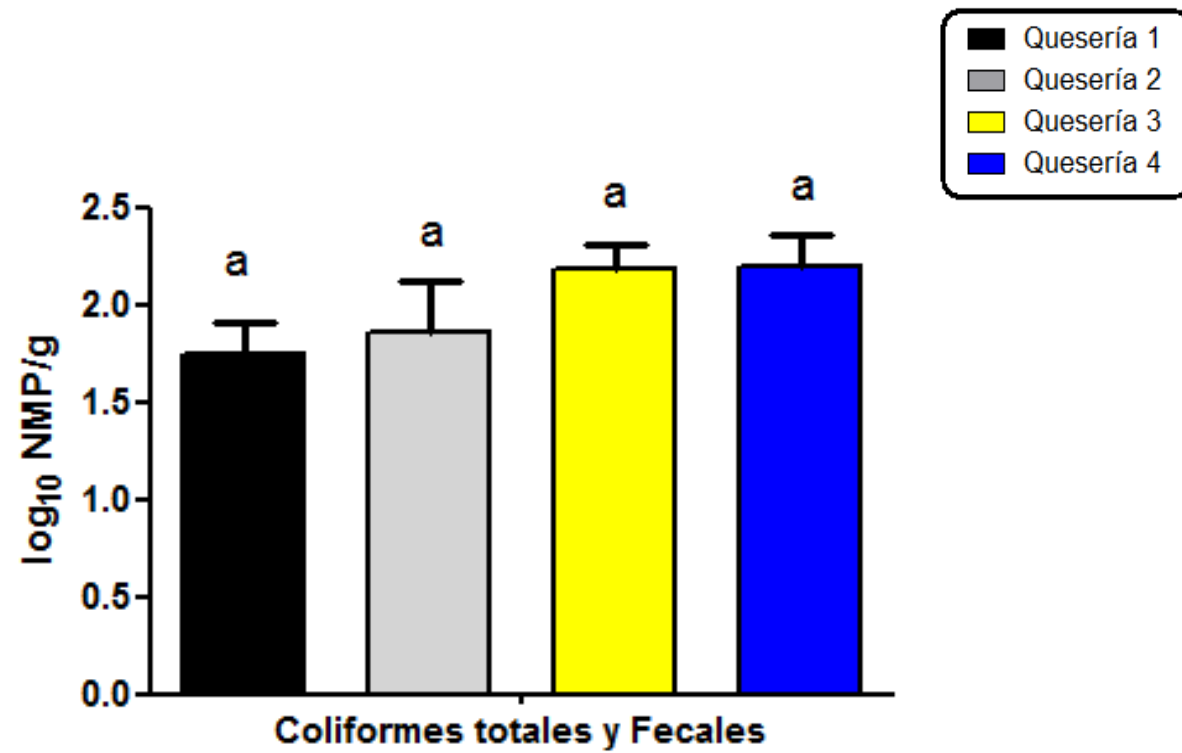


Figura 24. Presencia de coliformes totales y fecales en el queso Coccido elaborado en diferentes queserías.

El conteo de BAL en los diferentes quesos analizados (Figura 25), demostróse encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los tres géneros analizados. Para el caso de *Lactobacillus*, la quesería 4 presentó el conteo más alto (5.89 log UFC/g) el cual fue mayor al reportado por Tunick y col., 2008 (3.42 log UFC/mL). Para el conteo de *Lactococcus*, la quesería 3 presentó la mayor concentración celular el (3.92 log UFC/mL), la cual fue menor a la reportada por Tunick y col. (2008), y al Torres-Llanez y col. (2006), por 6.42 log UFC/mL y 7.66 log UFC/mL, respectivamente.

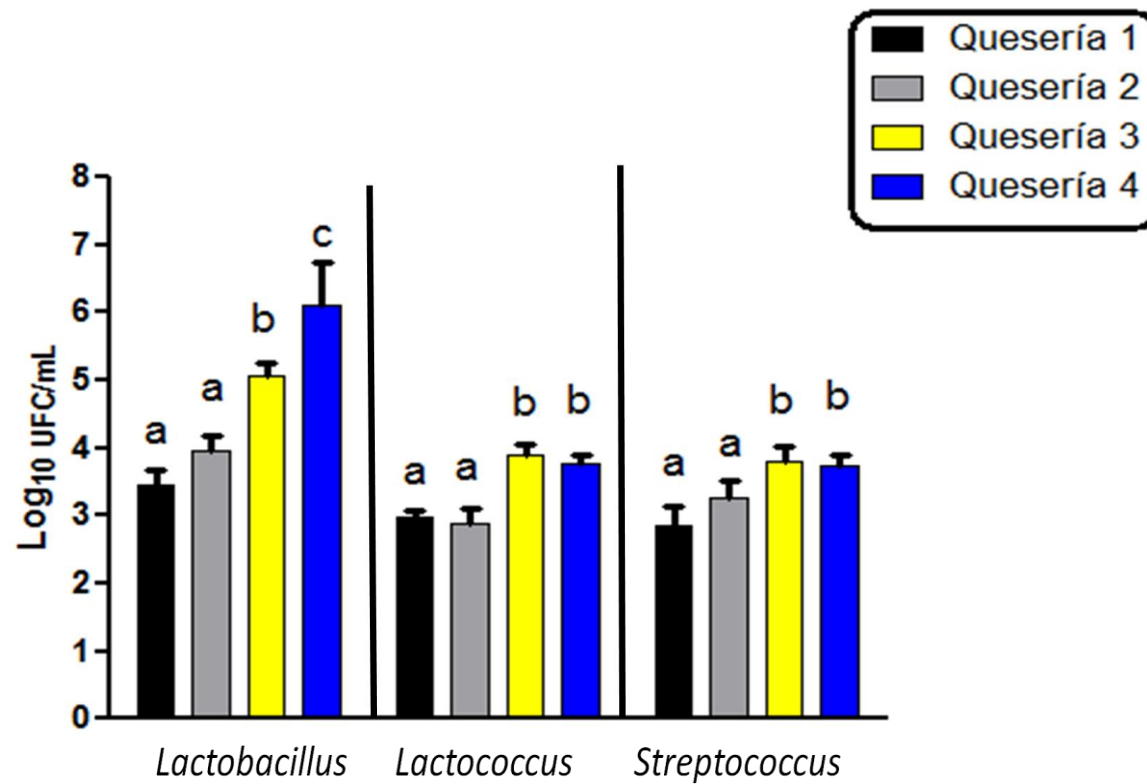


Figura 25. Conteo de BAL de queso Cocido elaborado en diferentes queserías.

## 7.2 Bacterias ácido lácticas aisladas

Como se puede observar en la tabla 7 se aislaron un total de 144 cepas a partir de las muestras provenientes de leche, suero, cuajada y queso de las diferentes queserías estudiadas.

Tabla 7. Características de las cepas aisladas de las queserías analizadas.

<b>Fuente de aislamiento</b>	<b>Número de cepas aisladas</b>	<b>Tinción de Gram</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Oxidasa</b>
<b>Leche</b>	36	(+)	(-)	(-)
<b>Suero</b>	36	(+)	(-)	(-)
<b>Cuajada</b>	36	(+)	(-)	(-)
<b>Queso</b>	36	(+)	(-)	(-)

## 6.3 Identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas aisladas

De los 48 microorganismos aislados en MRS (37 °C) se identificaron 18 cepas, de las cuales 1 pertenece al género de *Propionibacterium*, 2 al de *Bifidobacterium* y 15 al de *Lactobacillus* (Tabla 8. En comparación, Torres-Llanez y col., (2006) reportaron el aislamiento de 6 cepas de *Lactobacillus casei*, 2 de *Lactobacillus johnsonii*, 1 de *Lactobacillus jensenii*, y 15 de *Lactobacillus fermentum* a partir de queso Fresco. Mientras que Ballesteros y col., (2006) identificaron 3 de *Lactobacillus plantarum*, y 6 de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* del queso Manchego artesanal.



Tabla 8. Cepas de bacterias ácido lácticas aislados de las diferentes queserías.

<b>Código</b>	<b>Cepa</b>	<b>Confiabilidad de identificación (%)</b>
LM14	<i>Propionibacterium propionicum</i>	83.5
LM12	<i>Bifidobacterium ssp.</i>	98
LM23	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	71.5
LM21	<i>Lactobacillus casei</i>	99
SM12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	96
LM33	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	98
SM23	<i>Lactobacillus casei</i>	95.32
SM22	<i>Lactobacillus casei</i>	99.2
CM11	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	81.04
SM31	<i>Bifidobacterium ssp</i>	77.09
CM23	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	83
CM14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	88.2
MQ11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98.8
CM34	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97.3
MQ23	<i>Lactobacillus jensenii</i>	75.50
MQ12	<i>Lactobacillus casei</i>	95.58
MO32	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	90
MQ31	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	89.5

La presencia del género *Lactobacillus* se ha encontrado en una gran variedad de quesos artesanales (Rodríguez y col., 1995; Centeno y col., 1996; Marino y col., 2003). El crecimiento de *Lactobacillus* se ve favorecido a pH bajo, es capaz de crecer en concentraciones de sal y además, provee de sabor a los quesos (Beuvier y col., 1997).

Adicionalmente, de los 48 microorganismos aislados en M17 a (30 °C) se identificaron 30 cepas, de las cuales identificadas 5 fueron *Lactococcus lactis ssp lactis*, 6 *Enterococcus faecium*, 3 *Lactococcus lactis ssp cremoris*, 3 *Lactococcus lactis ssp hordniae*, 2 *Lactococcus lactis*, 2 *Leuconostoc mesenteroides* y 2 *enterococcus durans*.

Las cepas predominantes en el queso fueron *Lactococcus lactis ssp lactis* y *Enterococcus faecium*. Estas especies se encuentran presentes en la mayoría de los quesos artesanales (Torres-Llanez y col., 2006; Marino y col., 2003; Ballesteros y col., 2006), Aún cuando *Lactococcus lactis ssp. lactis* es una cepa con producción débil de ácido, es responsable de la acidificación inicial, la cual influye en el cuajado de la leche y expulsión de suero, además previene el crecimiento de microorganismos indeseables en el queso (Torres-Llanez, 2002).

Los microorganismos aislados en M17 a 42°C se identificaron 30 cepas, de las cuales 7 son *Streptococcus cremoris*, 6 *Streptococcus bovis*, 5 *Streptococcus uberis*, 5 *Enterococcus faecium* y 5 *Enterococcus faecalis*. En el estudio de Torres-Llanez y col., (2006) también se reportó la presencia de *Streptococcus uberis* en el queso Fresco.

La presencia de especies de *Streptococcus* de diferente origen (*St. uberis* y *St. bovis*), así como la presencia de diversos *Enterococcus*, confirma las condiciones no higiénicas del manejo de la leche y del proceso de elaboración del queso.

### 7.5 Evaluación sensorial

Los seis panelistas evaluaron 144 leches fermentadas con las bacterias previamente aisladas e identificadas. Los panelistas seleccionaron 18 de las 48 leches preparadas con las cepas de *Lactobacillus* que presentaban un aroma a fermentado, de las muestras preparadas con las cepas de *Lactococcus* eligieron 30, y otras 30 de las preparadas con el género *Streptococcus*.

Las leches preparadas con SM12 y CM14 (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, respectivamente) fueron seleccionadas por los panelistas como las que generaron mayor intensidad a fermentado.

## 8. CONCLUSIONES

- Las diferencias en composición entre los quesos analizados procedentes de las diferentes queserías indica que se requiere un mayor control del proceso de elaboración y una estandarización en sus materias primas.
- El conteo elevado de mesófilos aerobios, hongos y levaduras y coliformes totales y fecales en leche, suero, cuajada y queso en algunas de las queserías, ponen en evidencia las carencias sanitarias en la fabricación del queso Cocido.
- Se identificaron bacterias *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *Lactococcus lactis ssp. lactis* y *cremoris*. Con estos resultados se pretende establecer las condiciones óptimas del proceso, así como identificar las principales BAL responsables de conferir las propiedades características de este producto.
- Los resultados de este trabajo establecen el primer paso hacia una mejor comprensión de las prácticas de producción del queso Cocido, y de las poblaciones bacterianas, en particular las bacterias ácido lácticas, involucradas en el desarrollo de las cualidades organolépticas específicas de este producto lácteo.

## 9. REFERENCIAS

- Adams, M.R., Moss, M.O. 2000. Food microbiology. Ed. Royal Society of Chemistry. Reino Unido.
- Alegría A., Álvarez M. P., Sacristán N., Fernández E., Delgado S., Mayo B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 44-51.
- A.O.A.C. 2002. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Keneth Helrich (Ed). Vol. I y II.
- Ayad, E., Verhuel, A., De Jong, C., Wouters J. Smit, G. 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strain isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*. 9:725-735.
- Baduí, S. 1999. Química de los Alimentos. Ed. Longman de México Editores. México.
- Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A, Cabezas, L. 2006. Microbiological biochemical and sensory characteristics or artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control* 17: 249-255.
- Bedolla-Bernal, S. 2004. "Introducción a la tecnología de alimentos". Editorial Limusa. México, D.F.
- Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., Duboz, G. 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized of microfiltered milk. *International Dairy Journal* 7: 311-323.
- Bouton Y., Guyot P., and Grappin R. 1998. Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 123-13.
- Bylund, G. 2003. Manual de industrias lácteas. Ediciones mundiprensa.
- Cabeza, E. 2008. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica.
- Cabezas, L., Sánchez, J., Poveda, S., Seseña., Palop, M. 2007. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics or artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control* 18:11-17.
- Cervantes, E., Villegas de Gante, A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos. Ed. Mundi\_Prensa. México.
- Cremonesi P., Pisoni G., Severgnini M., Consolandi C., Moroni P., Raschetti M., and Castiglioni B. 2009. Pathogen detection in milk samples by ligation detection

- reaction-mediated universal array method. *Journal of Dairy Science*, 92, 3027–3039.
- Cuesta, P., Fernández-García, E., González de Llano, D., Montilla, A., Rodríguez, A. 1996. Evolution of the Microbiological and Biochemical Characteristic of Afuega'l Pitu Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Science* 79:1693-1698.
- Dagdemiir E. and Ozdemir S. 2008. Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal Turkish White Pickled cheese *Society of Dairy Technology*, 61,133-140.
- Duan, Y., Tan, Z., Wang, Y., Li, Z., Li, Z., Qin, G. Huo, Y., Cai, Y. 2008. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. *J. Gen. Appl. Microbiol* 54: 51-60.
- Dubach, J. 1998. Procesamiento lácteo. *Tecnologías agroalimentarias*.
- Farkye, Y. N. 2004. Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology* 57:91-97.
- FAO/WHO. 1978. Norma General del CODEX para leche, Codex Standard 243-2003. Enmienda 2008. Disponible en <http://www.codexalimentarius.net>
- Gallaro, Y., Cruz, M., Martínez, Y. 2009. Alternativas futuras para la coagulación de la leche en quesería. *Carnilac Industrial* 23: 18-33.
- González-Córdova, A. F., Torres-Llanez, M. J., Rodríguez-Figueroa, J. C., Espinoza-De-Los-Monteros, J. J., García, H. S. y Vallejo-Cordoba, B. 2010. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. *Journal of Food Science*.
- Gouldsworthy, A.M., Leaver, J., Banks, J.M. 1996. Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 6: 781-790.
- Gutiérrez-Méndez, N., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A.F., Nevárez-Moorillón, G.V., Rivera-Chavira, B. 2007. Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. *Journal of Dairy Science* 91:1-9.
- Hernández, A., Alfaro, I., Arrieta, R. 2003. *Microbiología industrial*. Ed. EUNED. San José, Costa Rica
- Lucey, J.A., Johnson, M.E, Home, D.S. 2003 Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*. 86: 2725-273.
- Marino, M., Maifreni, M., Rondinini, G. 2003. Microbiological characterization of artisanal "Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 229 133-140.

- Molina, E., Ramos, M., Alonso, L., López-Fandiño, R. 1999. Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheese made of cows', ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*. 9:613-621.
- Moreno, E.R., García, G.A., González, R.H., Acedo, F.E., Díaz, C.M. 2007. Detención de *Listeria monocytogenes* en la cadena de producción y comercialización de queso fresco. *Carnilac Industrial*.
- Oliszewsky, R, Cisint, J., Núñez de Kairúz, M. 2007. Manufacturing characteristics and shelf life of Quesillo an Argentinean traditional cheese. *Food Control*. 18:736-741.
- Olstorpe, M., Lyberg, K., Lindberg, J., Schnürer, Passoth V. 2008. Population diversity of yeasts and lactic acid bacteria in pig feed fermented with whey, wet wheat distillers' grains, or water at different temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 74:1696-1703.
- Olvera Montoya V. H.1999. Elaboración de queso Asadero con leche Pasteurizada y acidificación mixta. Tesis de Licenciatura. Chapingo, México.
- Pedero, D., Pangborn, R. 2002. Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Alhambra Mexicana. México.
- Ramírez S., Santos E. M., Zúñiga A., Román A. D., Ortiz C. M., Neria A. y Sánchez I. 2005. Aislamiento y Detección de la Actividad Antimicrobiana de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) Aisladas de Quesos. Ponencia. VII congreso Nacional de Ciencias de los Alimentos. Guanajuato, México.
- Ramos-izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibañez, E., Izquierdo-Reyes, F. 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y Ciencia* 25(2):159-171.
- Remes, Q.A. 1998. Los quesos mexicanos: riesgos de contaminación, alteraciones y control. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos* 5:19-21.
- Robinson, R. 1996. *Modern dairy technology. Advances in milk products*. Vol. 2, 2ª ed. Ed. Blackien academic and profesional. Department of Food Science and Technology, University of Reading, UK.
- Sánchez-Ponte, M.A. 2003. Maduración acelerada de quesos con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 4: 299-306.
- Secretaria de Salud. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche de vaca dispociones y especificaciones sanitarias.
- Secretaria de Salud. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones sanitarias.

- Smit G., Smit B. A., Engels W. J. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591–610.
- Scott, R.1991. Staters of cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4825-4836.
- SIAP-SAGARPA, 2002. “Panorama mundial de la Leche”. [En línea] Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/Integracion/estadisticaderivada/informaciondemercados/Analisis/anleche.html#prodmundo>
- Torres-Llañez, M.J. 2002. Diseño de un cultivo láctico para la biogeneración del sabor del queso fresco regional. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Torres-LLañez, M.J, Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A.F. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55 :111-117.
- Tunick, M., Van Hekken, D., Molina-Corral, J., Call, J., Luchansky, J., Gardea, A. 2008. Queso Chihuahua: manufacturing procedures, composition, protein profiles and microbiology. *International Journal of Dairy Technology*. 1:62-69.
- Van Hekken, D.L, Farkye, N.Y. 2003. Hispanic cheese: the quest for queso. *Food Technology* 57: 32-38.
- Veisseyre, R.1988. *Lactología técnica*. Ed. Acribia. España.
- Veljovic K., Terzic-Vidojevic A., Vukasinovic M., Strahinic I., Begovic J., Lozo J., Ostojic M. 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology* 103, 13-22.
- Villegas de Gante, A. 1993. *Los quesos mexicanos*. Ed. CIESTAAM. México.
- Villegas de Gante, A. 2004. *Tecnología quesera*. Ed. Trillas. México.
- Villegas de Gante, A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos (Necesidad de su rescate y revaloración). *Carnilac Industrial* 23: 12-19.
- Vuyst, L., Vandamme, E. 1994. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Ed. Chapman and Hall. Gran Bretaña.
- Walstra, P., Geurts, T:J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. 1999. “Dairy technology: principles of milk, properties and processes”.Ed. Marcel Dekker. USA.



## 10. ANEXOS

### Reactivo de Kovacs

Para-dimetil-amino-Benzaldehído.....	1 g
Alcohol amílico .....	80 mL
Acido clorhídrico puro.....	20 mL

Preparación: Se disolvió el para-dimetil-amino-benzaldehído en alcohol amílico. Se añadió el ácido clorhídrico. Se almacenó en un frasco ámbar y en refrigeración.