



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

---

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS  
LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

## TESIS

APLICACIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR  
BACTERIOCINOGÉNICO EN LA  
ELABORACIÓN DE QUESOS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

**EDNA ZARANNÉ MARTÍNEZ RAMÍREZ**

ASESORES:

DRA. ARMIDA ZUÑIGA ESTRADA  
M.en C. IRAIS SANCHEZ ORTEGA

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2008



---

---

**ÍNDICE GENERAL**

	Página
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	V
<b>ABREVIATURAS</b>	VI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 Bacterias ácido lácticas	3
2.1.1 Características principales de las BAL	3
2.1.2 Metabolismo de las BAL	4
2.1.3 Clasificación de las BAL	7
2.1.3.1 <i>Streptococcus</i>	7
2.1.3.2 <i>Pediococcus</i>	8
2.1.3.3 <i>Leuconostoc</i>	8
2.1.3.4 <i>Lactococcus</i>	9
2.1.3.5 <i>Lactobacillus</i>	9
2.1.3.6 <i>Carnobacterium</i>	10
2.1.3.7 <i>Vagococcus</i>	11
2.1.3.8 <i>Tetragenococcus</i>	11
2.1.3.9 <i>Weisella</i>	11
2.2 Importancia de las BAL en la industria de alimentos	12
2.2.1 Uso de las BAL como cultivos iniciadores en alimentos	13
2.2.1.1 Clasificación de los cultivos iniciadores	14
2.3 Productos fermentados con BAL	17
2.3.1 Alteraciones en productos fermentados por las BAL	18
2.4 Industria láctea en México	19
2.4.1 Industria de quesos	20
2.4.2 Microbiología de quesos	26
2.4.3 Normatividad para quesos	34

<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	35
<b>4. OBJETIVOS</b>	36
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	37
5.1. Material	37
5.1.1 Cepas	37
5.1.2 Muestras	37
5.1.3 Equipo	38
5.1.4 Material de laboratorio	38
5.1.5 Medios de cultivo	39
5.1.6 Reactivos	40
5.2. Métodos	40
5.2.1 Análisis microbiológico	42
5.2.1.1 Determinación de bacterias aerobias mesófilas	44
5.2.1.2 Determinación de mohos y levaduras	44
5.2.1.3 Determinación de bacterias ácido lácticas	44
5.2.1.4 Determinación de coliformes totales	45
5.2.1.5 Determinación de fecales y <i>Escherichia coli</i>	45
5.2.1.6 Determinación de <i>Salmonella</i>	46
5.2.1.7 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
5.2.2 Reactivación e incorporación de la cepa bacteriocinogénica en procesos industriales de elaboración de quesos	48
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	51
6.1 Análisis microbiológico	51
6.2 Reactivación e incorporación de la cepa bacteriocinogénica en procesos industriales de elaboración de quesos	57
<b>7. CONCLUSIONES</b>	65

<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	66
<b>9. ANEXOS</b>	72
9.1 Reactivación de la cepa bacteriocinogénica 110 <i>Lb. plantarum</i>	72
9.2 Incorporación de la cepa 110 <i>Lb. plantarum</i> en procesos de fabricación de productos lácteos	73
9.3 Equipos e Instalaciones de LECH CARN S. A de C. V.	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.	5
2	Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.	6
3	Proceso general de elaboración de un queso típico	25
4	Esquema global realizado a muestras de queso tipo Panela y Oaxaca	41
5	Procedimiento realizado para análisis microbiológico en las muestras de queso	43
6	Proceso de elaboración de queso Oaxaca y queso Panela en la empresa LECH CARN S. A. de C.V, utilizando la cepa 110 <i>L. plantarum</i> .	50
7	Resultados expresados en Log UFC/g de análisis microbiológicos en muestras de expendios.	54
8	Porcentaje de presencia / ausencia de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>S. aureus</i> en muestras de queso de expendios.	56
9	Muestras de queso tipo Panela y Oaxaca seleccionadas de LECH CARN S. A de C. V.	57
10	Resultados expresados en Log UFC/g de análisis microbiológicos en muestras de queso Panela de LECH CARN S. A de C.V.	60
11	Resultados de la incidencia de <i>E.coli</i> en muestras de queso Panela de LECH CARN S. A de C.V.	61
12	Resultados expresados en Log UFC/g de análisis microbiológicos en muestras de queso Oaxaca de LECH CARN S. A de C.V.	63
13	Resultados de la incidencia de <i>E.coli</i> en muestras de queso Panela de LECH CARN S. A de C.V.	64

---



---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Algunos géneros de BAL utilizados como cultivos lácticos	16
2	Cultivos que se utilizan en algunos productos lácteos fermentados	17
3	Producción de los quesos más comercializados en México en 1994-1999	21
4	Persistencia de <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 durante la elaboración de queso Oaxaca	27
5	Factores relacionados con el microorganismo, el individuo y el alimento consumido como potenciales determinantes de un incidente	31
6	Atributos que debe presentar un alimento	32
7	Especificaciones sanitarias para quesos frescos, madurados y procesados según la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994	34
8	Análisis microbiológico para quesos tipo Panela, recolectados en expendios.	51
9	Análisis microbiológico de quesos tipo Oaxaca recolectados en expendios.	52
10	Análisis microbiológico (Log UFC/g) a quesos tipo Panela elaborados con y sin la cepa 110 <i>Lactobacillus plantarum</i> .	58
11	Análisis microbiológico de coliformes fecales y <i>E. coli</i> (NMP/g) a quesos tipo Panela elaborados con y sin la cepa 110 <i>Lactobacillus plantarum</i> .	58
12	Análisis microbiológico (Log UFC/g) a quesos tipo Oaxaca elaborados con y sin la cepa 110 <i>Lactobacillus plantarum</i> .	62
13	Análisis microbiológico de coliformes fecales y <i>E. coli</i> (NMP/g) a quesos tipo Oaxaca elaborados con y sin la cepa 110 <i>Lactobacillus plantarum</i> .	62

---

**ABREVIATURAS**

°C	Grados Celsius
ARVB	Agar de Bilis y Rojo Violeta
BAL	Bacterias ácido lácticas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
EMB	Agar de Eosina y Azul de Metileno
EPM	Vía Embden-Meyerhof-Parnas
FDA	Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos
GRAS	Generalmente Reconocidas Como Seguras
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
µL	Microlitros
LIA	Agar de Hierro y Lisina
min	Minutos
mL	Mililitros
MRS	Medio de Man-Rogosa-Sharpe
NOM	Norma Oficial Mexicana
TSI	Agar de Hierro y Triple Azúcar
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram positivas que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas, las cuales son aprovechadas en la industria para la fabricación y conservación de los alimentos (Axelsson, 1993).

Las BAL son capaces de producir una gran variedad de compuestos que contribuyen a dar sabor, color, textura y consistencia a los alimentos fermentados; es por ello que han sido ampliamente utilizados como cultivos iniciadores (Yang 2000).

La finalidad de estos microorganismos es la producción de diversos metabolitos a partir de lactosa, llevando a cabo la fermentación deseada (Jay, 2000).

Entre las BAL comúnmente utilizadas para la producción de alimentos fermentados se encuentran los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, las cuales han sido aisladas de granos, plantas vegetales fermentados, productos lácteos, productos cárnicos y mucosas de animales (Jay ,2000; Amador y col. ,1993).

Algunas cepas de BAL producen compuestos de naturaleza proteica, que tienen actividad bactericida o bacteriostática contra otras bacterias, por lo general taxonómicamente relacionadas, conocidas como bacteriocinas. Numerosas cepas de BAL han sido estudiadas por su bacteriocinogenicidad, ya que se ha observado que son capaces de producir bacteriocinas con actividad contra patógenos transmitidos por los alimentos (Nettles y Barefoot, 1993).

En los productos perecederos como los quesos, que por su composición son altamente susceptibles a la contaminación de microorganismos patógenos o deterioradores, se presentan una alternativa para mejorar su calidad microbiológica y alargar su vida de anaquel, debido a que las bacteriocinas pueden utilizarse como conservadores naturales, o bien, las cepas de BAL bacteriocinogénicas pueden emplearse como cultivos iniciadores, llevando a cabo el proceso denominado bioconservación (Stiles, 1996).

Por tanto, el objetivo del presente trabajo consiste en utilizar una cepa de *Lactobacillus plantarum* en el proceso de obtención de quesos tipo Oaxaca y Panela observando su actividad inhibitoria contra bacterias patógenas o deterioradoras potencialmente presentes en el proceso de fabricación de quesos.

Para tal fin, se emplearán las instalaciones de la empresa LECH CARN S.A de C.V donde se realizarán los procesos de elaboración de quesos tipo Oaxaca y Panela.

Con esto, se pretende ofrecer una opción para fomentar el uso de la cepa *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador, incorporada en la elaboración de quesos frescos y brindar a su vez un producto final inocuo, de larga vida de anaquel y con un valor añadido para el consumidor.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) fueron descubiertas por Louis Pasteur en 1857, sin embargo el hombre las ha empleado a través del tiempo, para elaborar algunos alimentos fermentados. Dentro de las bacterias ácido lácticas usadas para la fermentación de alimentos, destacan los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Vagococcus* (Hoover y Steenson, 1993; Nettles y Barefoot, 1993)

#### 2.1.1 Características principales de las BAL

Constituyen un grupo natural de bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles, no esporulados, que al fermentar los azúcares forman principalmente ácido láctico, son catalasa y oxidasa negativos, sin citocromos, anaerobias pero aerotolerantes, acidúricas y estrictamente fermentativas con producción de ácido láctico como principal producto final. Se desarrollan bien en un hábitat rico en nutrientes (cárnicos y lácteos) y mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, intestino y vagina (Jay, 2000).

Las BAL son mesófilas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 5° C y otras a temperaturas tan altas como 45° C. Con respecto a su pH de crecimiento, algunas crecen a pH 3, otras a pH entre 6 y 9, pero la mayoría crecen en valores de pH entre 4 y 4.5. Las BAL son débilmente proteolíticas y lipolíticas (Jay, 2000).

Son microorganismos exigentes en sus demandas nutricionales, requieren de carbohidratos, aminoácidos preformados, bases nitrogenadas, vitaminas del grupo B y una variedad de factores de crecimiento (Jay ,2000; Amador y col., 1993).

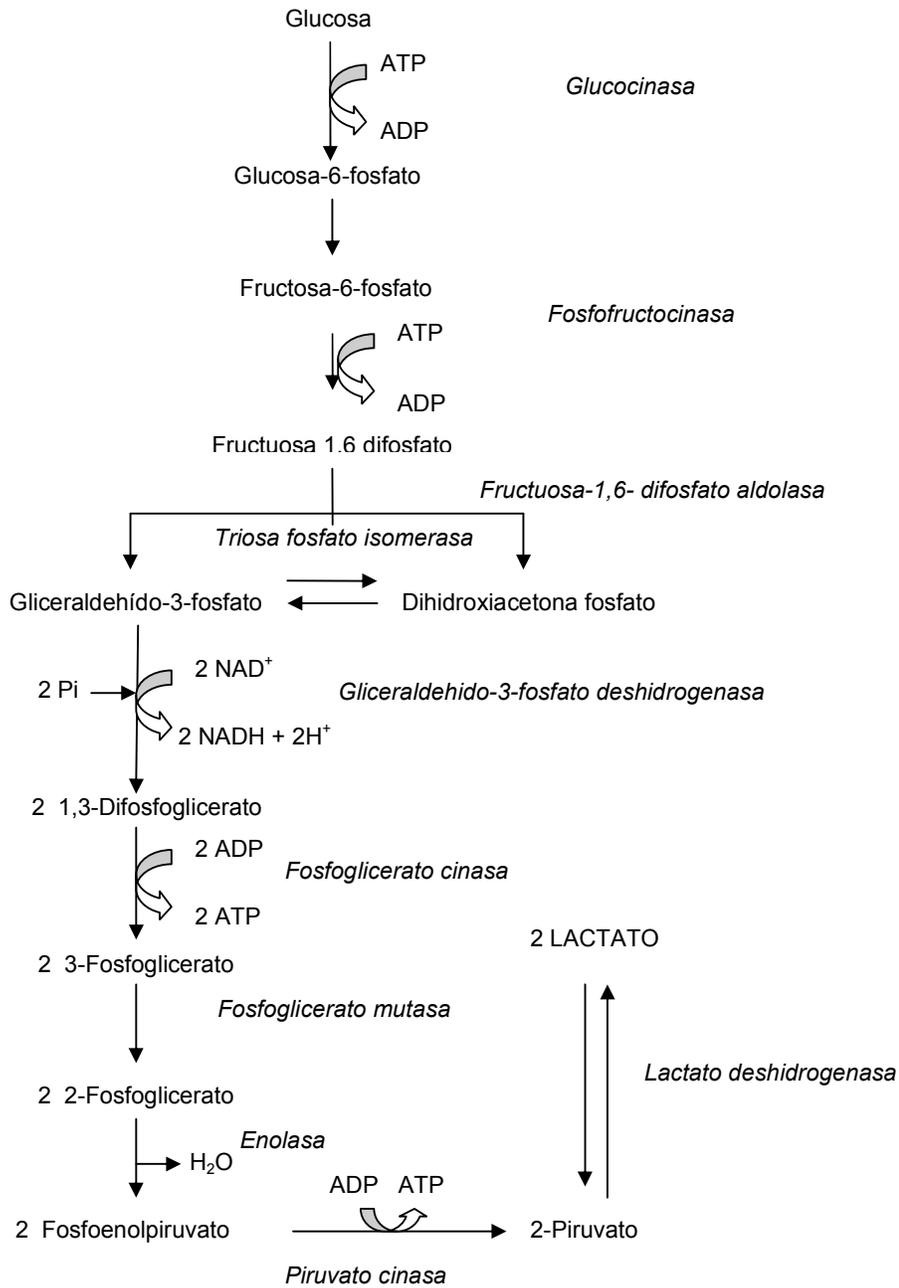
Existen diversas características que nos permiten diferenciar los géneros de las BAL, como la forma de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y el crecimiento a diferente pH, entre otros (Jay, 2000).

### 2.1.2 Metabolismo de las BAL

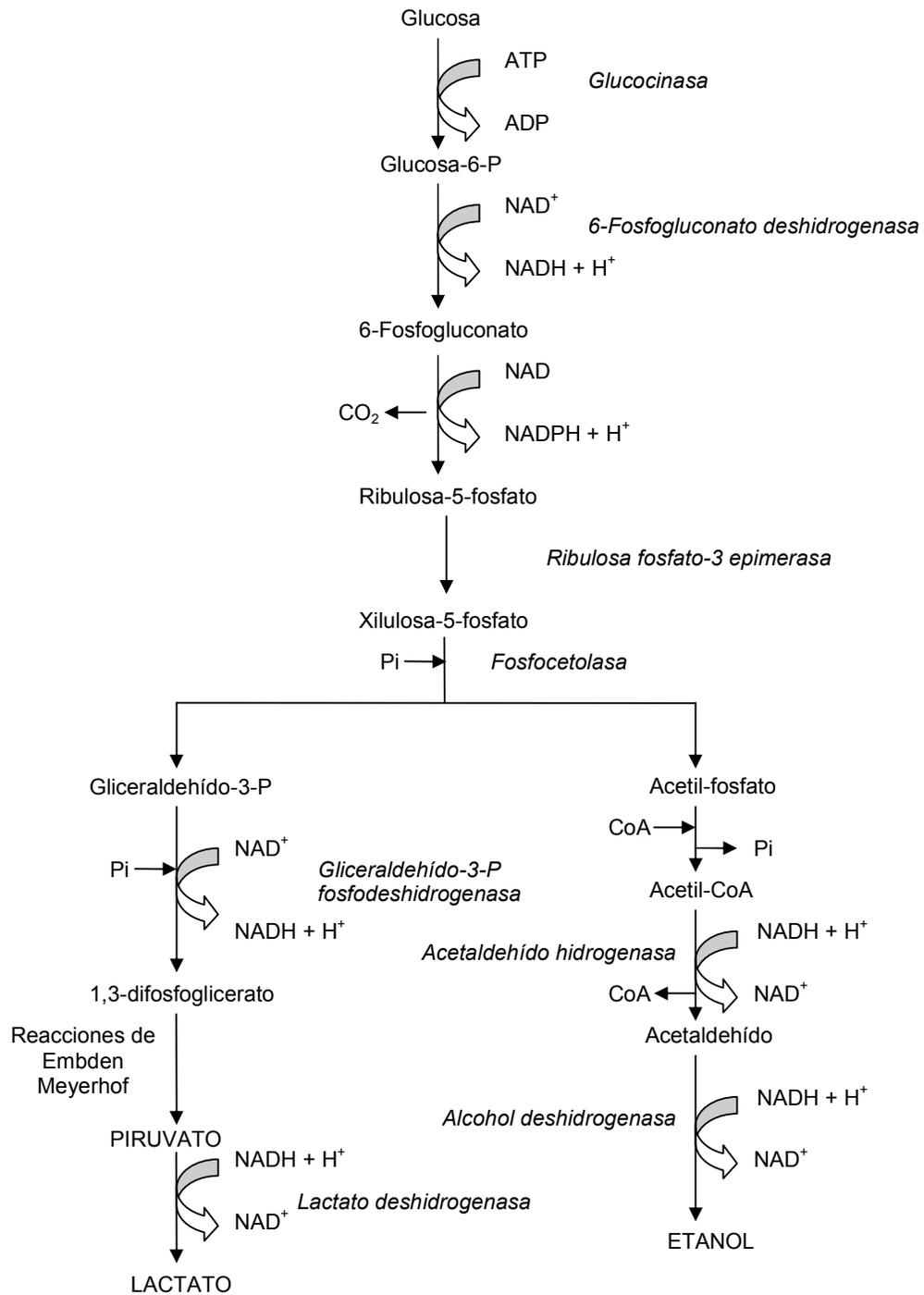
La fermentación es el proceso metabólico en el que los carbohidratos y los compuestos afines son oxidados con liberación de energía, en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente en el desdoblamiento de los carbohidratos. En la fermentación se produce la oxidación incompleta del compuesto originario y solamente una pequeña cantidad de la energía es liberada durante el proceso (Jay, 2000).

Las BAL se dividen, con base en los productos finales del metabolismo de la glucosa, en los siguientes grupos:

- Homofermentativas: Producen ácido láctico como principal o único producto de la fermentación de la glucosa. Utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Poseen enzimas aldolasa y hexosaisomerasa, carecen de fosfoctolasa. Es posible cambiar el carácter homofermentativo de estas bacterias modificando condiciones de cultivo como concentraciones de glucosa, pH y restricción de nutrientes (Leveau y Bouix, 2000)(Figura 1).
- Heterofermentativas: Aquellas que transforman la glucosa a partir de las hexosas, en ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido fórmico, succinato, y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Axelsson, 1993). Las bacterias heterolácticas tienen la enzima fosfoctolasa pero no poseen aldolasa ni hexosaisomerasa y, en lugar de degradar la glucosa por vía de EMP, utilizan la vía del monofosfato de hexosas o de las pentosas. Todas las especies de *Leuconostoc*, así como algunos lactobacilos, son microorganismos heterofermentativos. (Leveau y Bouix, 2000) (Figura 2).



**Figura 1.** Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Axelsson, 1993)



**Figura 2.** Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Axelsson, 1993).

### 2.1.3 Clasificación de las BAL

El grupo de las BAL esta conformado por los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus* y *Carnobacterium*. El género *Bifidobacterium* se agrupa en ocasiones con las bacterias lácticas debido a su empleo en alimentos y su papel prebiótico en el intestino humano aunque filogenéticamente está muy alejado del resto de géneros de bacterias lácticas (Jay, 2000).

Las BAL están representadas por varios géneros de importancia. Sus células son cocos; como es el caso de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, o bacilos; como el género *Lactobacillus* (Leveau y Bouix, 2000).

#### 2.1.3.1 *Streptococcus*

Primera bacteria reconocida por los microbiólogos. En 1884 Rosenbach utilizó el nombre genérico de *Streptococcus*. Originalmente el género *Streptococcus* fue descrito basándose en la morfología y características fisiológicas y bioquímicas. Comprende un rango extenso de organismos incluyendo algunas bacterias patógenas como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. agalactiae*; así como *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. cremoris*, *S. lactis* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Son cocos de 0.8-1.2  $\mu\text{m}$ , dispuestos en cadenas hasta con más de 50 células o en pares, anaerobios facultativos, especies comensales del hombre y animales en mucosas (boca, tractos alimenticio, urinario y respiratorio). Resultan de gran interés las especies *S. pyogenes*, por su intensa actividad betahemolítica, como patógeno transmitido por los alimentos a partir de fuentes humanas y *S. agalactiae* de fuentes animales primariamente. La especie de *S. thermophilus* es un termófilo, con cepas específicas utilizadas en la fermentación de productos lácteos, sobre todo en combinación simbiótica con otras BAL. Por ejemplo *Lactobacillus. bulgaricus* estimula al estreptococo liberando aminoácidos mientras que este forma compuestos relacionados con el ácido fórmico, que promueven el desarrollo del lactobacilo, lo cual se conoce como protooperación, propiedad aprovechada en la elaboración del yogur.

### **2.1.3.2 *Pediococcus***

Primera bacteria estudiada por Louis Pasteur. Son bacterias homofermentativas y con la excepción de *Pediococcus dextranicum* el cuál produce ácido láctico L(+), todas las especies de éste género producen DL-lactato a partir de la glucosa.

Son cocos de 1.0-2.0  $\mu\text{m}$ , se dividen alternativamente en dos planos perpendiculares dando lugar a la formación de tétradas, raramente se observan células aisladas, anaerobio facultativo: cepas inhibidas en presencia de oxígeno, homofermentativo, algunas cepas productoras de bacteriocinas. Empleado como cultivo iniciador de salchichas semisecas, deteriorador de cerveza y sidra (Stiles y Holzapfel, 1997).

Requieren medios complejos para desarrollarse, no patógenos, pero con actividad descarboxilasa intensa de la que resultan aminas biogénicas (Raccach, 1987).

### **2.1.3.3 *Leuconostoc***

Sus células son cocos en pares o en cadenas pero esta bacteria es heterofermentativa y produce ácido D (-) láctico, etanol y  $\text{CO}_2$ . Estas especies son mesófilas, cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre 20 y 30 ° C y se caracterizan por la producción de diacetilo y a veces de acetato a partir del citrato de la leche (Stiles y Holzapfel, 1997).

Están muy relacionadas con el género *Lactobacillus* cuyas formas cocoides y heterofermentadores pueden confundirse con *Leuconostoc*. Involucrados en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma controlada en la fabricación de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables. Su desarrollo es más lento que otras BAL, las cuales suelen desplazarlo en cultivos mixtos. Recuperable de vegetales, productos cárnicos y lácteos, ensilados, vinos y productos fermentados.

#### **2.1.3.4 *Lactococcus***

Bacteria ácido láctica por excelencia de la leche; es la BAL más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular quesos y leches.

Son células ovoides que aparecen aisladas, en pares o en cadenas. Algunas cepas forman material gelatinoso que les rodea a manera de cápsula. Recuperables de leche cruda y algunas plantas, no se aíslan de la materia fecal. Homofermentativos.

Incluye diversas especies como: *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* y *Lc. raffinolactis* (Schleifer y col., 1985; Williams y col., 1990). La especie *Lc. piscium* existe en peces. Se comportan como auxótrofos para diversos aminoácidos y son también dependientes de diversas vitaminas (Stiles y Holzapfel, 1997).

#### **2.1.3.5 *Lactobacillus***

Bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos, con requerimientos nutricionales complejos. Incluyen especies homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas.

Alrededor de 50 especies conforman el género, se aíslan de productos lácteos, cárnicos y de pescados, aguas, frutas, verduras y ensilados. Son frecuentes en la cavidad oral, contenido intestinal y vagina de mamíferos. Las especies homofermentativas están asociadas con el hombre y animales. Las especies heterofermentativas con los alimentos, en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente bajo refrigeración de productos empacados. Las especies heterofermentativas obligadas son comunes en productos lácteos, cereales y verduras fermentadas y tracto intestinal.

Las especies del género *Lactobacillus* se encuentran principalmente en alimentos con pH 4.0; también son usados como cultivos iniciadores en diversas variedades de queso (Stiles y Holzapfel, 1997).

La taxonomía de este género esta basada en características fenotípicas por lo que se han clasificado de la siguiente manera (Stiles y Holzapfel, 1997):

Grupo 1.- Incluye lactobacilos homofermentativos obligados, éstos fermentan exclusivamente glucosa generando ácido láctico, y no pentosas. Este grupo esta representado principalmente por las especies: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. helveticus*.

Grupo 2.- Incluye lactobacilos heterofermentativos facultativos, éstos fermentan hexosas para producir ácido láctico y también producen gas a partir de gluconatos pero no de glucosa. Además de fermentar pentosas para producir ácido láctico y ácido acético. Las especies más importantes y relacionadas con alimentos son: *Lb. casei* (asociado a productos lácteos, participa en la fermentación de algunos quesos o causar deterioro por fermentación de citrato) y *Lb. plantarum*.

Grupo 3.- Incluye lactobacilos heterofermentativos obligados, éstos fermentan hexosas para producir ácido láctico, ácido acético y etanol además de dióxido de carbono. La producción de gas a partir de glucosa es una característica distintiva de éste grupo.

#### **2.1.3.6 *Carnobacterium***

Son bacilos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0  $\mu\text{m}$ ; en cultivos viejos se alargan y tienden a perder el Gram, psicrótrofos y de metabolismo predominantemente homofermentativo, menos rigurosos en sus demandas nutricionales y de intolerancia al oxígeno.

Este género se origino del género *Lactobacillus* cuando se observaron diferencias significativas en cepas aisladas de carnes empacadas. Tienen capacidad de crecimiento a pH 9.0, no a pH 4.5 y no se multiplican a 45 °C. Algunas especies producen gas a partir de la glucosa, son incapaces de crecer en un medio con acetato y sintetizan ácido oleico.

Las especies más importantes de este género son: *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile* (Stiles y Holzapfel, 1997).

### **2.1.3.7 *Vagococcus***

Este género comprende a bacterias Gram positivos, catalasa negativa, anaerobias facultativas, con células ovoides dispuestas individualmente, en pares y cadenas (Bascomb y Manafi, 1998). Presentan motilidad, reaccionan con antisuero N, tienen un contenido de G-C en ADN de aproximadamente 34 mol %. Crecen en medios con una concentración de NaCl de 6.5% a una temperatura óptima de 10 °C, presentando poco desarrollo a temperaturas mayores de 40°C (Facklam y Elliott, 1995).

### **2.1.3.8 *Tetragenococcus***

Especie incluida en el género *Enterococcus*. Consiste en bacterias Gram positivas, con células ovoides dispuestas en pares o tétradas, son catalasa negativa, anaerobias facultativas. Para su crecimiento requiere NaCl a una concentración de 18%. Es el género más relacionado con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* que con *Lactobacillus*. Se diferencian del género *Pediococcus* por su incapacidad para crecer en medios con vancomicina; sin embargo comparten diferentes características fisiológicas (Facklam y Elliott, 1995).

### **2.1.3.9 *Weissella***

El género comprende bacterias Gram positivas, catalasa negativa, anaerobias facultativas, que fueron separadas de otros géneros por diferencias genéticas. Siendo las siguientes, las especies más importantes: *Weissella confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis* y *W. viridescens* (Björkroth y col., 2002).

## 2.2 Importancia de las BAL en la industria de alimentos

En la industria de los alimentos, las BAL se emplean como cultivos iniciadores para la elaboración de productos alimenticios fermentados como yogur, leches, mantequillas, y quesos madurados, col agria, embutidos (como el salami y chorizo) y bebidas alcohólicas como la cerveza, sidra, entre otros, donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos (Amador y col., 1993; Hammes y Tichaczek, 1994).

La importancia Industrial del uso de las BAL radica en su aplicación en las siguientes áreas (Amador y col., 1993):

- Farmacéutica.- Las necesidades nutricionales de las bacterias lácticas son tan estrictas que algunas cepas son utilizadas en el análisis cuantitativo de aminoácidos y vitaminas en diferentes medicamentos.
- Alimenticia.- El desarrollo de bacterias lácticas en los alimentos, propicia un acentuado ambiente hostil para el crecimiento y la sobrevivencia de las bacterias patógenas. Los efectos inhibitorios y destructivos no solo son el resultados de una acidificación del medio, otros mecanismos pueden intervenir, y entre ellos se cuentan la producción de peróxido de hidrógeno, antibióticos, ácidos grasos, bacteriocinas y agotamiento de nutrientes, lo que provoca un aumento en la vida de anaquel de los productos

Dentro de las alteraciones que pueden provocar las BAL en los productos alimenticios, se constituyen las siguientes (Amador, 1993):

- Agriado de productos lácteos, frutas y alimentos perecederos.
- Espesamiento en productos que contienen líquidos azucarados, como los almíbares.
- Mucosidad y enverdecimiento de embutidos
- Coloración indeseable en quesos.
- Malos olores, acidez y turbidez, en vinos y productos de salmuera, y coloración roja en encurtidos, entre otras

A pesar de la utilidad de las BAL para la industria de los alimentos, es reconocida la dificultad que representa el cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales (Hammes y Tichaczek, 1994).

En los humanos, las bacterias lácticas se localizan en el intestino, cavidad oral y vagina, jugando un papel importante directa e indirectamente en la salud. Algunos de los posibles efectos benéficos de las bacterias en tracto intestinal se mencionan a continuación (Amador y col., 1993; Hammes y Tichaczek, 1994):

- Producción de bacteriocinas y otros compuestos inhibidores.
- Producción de ácidos orgánicos con actividad antimicrobiana especialmente sobre bacterias Gram negativas patógenas.
- Actividad antagonista contra bacterias indeseables a través de competencia por nutrientes.
- Producción de enzimas útiles en la predigestión de proteínas, carbohidratos y lípidos de la leche, lo que permite a un individuo con intolerancia a la lactosa consumir leche o productos derivados.

### **2.2.1 Uso de BAL como cultivos iniciadores en alimentos**

De manera general, un cultivo iniciador puede definirse como una cepa de microorganismos que se propaga o cultiva para inocularse en la leche de proceso, y así poder orientar o controlar una fermentación deseada la cual impartirá propiedades sensoriales atractivas en un producto lácteo (Alais, 2003)

Un cultivo láctico es, un cultivo puro de una o más bacterias lácticas, en proporciones definidas que al multiplicarse en la leche, crema o queso, asegura dos funciones esenciales:

- Abatir el pH del medio, al transformar la lactosa en ácido láctico. La acidificación promueve la gelificación de la leche en el yogur y la sinéresis (retracción de la red proteica) en la cuajada quesera.
- Contribuir con las características sensoriales de los productos lácteos: crema, leches fermentadas y queso, liberando enzimas o metabolitos que participan directamente en la maduración del producto (Villegas, 2004)

Las BAL son utilizadas ampliamente en la industria para realizara procesos de fermentación en un gran número de productos de origen animal o vegetal. Sin embargo, la adición de estos microorganismos tiene diferentes propósitos. Los géneros de BAL más empleados son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Champagne, 1998).

Los cultivos iniciadores se utilizan en la elaboración de mantequilla cultivada, de requesón y de crema agria cultivada, dichos cultivos incluyen bacterias que convierten la lactosa en ácido láctico, habitualmente *L. lactis*, *L. cremoris* o *L. diacetylactis*; así como en aquellos productos lácteos en los que los compuestos responsables del aroma y del sabor, como por ejemplo el diacetilo, son deseados, el cultivo iniciador incluirá una especie bacteriana heteroláctica como: *Leuc.citrovorum*, *Leuc. diacetylactis* o *Leuc. dextransicum* Por lo anterior el uso de cultivos iniciadores se ha aplicado en fermentaciones durante muchos años en todos los países del mundo (Jay, 2000).

### **2.2.1.1 Clasificación de los cultivos iniciadores**

Existen varios criterios para clasificar a los cultivos lácticos; dos muy comunes son (Villegas, 2004):

- Según los productos naturales de su metabolismo
  - a) Cultivos acidificantes. Compuestos por bacterias predominantemente acidificantes, de una especie o más, por ejemplo, *Lactococcus lactis* spp *lactis* y *Lactococcus lactis* spp *cremoris*, juntas; *Streptococcus salivarius* spp *thermophilus*, solo o acompañado con *Lactobacillus delbrüeckii* spp. *bulgaricus*; *Lactobacillus helvericus*.
  - b) Cultivos aromatizantes. Compuestos por especies heterofermentativas que, además de producir cierta cantidad de ácido láctico, producen sustancias aromáticas, como diacetilo. Por ejemplo, una mezcla de *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris*.

- Según la pureza del cultivo, en cuanto a tipo y número de especies o subespecies:
  - a) De cepa simple. Si solamente contienen una especie como ejemplo: *Lc. lactis* o *Lb. helveticus*.
  - b) De cepa múltiple. Si contiene bacterias del mismo género, pero de diferente especie o subespecie. Por ejemplo: *Lactococcus lactis* spp *lactis* y *Lactococcus lactis* spp *cremoris*.
  - c) De cepa mixta. Si presentan una mezcla de diferentes géneros, como *Streptococcus salivarius* spp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrüeckii* spp *bulgaricus*.

Actualmente los cultivos iniciadores pueden hallarse en el mercado en las siguientes presentaciones:

- Cultivos liofilizados. Se presentan como un polvo fino, con una humedad máxima de 2%; se conservan por varios meses a temperatura de 4°C, debido a que el proceso de liofilización, consiste en eliminar el agua del medio acuoso congelado sometándolo a un alto vacío que hace pasar el agua del estado sólido al estado gaseoso sin pasar por un estado líquido. La forma más sofisticada para comercializar los cultivos es en forma liofilizada.
- Cultivos congelados. Son cultivos mantenidos a temperaturas menores de – 40°C, en un medio que contiene agentes crioprotectores, como el nitrógeno líquido.

En la tabla 1, se muestran algunos de los microorganismos que en la actualidad están siendo utilizados como cultivos iniciadores.

**Tabla 1.-** Algunos géneros de BAL utilizados como cultivos lácticos (Tomada de Villegas, 2004).

	MESÓFILOS	TERMÓFILOS
	<i>Lactobacillus</i>	
Homofermentativos	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. lactis</i> <i>Lb. acidophilus</i>
	<i>Streptococcus</i>	
	Estreptococos: <i>S. cremoris</i> <i>S. lactis</i> <i>S. diacetylactis</i>  Enterococos: <i>S. faecalis.</i> <i>S. faecium</i> <i>S. durans</i>	Estreptococos: <i>S. thermophilus</i>
Heterofermentativos	<i>Leuconostoc</i> <i>Leuc.cremoris</i> <i>(citrovorum)</i> <i>L.euc.lactis</i> <i>(paracitrovorum</i> o <i>dextranicum)</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	
	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. fermentum</i>

### 2.3 Productos fermentados con BAL

Numerosos productos alimenticios deben su producción y características a la actividad fermentativa de microorganismos como las BAL (Tabla 2). Algunos alimentos como los quesos fermentados, los encurtidos, la col agria y los embutidos fermentados, son productos conservados cuya durabilidad se prolonga considerablemente con respecto a la de las materias primas de las cuales están hechos. Además de hacerlos más durables, todos los alimentos fermentados tienen un aroma y un sabor característico que resulta directa o indirectamente de los organismos fermentadores (Jay, 2000).

**Tabla 2.-** Cultivos que se utilizan en algunos productos lácteos fermentados (Tomada de Frazier y Westhoff, 2000).

CULTIVO	MISIÓN DEL CULTIVO	APLICACIÓN
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Sabor y formación de orificios.	Queso Emmental (suizo)
<i>Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus</i> <i>Lb. lactis</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. brevis</i>	Acidez y sabor	Yogur, kumiss y quesos Emmental e italiano Kéfir
<i>Lb. acidophilus</i>	Acidez	Suero de mantquilla ácido, queso Emmental, Cheddar e italiano y yogur.
<i>Streptococcus termophilus</i>	Acidez	Nata agria, suero de mantequilla madurada, queso y suero de mantequilla.
<i>S. lactis spp. diacetylactis</i>	Acidez y sabor	Suero de mantequilla cultivada, nata agria, requesón, quesos
<i>S. lactis spp lactis</i>	Acidez	Suero de mantequilla cultivada, nata agria, requesón, quesos
<i>S. faecium</i> <i>S. faecalis</i>	Acidez y sabor	Queso blandos italianos, Cheddar y suizo.
<i>Leuconostoc cremoris</i>	Sabores	Suero de mantequilla cultivado y mantequilla madurada.

### 2.3.1 Alteraciones en productos fermentados por BAL

La elaboración de productos fermentados depende de una fermentación o de una serie de fermentaciones apropiadas. Cualquier anomalía en estas fermentaciones influirá en la calidad de dichos productos e incluso puede alterarlos. Así mismo, el producto acabado puede estar expuesto a alteraciones debidas a microorganismos (Frazier y Westhoff, 2000).

Las clases de alteración de los quesos como productos fermentados se pueden dividir en aquellas que aparecen durante la elaboración y la maduración y aquellas que se presentan en el producto terminado.

- Durante la elaboración de la mayoría de los tipos de quesos, es estimulada la fermentación láctica. Si las bacterias lácticas carecen de actividad o la contaminación con otros microorganismos es indebidamente abundante, en el queso pueden darse alteraciones negativas para su calidad. En el queso que se elabora con leche sin pasteurizar, es posible que los microorganismos productores de gas sean los causantes de sabores anormales así como de la presencia de orificios en la cuajada como consecuencia de la producción de gas. Las levaduras que fermentan la lactosa, si bien no suelen encontrarse en la cuajada en gran cantidad, también pueden ocasionar la alteración gaseosa de los quesos. Si las bacterias lácticas no tienen la suficiente actividad, las bacterias esporógenas que producen gas, sobre todo las del género *Clostridium*, son capaces de provocar alteraciones tanto en los quesos elaborados con leche sin pasteurizar como en los elaborados con leche pasteurizada; con menor frecuencia, los aerobacilos, especies esporógenas del género *Bacillus*, como por ejemplo *B. polymyxa*, pueden producir gas en los quesos y originar otros defectos. Es posible que otras bacterias compitan con los microorganismos del fermento. Así por ejemplo, en el queso Cheddar elaborado con leche pasteurizada, las bacterias proteolíticas pueden producir un sabor amargo, y las especies del género *Leuconostoc* pueden producir orificios y grietas. La proteólisis, la producción de gas, la viscosidad y los sabores anormales pueden estropear el producto. Con frecuencia algunas bacterias de la flora propia del suelo o del agua, como por ejemplo *Pseudomonas*, *P. fragi* y *Alcaligenes metalcaligenes*, vuelven gelatinoso o viscoso al queso cuya acidez es excesivamente baja como consecuencia de

la adición de nata o como consecuencia de la falta de fermento (Frazier y Westhoff, 2000).

- Durante la maduración o curación el crecimiento de microorganismos distintos a los deseados da como resultado un queso de calidad inferior y, en casos extremos, un queso sin valor como consecuencia de alteraciones en su textura, consistencia, aspecto general o en sabor. Las alteraciones más importantes son bastante distintas según la clase de queso, de ahí que no se pueda generalizar. Las cavidades producidas por el gas u orificios del queso, son deseables en el queso suizo y quesos emparentados, aunque no lo son en algunas otras variedades. La producción de gas por parte de bacterias esporógenas va acompañada de la producción de sabores indeseables, como el sabor a ácido butírico originado por bacterias anaerobias (Frazier y Westhoff, 2000).

## **2.4 Industria láctea en México**

La industria láctea a nivel nacional es la tercera actividad más importante en la industria de los alimentos. Los principales productos lácteos obtenidos de esta industria son leche fluida 39%, yogur 15 %, leche en polvo 14%, queso 12%, crema 4% y otros 16% (<http://www.inegi.gob.mx>, Agosto 2007)

Los productos lácteos constituyen sustratos de crecimiento microbiano muy diferentes a la leche líquida, ya que en ocasiones están muy concentrados o tienen un pH y una actividad de agua ( $a_w$ ) menores.

Según estadísticas realizadas por el Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) muestran que la producción de leche de bovino en el Estado de Hidalgo fue de 413,567 litros durante el año 2005 y ocupando el lugar número 8 en cuanto a la producción nacional (<http://www.sagarpa.gob.mx>., Agosto 2007).

La producción nacional de leche deriva de tres sistemas bien diferenciados: el intensivo, el familiar o de traspatio y el extensivo, o de doble propósito. Cada uno de estos sistemas de producción presenta sus propias características tecnológicas y socioeconómicas; de igual manera, su contribución a la producción interna es distinta.

El sistema intensivo se localiza en el norte del país Coahuila, Durango, Chihuahua y Aguascalientes principalmente y aporta la mayor parte de leche para pasteurización que se consume en los principales centros urbanos del país. Presenta una gran productividad, usa intensivamente la tecnología. Está ligado a la industria procesadora más moderna y dinámica.

El sistema de traspatio se localiza principalmente en Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Estado de México y otros estados. Se sustenta en el uso de alimentos balanceados y esquilmos (pastoreo) agrícolas. Una gran parte no cuenta con equipo de enfriamiento y presenta deficiencias de control sanitario en la producción. Requiere de una fuerte reconversión en las formas de producir que perjudican a la calidad y a la productividad, no solo de la leche, sino también de sus derivados.

En tanto el sistema extensivo esta basado en el doble propósito obtención de leche y carne. Su productividad es baja por las lactancias cortas y el limitado rendimiento. También sufre de problemas de calidad, conservación, colectación y comercialización de la leche. Tiene gran rezago tecnológico y productivo (Villegas, 2004).

#### **2.4.1 Industria de quesos**

Una de las ramas de la industria láctea que depende en gran manera de la actividad de los microorganismos, es la industria de los quesos. De acuerdo a la FAO/OMS el queso se define como “producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos”. Una gran variedad de ellos han sido elaborados bajo la actividad enzimática de diversas especies bacterianas y fúngicas (Veisseyre, 1990).

Nutricionalmente, los quesos están considerados dentro del grupo de alimentos de la carne, ya que en ellos se concentran las proteínas y las grasas, y la porción que aportan es de 30 a 60 g. Independientemente del tipo de queso el contenido de nutrimentos varía en cada uno de ellos. El consumo regular en México, es a base de quesos frescos como el panela, Oaxaca, doble crema, añejo, así como el Chihuahua y Manchego (Ayala, 2003).

En México se elaboran más de una treintena de tipos diferentes de quesos, la mayor parte artesanales y de difusión regional (Tabla 3).

**Tabla 3.**-Producción de los quesos más comercializados en México en 1994-1999 (Tomada de Villegas, 2004).

QUESO	Volumen (toneladas)	
	1994	1999
Fresco	44 088	44 291
Chihuahua	10 790	10 023
Oaxaca	9 993	13 147
Panela	8 881	10 642
Manchego	14 842	9 114
Doble crema	14 637	15 327
Amarillo	15 084	23 099

FUENTE INEGI. Indicadores de la Encuesta Industrial Mensual por División y Clase de Actividad Económica.

Los quesos difieren en sus características físicas y señoriales como color, textura, sabor, aroma y consistencia, generalmente muestran un pH de 5.4 a 6.0 y niveles de humedad generalmente menores a 55% (Fernández, 2000). Los quesos pueden elaborarse con leche entera, parcialmente descremada, semidescremada, descremada, crema o doble crema y su clasificación es la siguiente de acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994:

- Fresco.- Se caracteriza por su elevado contenido de humedad, sabor suave y un periodo de vida de anaquel corto, por lo que debe estar refrigerado. Se consideran como quesos frescos: Canasto, Panela, Fresco, Ranchero, Sierra, Blanco, Enchilado, Adobado, Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Morral, Adobera, Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, etc.
- Madurado.- Estos son los quesos de pasta más dura, semidura o blanda, sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, mohos o bacterias bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos, que les confieren la consistencia y el sabor característicos. Aquí se encuentran los quesos: Cheddar, Chester,

Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Cabrales, Camembert y Roquefort entre otros.

- Procesado.- Resultado de la mezcla de quesos madurados fundidos, a los que se les pueden agregar ingredientes y especias; dentro de esta clasificación están los quesos fundidos y para untar, como el queso amarillo y la mayoría de los que se venden en rebanadas cuadradas.

En la elaboración de la mayoría de los tipos de quesos interviene una fermentación láctica. Los quesos no madurados, como el requesón y queso de nata, se elaboran con fermentos parecidos a los que se emplean en la elaboración de suero de mantequilla cultivado. Se deben enfriar y mantener bajo refrigeración hasta tanto no se consumen y tienen un tiempo de conservación relativamente corto. Los quesos madurados experimentan inicialmente una fermentación por bacterias lácticas seguida de la actividad de sus enzimas; en algunos quesos intervienen además enzimas del cuajo. Los principales compuestos que aportan el sabor a los quesos madurados son la sal, el ácido láctico, ácidos grasos, aminoácidos y compuestos carbonilo como aldehídos y cetonas (Frazier y Westhoff, 2000)

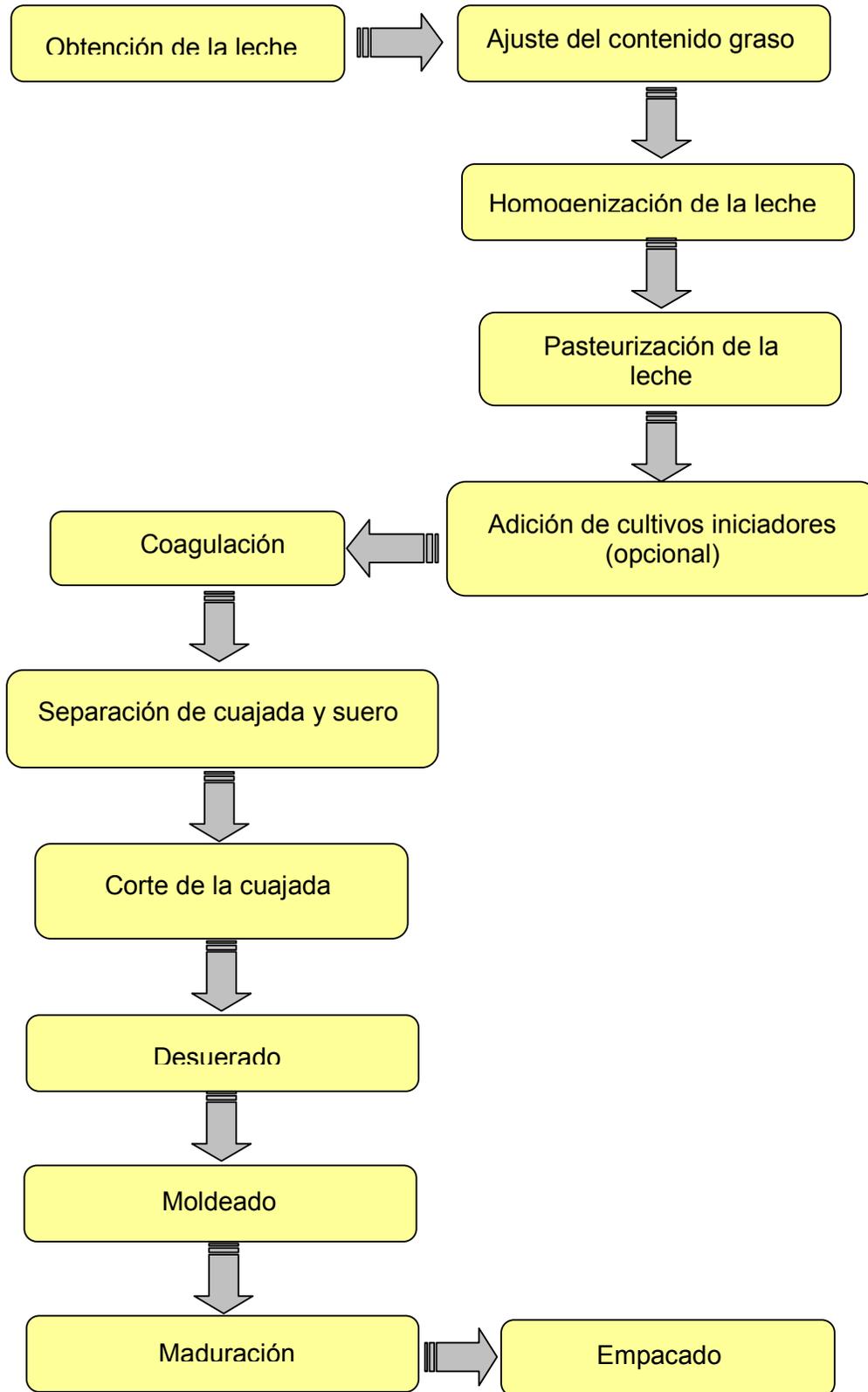
En el medio industrial, las BAL deben estar adaptadas al medio de la leche, es decir, ser capaces de utilizar la lactosa y las fuentes de nitrógeno de la leche. Las actividades ligadas al crecimiento bacteriano en este medio son el origen de las transformaciones que afectan a la leche, a la cuajada y a los productos lácteos y queseros que resultan de ellas (Leveau y Bouix, 2000).

En nuestro país debido a que se producen algunas variedades de quesos que no son comunes en los países industrializados, existen escasas referencias sobre su microbiología y participación como vehículos de agentes patógenos. Pueden mencionarse: el Panela, el requesón, el Oaxaca, el Cotija y el Chihuahua. Los dos últimos son madurados pero a partir de su flora natural y con un pobre control del proceso. La producción en pequeña escala por lo general se emplea leche cruda. Con frecuencia, en este último caso se comercializa sin empaque por lo que el riesgo a la contaminación es inminente (Fernández, 2000).

En la Figura 3 se muestra el proceso general de elaboración de queso típico el cual consiste en las siguientes etapas (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002):

1. **Obtención de leche**.- Es la etapa donde se reúne la materia prima (leche), su composición influye marcadamente en la calidad del producto.
2. **Ajuste del contenido graso de la leche**.- Ciertas variedades de queso se elaboran con leche descremada o en algunas variedades se incorpora grasa vegetal.
3. **Homogenización de la leche**.- Se lleva a cabo la reducción del tamaño de diámetro de los glóbulos de grasa (4 a 1  $\mu\text{m}$ ); lo anterior da como resultado una cuajada más débil así como una disminución de la sinéresis del suero, resultado a favor en quesos cremosos; así como menos pérdida de grasa.
4. **Pasteurización de la leche**.- Etapa donde se logra la Inactivación de microorganismos patógenos, una proporción general microbiana es eliminada, lo anterior facilita el progreso de la fermentación.
5. **Coagulación**.- Se hace uso de renina o cuajo (enzima obtenida del cuarto estómago de terneras), la coagulación es completada en un periodo de 30 min.
6. **Adición de cultivos iniciadores**.- En algunos tipos de quesos se utilizan cultivos microbianos los cuales inducen cambios importantes en las características sensoriales del producto. Generalmente la leche se somete a una fermentación con cepas seleccionadas de BAL u hongos, o en algunos casos bacterias propiónicas. El producto puede ser madurado por semanas o meses. Los cultivos iniciadores consisten en una sola especie o mezcla de ellas.

7. **Separación de la cuajada y el suero.**- La separación se acelera por calentamiento, disminución de pH y manipulación del coágulo.
8. **Corte de la cuajada.**- Según la forma de corte previo al desuerado, la textura del queso resultará afectada debido a que modifica la sinéresis inicial.
9. **Desuerado.**- Depende de la forma de cortar la cuajada, de agitarla, de la acidez y temperatura prevalentes.
10. **Moldeado.**- Se realiza para dar forma al queso y tamaño de acuerdo a las características, tradición y exigencias del mercado. Al colocar la cuajada en los moldes se revisten éstos de tela o paño para facilitar la salida de suero y formar la corteza. Los paños deben ser colocados de tal modo que no provoquen marcas ni arrugas en la superficie del queso. La calidad del producto se ve influida por la forma y tamaño.
11. **Maduración.**- Etapa donde evolucionan cambios físicos, químicos y sensoriales como resultado de la actividad de cultivos microbianos agregados.
12. **Empacado.**- Al término de la fabricación, el queso es empacado y se utiliza para ello diferentes tipos de material como papel parafinado, envolturas plásticas, cajas de cartón, plástico o latas metálicas.



**Figura 3.-** Proceso general de elaboración de un queso típico (Adaptado de Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

### 2.4.2 Microbiología de quesos

El empleo de materias primas como la leche cruda, la ausencia de maduración, las condiciones en las que se lleva a cabo el uso de empaques, y las condiciones sanitarias de manejo del producto antes del empaque y durante su comercialización, son factores contribuyentes a la calidad microbiológica en productos lácteos como los quesos (Fernández, 2000).

El principal motivo de resistencia a la práctica del empleo de leche pasteurizada en la elaboración de quesos, es el efecto de este proceso sobre el sabor y textura del queso obtenido; sin embargo el uso de leche cruda, causa alta variabilidad en la calidad del producto final debido a diferencias en la microflora de la leche. Además del problema sanitario por la gran variedad de microorganismos presentes en la leche cruda, el proceso de manufactura del queso no es uniforme y varía con la localidad y tradición. Una modificación en la microflora inicial que reduce microorganismos y elimina patógenos, se logra con la pasteurización, misma que hace posible una producción de calidad uniforme; pero trae consigo un sabor insípido en el queso. Es posible restaurar el sabor y lograr uniformidad en la calidad del queso, pasteurizando la leche y añadiendo cultivos lácticos (González y col., 2004).

Los quesos son vehículos potenciales de una diversidad de agentes patógenos. Aunque no se reportan con frecuencia, en la literatura existen reportes de brotes causados por tales agentes. Los brotes más frecuentes tienen como agente etiológico a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Brucella* y *Listeria monocytogenes* (Fernández, 2000).

Algunos brotes de intoxicación alimentaria se producen como consecuencia del consumo de quesos elaborados con leche no pasteurizada. Este problema ocurre incluso en países industrializados como Estados Unidos, Francia, Escocia e Inglaterra. En México no se tienen definidos los antecedentes de los productos involucrados; aparentemente se trata de quesos frescos no pasteurizados o contaminados por las personas que los elaboran (Fernández, 2000).

Los quesos más susceptibles de deterioro microbiológico son aquellos con humedad y pH relativamente elevados y bajo contenido salino. También se muestra deterioro en los quesos al final de la etapa de maduración, ocasionalmente la actividad de anaerobios esporulados como *Clostridium*

*tyrobutyricum* y *C. butyricum*, dan lugar a quesos inflados y si se asocian otros microorganismos como *C. sporogenes* el producto entra en estado de putrefacción (Hicks y col., 1982).

Los agentes microbianos patógenos fueron agrupados de la siguiente manera, basándose en datos epidemiológicos, características individuales y la incidencia en productos lácteos:

### 1.- Microorganismos de alto riesgo, *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157: H7 (Tabla4).

**Tabla 4.-** Persistencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 durante la elaboración de queso Oaxaca. (Tomada de Fernández, 2000).

Etapa	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157: H7
Leche pasteurizada	4.0 <sup>1</sup>	3.4	4.1
Suero	2.7	2.7	2.9
Cuajada	4.3	4.4	4.6
Producto Final	3.5	3.6	3.8

<sup>1</sup> media del log<sub>10</sub> ufc/mL o g

**1.1 *Salmonella*.** El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Típico bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, generalmente son móviles, aerobios o facultativos anaerobios (Fernández, 2000).

El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto intestinal de humanos y animales de abasto, animales salvajes, roedores, animales de compañía, aves, reptiles e insectos, habitualmente sin presentar ninguna enfermedad.

El humano no representa más que un eslabón en la cadena contaminante. Los animales domésticos o salvajes constituyen un inmenso reservorio a partir del cual las salmonellas pueden difundirse al ambiente y en especial al agua y alimentos. Pueden ser diseminados por medio de las heces al suelo, al agua, a las personas, a los alimentos y piensos y desde estos medios a otros animales (Torres, 2002).

En un estudio a partir de requesón, que es un subproducto obtenido durante la fabricación del queso, el cual se ofrece a granel al público después de 12 a 18

h de haber sido elaborado, de 198 muestras de requesón procedentes de expendios de mercados públicos de Guadalajara, el 26.7% resultaron positivos a *Salmonella* (Fernández, 2000).

En otro estudio realizado con requesón la incidencia de *Salmonella* fue de 18%, esta cifra es una clara evidencia de la insalubridad con la que se maneja el producto desde su obtención hasta su venta (Torres, 2002).

Aunque en los análisis realizados en quesos fabricados comercialmente rara vez se han aislados salmonelas, esta bacteria puede multiplicarse durante la fabricación y sobrevivir en diversas variedades durante más de 60 días. Diversos brotes de salmonelosis debidos al consumo de quesos contaminados han sido atribuidos a una falta de control durante el proceso de elaboración o a la utilización de leche cruda contaminada (Roberts y col., 2001).

En cuanto a frecuencia con relación a los meses del año ésta se intensifica a partir de los meses de abril y mayo alcanzando un pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre. Los estados más afectados han sido Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo. De las salmonelas aisladas de alimentos, 51% correspondió a alimentos preparados, 23% a cárnicos (productos derivados de la carne como: jamón, longaniza, chorizo, queso de puerco, etc.), 22% a carne (molida de res, pollo, pescado), 3% a lácteos y 1% a huevo fresco y en polvo (Fernández, 2000).

**1.2 *Escherichia coli*.** Es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, fermenta la lactosa, incapaz de desarrollarse a temperaturas superiores a 42° y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Este microorganismo es propio del contenido intestinal por lo que es una bacteria indicadora de contaminación fecal en los alimentos (Fernández, 2000).

Este microorganismo puede ser el agente causante de gastroenteritis humana y de otros animales. Las cepas patógenas que causan diarrea se transmiten de manera directa o a través de los alimentos y causan distintos síndromes clínicos; las heces de animales de sangre caliente, el agua no tratada y los portadores infectados suelen ser la fuente de contaminación más común en los alimentos. *E. coli* patógena asociada al consumo de alimentos se agrupa en cinco categorías: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroadherente y *E. coli* enteroagregativa, que se distinguen entre sí por sus propiedades de

virulencia, las interacciones que establecen con la mucosa intestinal, los síndromes clínicos que originan y por las diferencias epidemiológicas y de serogrupos O:H que presentan (Torres, 2002).

En general *E. coli* no crece bien durante el proceso de elaboración del queso. El bajo pH y la sal son inhibidores pero si el cultivo iniciador no tiene la actividad adecuada, *E. coli* puede multiplicarse y sobrevivir al proceso de elaboración de este producto (Roberts y col., 2001).

La contaminación con *E. coli* se puede dar a partir de la contaminación de la leche, esta bacteria existe en residuos de suciedad sobre el equipo mal saneado que contiene la leche ya tratada térmicamente. Pede multiplicarse si el nivel de humedad se lo permite. Con todo, *E. coli* es el indicador más confiable de contaminación fecal en alimentos, especialmente en aquellos que han recibido algún tratamiento antimicrobiano severo (Fernández, 2000).

**1.3 *Listeria*.** Es un bacilo corto Gram positivo, de 0.4-0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.5-2.0  $\mu\text{m}$  de longitud, con extremos redondeados, algunas células pueden ser curvadas. *L. monocytogenes* representa una nueva generación de patógenos “resistentes” transmitidos por los alimentos. En comparación con otros gérmenes, es relativamente más tolerante a la acidez, sal, calor, agentes oxidantes, alcohol y aditivos empleados en alimentos. Además, se adapta en forma rápida y efectiva al ambiente y estrés debido al procesamiento, lo cual hace que represente una amenaza en alimentos mínimamente procesados y sin tratamiento térmico. Una razón para preocuparse con respecto a esta bacteria en alimentos es su capacidad como psicrótrofo y mesófilo (Torres, 2002).

Descubierta hace poco más de 100 años, *L. monocytogenes* se implicó como agente etiológico en las enfermedades transmitidas por alimentos a partir de los años 1980. Previo a esta fecha, se conocían casos de listeriosis, incluso letales, pero al germen se le considera más bien un patógeno oportunista especialmente entre personas hipersensibles (Fernández, 2000).

Si *Listeria* está presente en leche líquida y sus subproductos conservados en refrigeración, tiene potencial para crecer, aunque a una velocidad relativamente lenta. No obstante, estos productos frescos no son almacenados por periodos prolongados en refrigeración antes de ser consumidos. Por lo tanto, si *Listeria* se encuentra en el alimento, el inóculo

puede ser un número bajo debido al tiempo necesario para alcanzar niveles mayores de microorganismos. *L. monocytogenes* ha sido aislada de una variedad de alimentos congelados, entre los que se incluyen productos lácteos, carnes y mariscos. *L. monocytogenes* ha alertado a las autoridades sanitarias por la gravedad con que se presenta el cuadro clínico, que en un 30% de los casos causan la muerte del individuo y donde en la mayoría de los casos el alimento involucrado ha sido de origen lácteo (Torres, 2002)

En 1985, el consumo de queso estilo mexicano contaminado fue el causante de un brote de listeriosis en California. El equipo y el entorno de la fábrica presentaban una gran contaminación con *L. monocytogenes*. La mayor incidencia de *L. monocytogenes* en quesos blancos y en los madurados por mohos que en quesos duros ha sido confirmada en estudios posteriores en Estados Unidos, Francia, Italia, Dinamarca, Chipre, España, Suiza y Alemania occidental (Roberts *et al.* 2001).

Schöbitz y col. (2001) determinaron la presencia de *L. monocytogenes* en leche recepcionada en plantas lecheras de Chile y la contaminación de quesos frescos artesanales con esta bacteria. Los resultados de los análisis bacteriológicos indicaron que, de las 50 muestras de leche cruda, 22% fueron positivas a la presencia de *L. monocytogenes*. Esta cifra es significativa ya que si tomamos en cuenta en el estado de Hidalgo la mayoría de los quesos se producen de forma artesanal y la forma de almacenamiento no es la correcta, es probable que esta bacteria ocasione un problema de salud.

**2.- Los microorganismos de riesgo medio** incluyeron a estreptococos de los grupos A y C, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, a quien se consideran un patógeno oportunista, *Coxiella burnetii* y *Aeromonas hydrophila*. Los Estreptococos del grupo A estuvieron implicados en un brote debido a queso elaborado de manera artesanal a partir de leche cruda.

**3.- *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*** se catalogaron como de **bajo riesgo**. Aunque *St. aureus* fue el agente causal de varios brotes en las

décadas de 1950 y 1960, las mejoras en las tecnologías de producción de queso han minimizado el riesgo.

Aunque la mayoría de las bacterias de las categorías de mediano y bajo riesgo no han estado implicadas en brotes alimentarios, se consideran problemáticas porque pueden crecer y han sido aisladas de leche, la cual es utilizada como materia prima en la elaboración de quesos (Roberts y col., 2001).

El que un individuo enferme como consecuencia del consumo de un alimento contaminado con un microorganismo patógeno, depende justamente de los tres elementos implicados (y su interrelación) en el propio enunciado: individuo, patógeno y alimento (Tabla 5)

**Tabla 5.-** Factores relacionados con el microorganismo, el individuo y el alimento consumido como potenciales determinantes de un incidente. (Tomada de Fernández, 2000).

Componente	Ejemplos de factores
Microorganismo	Viabilidad; virulencia; número
Alimento	Composición; cantidad consumida; distribución del agente patógeno.
Individuo	Barreras naturales; inmunocompetencia

Diversos factores influyen en la presencia y supervivencia de patógenos en el queso: características del patógeno, como su tolerancia al calor, ácido y sal, número inicial presente y su estado fisiológico que influye en la capacidad de sobrevivir de los patógenos. Entre los parámetros que adquieren importancia cabe destacar la temperatura de almacenamiento y procesado, la producción de ácido por los cultivos iniciadores, la adición de sal y otros inhibidores y el proceso de maduración (Fernández, 2000).

El deterioro de los alimentos es desde luego, la expresión de procesos físicos y reacciones químicas que suceden durante el almacenamiento y que llevan a la pérdida del valor comercial. Este hecho es detectable por el consumidor frente al alimento y de esa manera se podría evitar el consumo. La calidad sanitaria

de los alimentos queda configurada por una serie de atributos (Tabla 6) que pueden y deben procurarse desde su generación en donde quiera que esta ocurra hasta su servicio y consumo.

**Tabla 6.-** Atributos que debe presentar un alimento (Tomada de Fernández, 2000).

<b>Alimento de buena calidad</b>	
Nutritivo	Idóneo
Sensorialmente aceptable	Inocuo
Fresco	Larga vida de anaquel

Los microorganismos de interés sanitario en los alimentos incluyen de manera convencional, bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, virus y parásitos microscópicos o sus estados de huevecillo o larvario. Se encuentran involucrados en dos áreas fundamentales de la microbiología sanitaria: como causa de deterioro de los alimentos y como agentes etiológicos de enfermedades asociadas a su consumo. Deben considerarse además, en menor escala, su participación en la generación controlada de cambios sensoriales y el empleo, directo o indirecto, en la preservación de su frescura e inocuidad. Estos dos últimos efectos se asocian principalmente a la actividad de las BAL (Fernández, 2000).

La presencia de agentes patógenos no suele acompañarse de cambios sensoriales objetables y el alimento se ingeriría sin resistencia. Los riesgos que representan una amenaza a la salud son los de naturaleza microbiana originando daño en el tracto digestivo además de que otras localidades pueden verse comprometidas (Fernández, 2000).

Las infecciones y las toxiinfecciones causadas por patógenos transmitidos a través de los alimentos han sido reconocidas por cerca de 100 años; ya para 1950 los principales patógenos que preocupaban eran *Salmonella*, *S. aureus* y *Clostridium perfringes* en el Reino Unido y en Estados Unidos. El botulismo también se conocía como peligroso pero era raro enfermarse con alimentos enlatados. Sin embargo, por 1980 se comenzaron a involucrar otros agentes como *Campylobacter*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, pero tuvieron que pasar varios años para que autoridades de salud

reconocieran que causaban serias complicaciones o la muerte y que estos podían transmitirse por el consumo de alimentos y por un limitado control en el proceso (Tood, 2001).

En México, el registro de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) no es completo, por ejemplo, la Secretaría de Salud en México, señalaba que hasta 1976 las enfermedades transmitidas por los alimentos ocupaban el primer lugar como causa de enfermedad; a partir de 1977 ocupan el segundo lugar. El grupo de edad más afectado es el de menores de un año. La tendencia de 1961 a 1989 se muestra ascendente, con un incremento de la tasa de 172% (Torres, 2002). El sistema de notificación de casos ha mejorado pero esto no garantiza la calidad en los alimentos.

De los 79 brotes que ocurrieron en 1980-1989, se confirmaron 58 brotes de infecciones e intoxicaciones microbianas y parasitarias transmitidas por alimentos. Los quesos y otros derivados lácteos estuvieron involucrados en el 29% de los brotes, seguidos por pasteles (16%), leche (14%) y productos de cerdo (9%). Estas cifras son solo de los casos notificados, ya que en nuestro país el registro de las ETA no es completo (Fernández, 2000).

### 2.4.3 Normatividad mexicana para quesos

En nuestro país la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 “Bienes y servicios, Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias”, establece los límites permitidos para la presencia de microorganismos para quesos con o sin maduración y procesados, para el caso de los queso quesos frescos , madurados y procesados deben estar ausentes de *Salmonella*, y tener negativa la presencia de *Listeria monocytogenes*; en el caso de coliformes fecales se presenta para los quesos frescos un límites máximo de 100 NMP/g, mientras que para el caso de quesos madurados el límite máximo que establece es de 50 NMP/g. Además de establecer que los quesos frescos deben tener consistencia desde untable hasta rebanable, de aroma y sabor característico sin olores y sabores ajenos; los quesos madurados deben tener consistencia desde blanda hasta extra dura sin aromas y sabores ajenos, pueden presentar o no ojos u orificios típicos de fermentación o vetas coloreadas de los mohos empleados para su etapa de maduración (Tabla 7).

**Tabla 7.-** Especificaciones sanitarias para quesos frescos, madurados y procesados según la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994.

MICROORGANISMOS	FRESCOS	MADURADOS	PROCESADOS
		LÍMITE	MAXIMO
Coliformes fecales (NMP/g)	100	50	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/g)	1000	100	Menos de 100
Hongos y Levaduras (ufc/g)	500	500	100
<i>Salmonella</i> en 25 g	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	Negativo	Negativo	Negativo

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La utilización de cepas de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos, permitirá tener un mayor control sobre los procesos de fermentación, así como al reducir la carga microbiana del producto final por la inhibición producida por las bacteriocinas, se mejora consecuentemente la calidad del producto, se incrementaría la vida de anaquel y se reduciría el riesgo de enfermedad para el consumidor.

#### 4. OBJETIVOS

**Objetivo general:**

Evaluar el efecto de la adición de una cepa de *Lactobacillus plantarum*, con actividad bacteriocinogénica, en el proceso de fabricación de quesos frescos y comparar la calidad microbiológica de estos productos con aquellos no adicionados con dicha cepa.

**Objetivos particulares:**

Conocer la calidad microbiológica de quesos comerciales para contemplar una posible aplicación de la cepa *Lactobacillus plantarum* en los procesos de elaboración, para brindar un producto final inocuo, de larga vida de anaquel y con un valor añadido para el consumidor.

Aplicar *in situ* la cepa de *Lactobacillus plantarum* en el proceso de elaboración de queso, en una planta productora de lácteos.

Comparar los resultados obtenidos en el proceso con y sin la cepa de *Lb. plantarum*.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. MATERIAL

#### 5.1.1 Cepas

- Cepa 110 *Lactobacillus plantarum*

La cepa 110 *Lb. plantarum* fue aislada a partir de productos lácteos y conservada forma liofilizada, en un trabajo previo realizado por Clavel (2006); identificada bioquímicamente por Ortiz (2006) y posteriormente mostró capacidad inhibitoria contra microorganismos deterioradores y patógenos en un trabajo de investigación realizado por Neria, (2006). Se utilizó esta cepa para fines propios del presente trabajo.

Dicha cepa, actualmente se encuentra liofilizada y forma parte del banco de cepas ubicado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado del Hidalgo.

#### 5.1.2 Muestras

Muestras de quesos frescos adquiridos en mercados y tiendas en el Municipio de Tulancingo Hidalgo:

- 18 muestras de queso tipo Oaxaca
- 18 muestras de queso tipo Panela

Muestras de queso elaboradas en la empresa LECH CARN S.A. de C.V. del Valle de Tulancingo, A.C:

- 6 muestras de queso tipo Oaxaca (elaboradas con la cepa 110 *Lb. plantarum*)
- 6 muestras de queso tipo Panela (elaboradas con la cepa 110 *Lb. plantarum*)
- 6 muestras de queso tipo Oaxaca (elaboradas sin la cepa 110 *Lb. plantarum*)
- 6 muestras de queso tipo Panela (elaboradas sin la cepa 110 *Lb. plantarum*)

**5.1.3 Equipo**

- Autoclave Sterilizer SM 200 Yamato. Japón
- Balanza Analítica Ae Adam. Mod. AQT 1500. E.U.A
- Baño Maria Riossa Mod. 8 MBD. Rios Rocha. México
- Contador de colonias AO Darkfield Quebec. Mod. 3325. E.U.A
- Incubadora Bacteriologica BLUE M temp 30° C- 65°C. Electric Company E.U.A.
- Incubadora Bacteriologica Precision 3BG 110 V. Emp +5 -80° C. E.U.A
- Parrila eléctrica Termolyne.Cimarec 2. Mod. SP 46925. E.U.A
- Refrigerador LAB-LINE E.U.A
- Stomacher Seward. Mod. 400 circulator. Inglaterra
- Vortex Geniue 2. Mod. G- 560. E.U.A

**5.1.4 Material de laboratorio**

- Algodón
- Asa bacteriológica
- Bolsas de plástico
- Cajas Petri
- Campana de Durham
- Espátula
- Gradillas
- Matraz volumétrico de 250 ml
- Mechero
- Papel aluminio
- Pipeta .2 ml
- Pipeta de 1ml
- Pipeta graduada de 10 ml
- Probeta graduada de 250 ml
- Probeta graduada de 500 ml
- Tubo de ensaye con tapón de plástico
- Tubos de ensaye con tapón de rosca
- Varilla de vidrio en L
- Vidrio de reloj

### 5.1.5 Medios de cultivo

- Agar Baird Parker. BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar Citrato de Simmons. BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar de Bilis y Rojo Violeta. BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar de Eosina y Azul de Metileno (EMB). BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar de Hierro y Lisina (LIA). BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar de Hierro y Triple azúcar (TSI). BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar de Cuenta Estándar. BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar de Salmonella y Shigella. DIBICO. Dibico S. A de C.V. México
- Agar dextrosa sabouraud BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agar de Medio de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) DIBICO. Dibico S.A de C.V. México
- Agar Verde Brillante BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Agua Destilada
- Caldo de Tetrionato. DIBICO. Dibico S. A de C.V. México
- Caldo Lactosado Brillante BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Caldo RM-VP Caldo Rojo de Metilo y Voges Proskauer Brillante BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Caldo Urea Brillante BIOXON. Becton Dickinson de México S. A de C.V. México.
- Caldo Vassiliadis Rappaport DIFCO <sup>TM</sup>. Becton Dicknson and Company. Francia

- Peptona de Caseína BIOXON. Becton Dickinson de México S.A de C.V. México.

Nota: Cada uno de los medios de cultivo fue utilizado y preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante, sometiéndose a una esterilización a 15 libras de presión 121<sup>+</sup>- 2° C durante 15 minutos.

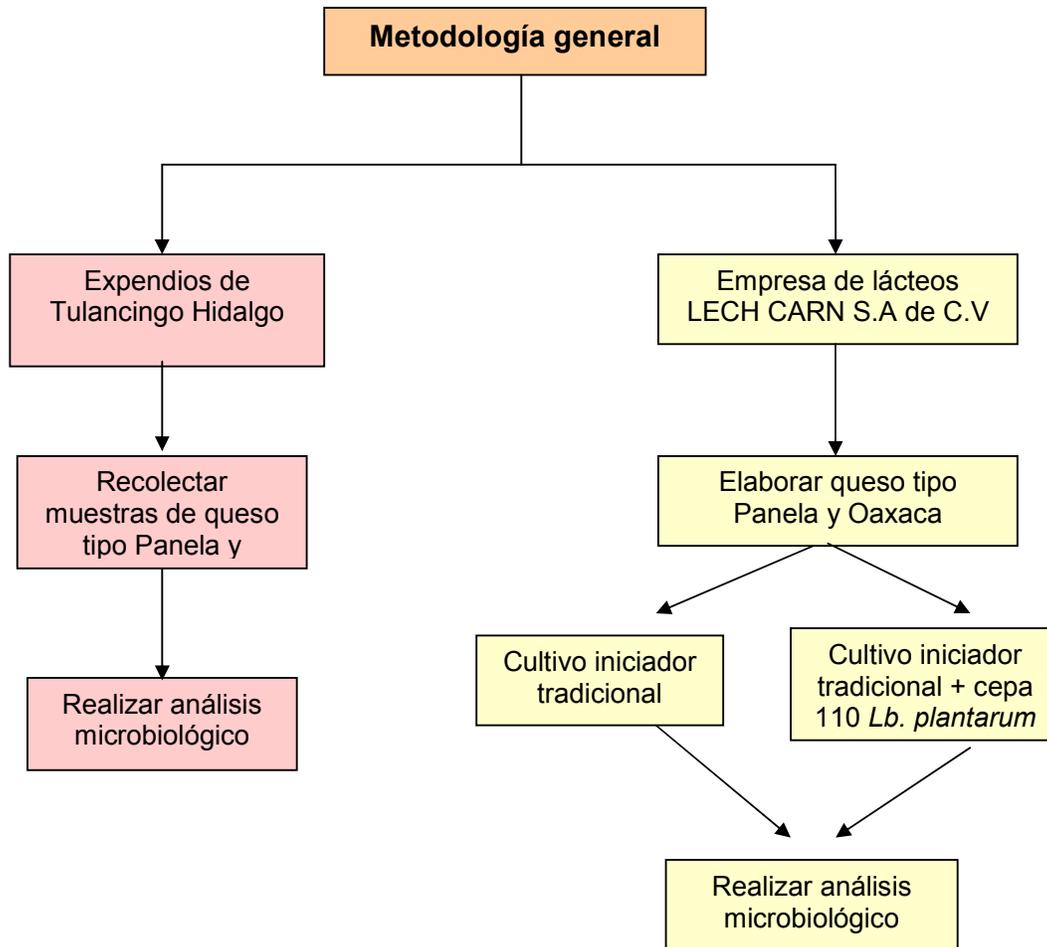
#### **5.1.6 Reactivos**

- Reactivo de Ehrlich. HYCEL. México S.A. de C.V
- Reactivo Rojo de Metilo. HYCEL. México S.A. de C.V

### **5.2. MÉTODOS**

En la Figura 4 se esquematiza el proceso general realizado para cumplir con los objetivos propios del presente trabajo, el cual consistió en las siguientes etapas:

1. Obtener muestras de queso fresco tipo Panela y Oaxaca provenientes de expendios en Tulancingo Hidalgo, determinar su calidad microbiológica con la finalidad de contar con un panorama reciente en la calidad de ambos productos y tener así un antecedente para respaldar la incorporación de la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* en los métodos de elaboración de lácteos
2. Realizar la reactivación de la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* conservada en liofilización.
3. Aplicar *in situ* la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* en muestras de queso tipo Panela y Oaxaca elaboradas en una empresa de lácteos y conocer la calidad microbiológica de estos productos con y sin la cepa.



**Figura 4.-** Esquema general del desarrollo experimental.

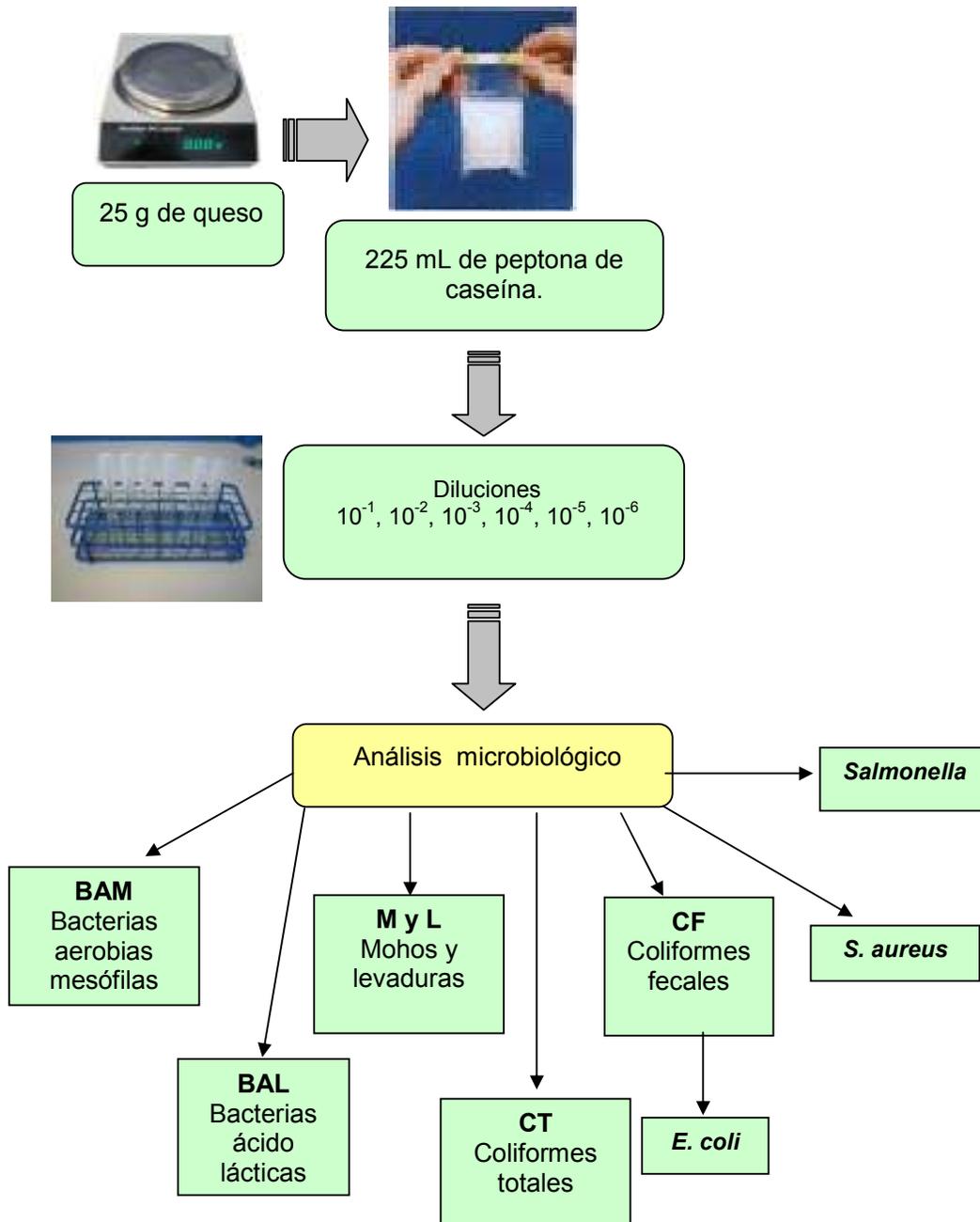
### 5.2.1 Análisis microbiológico

En primer lugar, se analizaron microbiológicamente 36 muestras de quesos frescos (18 tipo Panela y 18 tipo Oaxaca) recolectados en diferentes expendios de la región de Tulancingo Hidalgo y posteriormente 12 muestras obtenidas en la empresa LECH CARN S.A de C.V. (6 tipo Panela y 6 muestras tipo Oaxaca con y sin la incorporación de la cepa 110 *Lb. plantarum*)

Las muestras fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, y a las 2 horas posteriores se les realizó el análisis microbiológico correspondiente de acuerdo a las especificaciones de la NOM-109-SSA1-1994 "Procedimiento para Toma, Manejo y Transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico".

Para efectuar el análisis microbiológico se tomó 25 g de cada uno de los quesos y se diluyó en 225 mL de peptona de caseína obteniéndose así la dilución identificada como  $10^{-1}$  o dilución primaria. Subsecuentemente, se realizaron diluciones consecutivas transfiriendo 1 mL de la dilución primaria en 9 mL de peptona hasta obtener la dilución  $10^{-6}$ , de acuerdo a lo estipulado con la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico" (Figura 5).

El análisis microbiológico contempló las determinaciones para bacterias aerobias mesófilas (BAM), mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL), coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*.



**Figura 5.-** Procedimiento realizado para análisis microbiológico en las muestras de queso.

**5.2.1.1 Determinación de bacterias aerobias mesófilas**

La determinación de las bacterias aerobias mesófilas (BAM) se realizó depositando 1 mL de las diluciones correspondientes en una caja Petri estéril, añadiendo 15 mL de agar cuenta estándar; distribuyendo uniformemente y dejando solidificar el medio, de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Las placas se llevaron a incubación de 35°C por 48 horas. Al término de ese periodo se realizó el conteo de colonias existentes, seleccionando placas que contenían entre 30 y 300 colonias, los resultados obtenidos se expresaron como Log UFC/g.

**5.2.1.2 Determinación de mohos y levaduras**

Mohos y levaduras se determinaron mediante una siembra en superficie en placas con agar dextrosa Sabouraud ocupando 100 µL de cada una de las diluciones correspondientes y realizando así un duplicado de este procedimiento.

Las placas se incubaron a 30 °C por un periodo de 48 h, al culminar la incubación se realizó el conteo de los microorganismos. Los resultados obtenidos se expresaron como Log UFC/g.

**5.2.1.3 Determinación de bacterias ácido lácticas**

Este análisis se realizó colocando 1 mL de las diluciones correspondientes en una caja Petri estéril, posteriormente se añadieron 15 mL de agar MRS, se homogenizó el medio y se dejó reposar. Las placas se incubaron a 30°C por un periodo de 24 h.

Terminado el periodo de incubación, se realizó el conteo de las colonias con morfología típica y presuntiva de las BAL como son colonias en forma redonda, de color blanco, aspecto cremoso, superficie convexa y de bordes enteros. Los resultados obtenidos se expresaron como Log UFC/g.

#### 5.2.1.4 Determinación de coliformes totales

Para determinar coliformes totales se tomó 1 mL de la dilución correspondiente, se depositó en una caja Petri estéril y se incorporaron 15 mL agar bilis y rojo violeta (ABRV) para luego homogenizar y solidificar de acuerdo a lo estipulado en la Norma Oficial NOM-113-SSA1-1994.

Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas, al término de ese tiempo se realizó el conteo de colonias presentes en las placas, seleccionando placas donde existían entre 30 y 300 colonias, los resultados se expresaron como Log UFC/g.

#### 5.2.1.5 Determinación de coliformes fecales y *Escherichia coli*

La determinación de *E. coli* se llevó a cabo por el método Número Más Probable. Este método consistió en tomar 1 mL de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , colocando cada mL en tres tubos con 9 mL de caldo lactosado. La serie de tubos se incubó a 35°C por 24 h. Después de la incubación se seleccionaron aquellos que presentaban turbidez y formación de burbuja, en caso negativo se eliminaron.

De cada uno los tubos positivos se tomó 1 mL de inóculo y se colocó en un tubo que contenía 3 mL de caldo verde brillante, se incubó a 44.5°C por 24-48 h. Nuevamente se eligieron los tubos con las características ya mencionadas para así determinar los microorganismos coliformes de tipo fecal, los resultados obtenidos se presentaron en NMP/g.

La prueba de *E.coli* fue posterior a la determinación de coliformes fecales, partiendo de los tubos con caldo verde brillante en la prueba anterior. Para ello, se tomó un inóculo de cada uno de los tubos en caldo verde brillante y se realizó una siembra por estría en una caja con agar EMB. Cada una de las cajas sembradas se incubó a 37°C por 24 h, después de la incubación se observaron las cajas y se seleccionaron las colonias que manifestaban una coloración negra y un halo verde metálico las cuales correspondían a características presuntivas para *E.coli*. Como última etapa de esta determinación, se aplicaron pruebas bioquímicas de Indol, Citrato y Rojo de Metilo para confirmar la presencia de *E.coli*.

En la prueba de Indol se tomó un inóculo de una colonia presuntiva típica en la placa de EMB y se llevó a un tubo con peptona biotriptosa. El tubo

se incubó a 35°C por 24 h, al término de este tiempo se añadieron 2 gotas de Reactivo de Ehrlich, la formación de un anillo rojo en la superficie indicó la prueba como positiva

En la prueba de Citrato se tomó nuevamente una colonia típica de la placa de EMB, se realizó una siembra en la superficie inclinada de un tubo con agar citrato de Simmons, incubando a 35 °C por 24 h. Después de este tiempo se observó el cambio en la coloración del tubo, el vire en la coloración verde a un azul dió como positiva la prueba.

Para la realización de la prueba de Rojo de Metilo se tomó un inóculo de una colonia típica presuntiva de *E.coli* en la placa de EMB. El inóculo obtenido se suspendió en un tubo que contenía 2 mL de Caldo RM-VP (rojo de metilo y Voges Proskauer), llevando a incubación de 35°C por 24 h, después de este lapso se añadió una gota de reactivo rojo de metilo para observar así un cambio en la coloración del medio. La prueba se determinó como positiva cuando se presentó el vire de color amarillo a rojo.

Al concluir las pruebas bioquímicas y confirmar la presencia del microorganismo, los resultados obtenidos para la determinación de *E.coli* se expresaron como NMP/g.

#### **5.2.1.6 Determinación de *Salmonella***

Se determino *Salmonella* de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Método para la Determinación de *Salmonella* en alimentos. La determinación consistió en las siguientes etapas:

##### *Preenriquecimiento*

Se pesaron 25 g de cada muestra, se colocó en 225 mL de Caldo lactosado, posteriormente se incubó a 35°C durante 24 h.

##### *Enriquecimiento*

Del medio anterior, se colocó 1 mL en un tubo con 10 mL de caldo de tetrionato y otro mL se incorporó a un tubo con 10 mL de caldo Vassiliadis-Rappaport, ambos tubos se sometieron a una incubación de 42°C en 24 h

##### *Aislamiento*

En esta etapa se tomó 1 mL del tubo con caldo de tetrionato y 1 mL del tubo con caldo Vassiliadis-Rappaport se colocó por separado en una caja Petri estéril con agar sulfito de bismuto, agar de *Salmonella* y *Shigella* y agar verde

brillante. Las cajas se sometieron a una incubación de 35°C por un tiempo de 24 h.

#### *Pruebas Bioquímicas*

Para las colonias típicas sospechosas de *Salmonella* en cada una de las placas anteriores se realizaron las identificaciones bioquímicas: TSI (agar de hierro y triple azúcar), LIA (agar de hierro y lisina), citrato y urea.

En la prueba TSI se utilizó un tubo estéril con Agar de Hierro y Triple Azúcar, en él se sembró por superficie y picadura un inóculo tomado de una colonia típica presuntiva de *Salmonella*. El tubo se incubó a 35°C por 24 h. Después de este tiempo se dió como positiva la prueba por el cambio en la coloración del medio (vire de color naranja a un color rojo intenso).

Para la prueba de LIA se tomó un inóculo de una colonia típica presuntiva y se llevó a un tubo con agar de hierro y lisina, para sembrar así en superficie. Cada tubo se incubado a 35°C por 24 h. Se dió como positiva la prueba cuando se observó el crecimiento de colonias en la superficie inclinada del tubo (colonización blanca).

A cada una de las colonias que dieron positivas en la prueba de TSI y LIA, se sometieron a la prueba de citrato y urea respectivamente.

La prueba de citrato consistió en tomar un inóculo de las colonias presentes en el tubo de LIA, colocando el inóculo en la superficie de un tubo con agar citrato de Simmons, el tubo se incubo a 35°C por 96 h terminado ese tiempo se observó el tubo y se dió como positiva la prueba por el cambio del color verde del medio a un color azul.

En la prueba de Urea se tomó un inóculo de colonias típicas presuntivas pertenecientes al tubo de LIA y se colocó a un tubo estéril con caldo urea. Cada tubo se sometió a incubación de 35°C por 24 h. Culminado este tiempo, la prueba se determinó como positiva cuando se observó un cambio en la coloración del medio, este cambio fue de amarillo a rosa intenso.

Por último se realizó la prueba serológica para confirmar la presencia de *Salmonella* utilizando para ello un antisuero polivalente. Esto se llevó a cabo colocando una porción de cultivo sospecho de *Salmonella* en un portaobjetos, Ise agregó una gota de antisuero polivalente y al observar la aglutinación del fragmento de muestra se confirmó la presencia de *Salmonella*. Los resultados se reportaron como ausencia y presencia de *Salmonella*.

### 5.2.1.7 Determinación de *Staphylococcus aureus*

Para determinar *Staphylococcus aureus* se depositaron 100  $\mu$ L de las diluciones correspondientes y se sembró sobre la superficie de placas con agar Baird Parker dispersando la muestra en toda la superficie, se espero hasta la absorción del inóculo. Esta prueba se realizó con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

Las placas se incubaron a 35 °C en un periodo de tiempo de 24 h. Al término de la incubación se seleccionaron placas que presentaran colonias típicas con coloración negra, brillantes, lisas, convexas, con un halo claro alrededor de la colonia.

Posteriormente se realizaron las respectivas pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *Staphylococcus aureus*.

### 5.2.2 Reactivación e incorporación de la cepa bacteriocinogénica en procesos industriales de elaboración de quesos

Con base al trabajo desarrollado por Rodríguez (En proceso) donde se identificó que la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* mostró tener un carácter bacteriocinogénico. La cepa se introduce en el proceso de elaboración de productos lácteos como queso Panela y Oaxaca, con el objetivo de determinar su eficacia en el control de la proliferación bacteriana y por ende de la prevención del deterioro y descomposición del alimento.

Para la incorporación de la cepa en los procesos industriales fue necesaria su previa reactivación debido a la liofilización efectuada en trabajos anteriores Clavel (2006). Si bien el medio de cultivo de MRS permite un abundante desarrollo de todas las especies de BAL. La reactivación involucró dos cultivos de enriquecimiento en medio MRS.

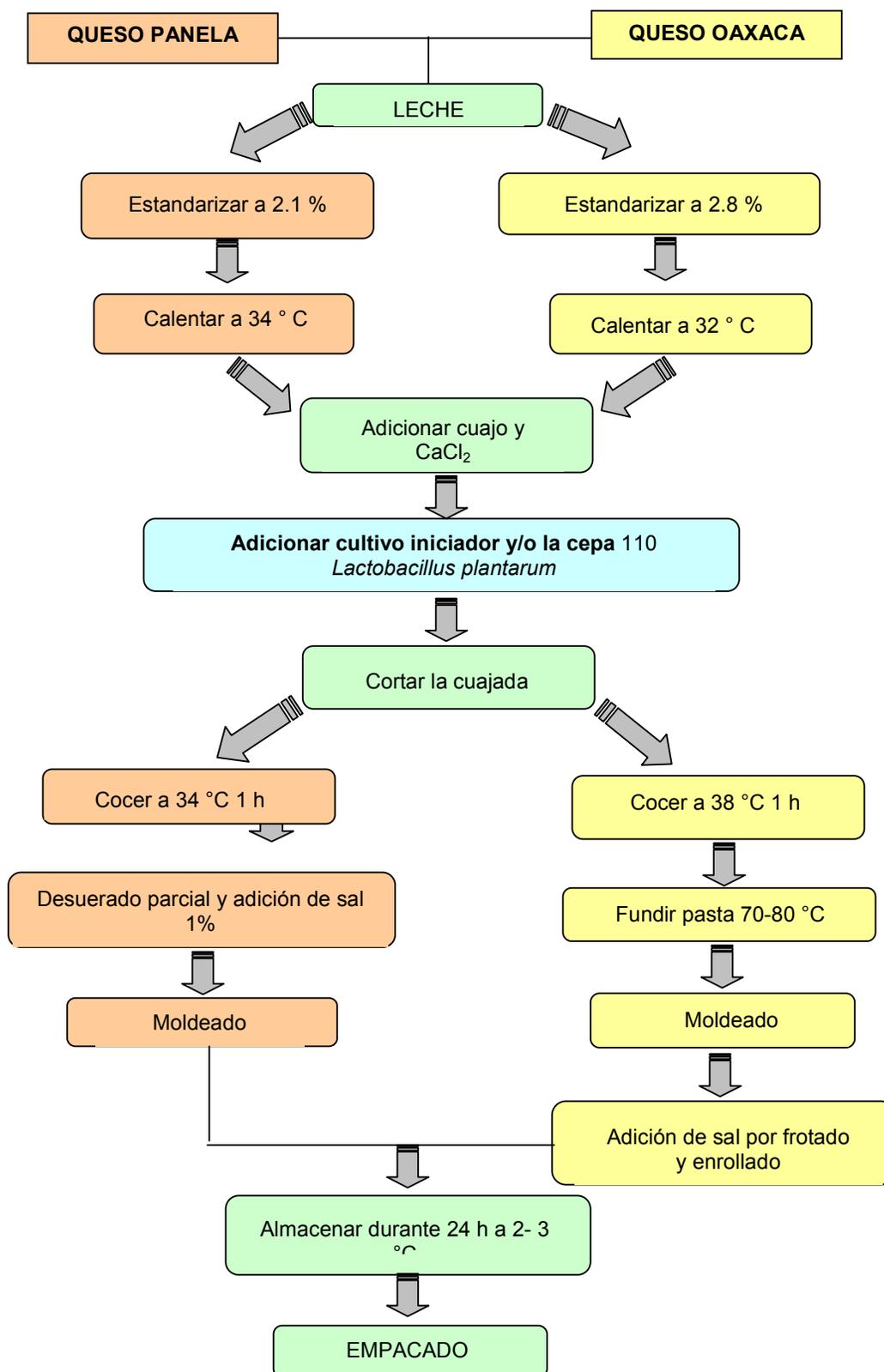
Lo anterior consistió en agregar 5 mL de caldo MRS estéril al frasco para hidratar el liofilizado, se dejó reposar por 10 minutos y se homogenizó con una agitación suave durante un minuto. De la cepa rehidratada se tomó una alícuota de 1 mL que se incubó en un tubo con 10 mL de caldo de cultivo MRS posteriormente se incubó a 35 -37 °C durante 24 h. Del cultivo anterior se tomaron 500  $\mu$ L de inóculo que se agregaron a un tubo de 10 mL de caldo de cultivo MRS y se incubó a 35-37 °C durante 12 h. Una vez que se obtuvo una

suspensión bacteriana densa, se realizó una resiembra más para verificar la pureza de las cepas. Con un asa bacteriológica estéril se tomó una muestra del cultivo anterior y se sembró por estría en una caja petri con 50 mL de agar MRS que se incubó a 35- 37 ° C durante 24 h. Terminado este tiempo, se identificó la morfología macro y microscópica del cultivo (Anexo 9.1).

Después de haber activado la cepa, se realizó su adaptación al medio de incorporación, para ello, se tomó un inóculo de la cepa y se depositó en 500 mL de leche estéril, se incubó a 35-37 °C por 18 horas, al término de este periodo de tiempo se obtuvo un cultivo madre o principal. Posteriormente para se incorporó la mezcla anterior a 5 L de leche estéril para nuevamente incubar a 35-37° C por 18 horas y así tener el fermento industrial, el cual se agregaría al 2% de acuerdo al volumen utilizado de leche en proceso de fabricación de quesos de la empresa LECH CARN S.A de C.V (Anexo 9.2).

Se procesaron 100 L de leche de los cuales 50 L se destinaron a la elaboración de queso Oaxaca obtenido con el cultivo tradicional y 50 L para elaboración del mismo producto pero utilizando un cultivo mixto formado por el cultivo iniciador tradicional y la BAL bacteriocinogénica (cepa 110 *Lactobacillus plantarum*) mismo proceso se llevó a cabo para la elaboración de queso Panela (Figura 6)

La etapa de aplicación de la cepa 110 *Lactobacillus plantarum*, se desarrolló por completo en la planta productora de lácteos quienes pusieron a disposición las instalaciones, materia prima, mano de obra y equipos, así como los todos los insumos necesarios para la elaboración de los diferentes tipos de queso en estudio. (Anexo 9.3)



**Figura 6.-** Proceso de elaboración de queso Oaxaca y queso Panela en la empresa LECH CARN S. A. de C.V, utilizando la cepa 110 *L. plantarum*.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis microbiológico

De acuerdo a la metodología antes mencionada, se determinó la calidad microbiológica de quesos tipo Panela y Oaxaca comercializados en tiendas y mercados del municipio de Tulancingo Hidalgo.

Los resultados obtenidos para ambos tipos de muestras se reportan a continuación:

**Tabla 8.-** Análisis microbiológico para quesos tipo Panela, recolectados en expendios.

CODIGO	QUESO PANELA							
	BAM *	M Y L *	BAL *	CT *	CF +	<i>E.coli</i> +	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
1 QP	8.65	4.3	6.77	5.32	>1100	11	A	A
2 QP	7.77	4.69	6.69	6.34	>1100	11	A	A
3 QP	6.73	4.9	5.62	5.75	>1100	11	A	A
4QP	6.77	4.74	4.5	6.76	93	21	A	P
5 QP	8.72	4.32	6.2	4.2	9,4	7,4	A	A
6 QP	8.04	7.9	7.87	7.83	3	< 3.0	A	A
7 QP	7.39	4.83	5.36	5.39	<3.0	< 3.0	A	A
8 QP	7.2	6.25	6.95	5.95	28	3,6	A	A
9 QP	7.23	6.46	6.69	5.32	9,4	6,2	A	A
10 QP	8.11	6.94	6.77	5.9	29	16	A	A
11 QP	8.38	4.93	6	6.75	35	15	A	A
12 QP	8.53	5.49	8.57	6.65	15	7,4	P	A
13 QP	8	6	7.77	5.14	210	27	A	P
14 QP	7.59	6.69	6.43	6.38	9,2	3.6	A	A
15 QP	8.38	7.07	6.74	6.25	11	< 3.0	A	A
16 QP	8.32	5.86	4.36	6.17	29	11	A	A
17 QP	8.36	6.53	6.83	5.55	9,2	6,2	A	A
18 QP	8.6	5.62	6.54	6	6,2	3	A	0
MEDIA	7.93	5.75	6.48	6.15				
SD	<b>0.64</b>	<b>1.05</b>	<b>1.07</b>	<b>0.71</b>			<b>N= 1</b>	<b>N= 2</b>
MINIMO	6.73	4.3	4.36	5.14	< 3.0	< 3.0	<b>%INC= 5.55</b>	<b>%INC= 11.11%</b>
MAXIMO	<b>8.72</b>	<b>7.9</b>	<b>8.57</b>	<b>7.83</b>	> 1100	27		

\* Resultados expresados en Log UFC/ g + Resultados expresados en NMP/g

A= Ausencia P= Presencia N= Número de muestras con incidencia INC= Porcentaje de incidencia

**Tabla 9.-** Análisis microbiológico de quesos tipo Oaxaca recolectados en expendios.

CODIGO	QUESO OAXACA							
	BAM *	M Y L *	BAL *	CT *	CF +	<i>E.coli</i> +	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
1 QP	8.5	4.3	7.49	7.36	>1100	11	A	A
2 QP	8.55	4.3	6.85	6.74	>1100	7.2	A	A
3 QP	8.68	4.92	7.71	7.43	290	15	A	A
4QP	6	5.11	4.43	5.3	>1100	<3.0	A	A
5 QP	7.27	5.44	6.38	6.9	290	6.2	A	A
6 QP	8.53	5.38	5.55	5.27	27	3.0	A	A
7 QP	7.63	6.51	6.71	5.43	3.6	< 3.0	A	A
8 QP	8.39	8.44	8.71	5.51	15	7.4	A	A
9 QP	8.77	7.67	8.84	7.47	29	<3.0	A	A
10 QP	8.39	7.56	7.56	6.47	16	<3.0	A	A
11 QP	8.41	8.54	8.76	7.97		11	P	A
12 QP	8.41	7.17	8.25	5.6	29	7.4	A	A
13 QP	8.63	5.47	6.72	4.3	15	6.1	A	A
14 QP	7.23	4.62	5.32	3.3	9.2	3.6	A	A
15 QP	7.27	4.2	6.77	4.79	15	11	A	A
16 QP	8.81	7.55	8.25	8.04	11	<3.0	A	A
17 QP	8.81	6	8.2	8.59	6.2	<3.0	A	A
18 QP	8.39	8.38	8.43	8	36	21	A	A
<hr/>								
MEDIA	8.15	6.20	7.27	6.36				
SD	<b>0.76</b>	<b>1.54</b>	<b>1.28</b>	<b>1.48</b>				
MINIMO	6	4.2	4.43	3.3	3.6	< 3.0	<b>N= 1</b>	<b>N= 0</b>
MAXIMO	<b>8.81</b>	<b>8.54</b>	<b>8.84</b>	<b>8.59</b>	> 1100	21	<b>%INC= 5.55</b>	<b>%INC= 0%</b>

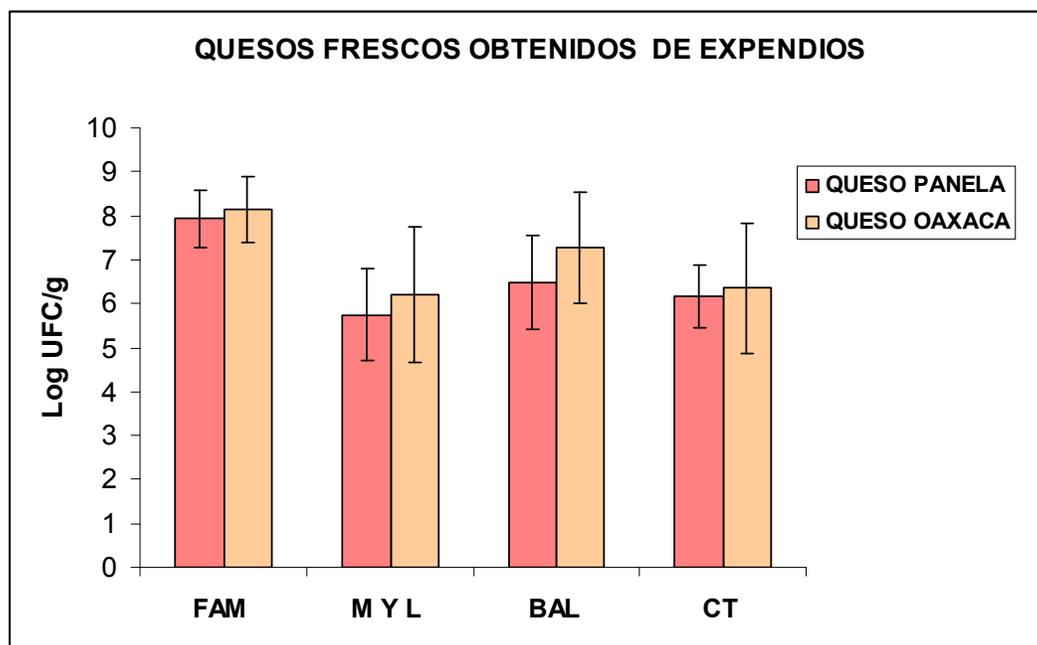
\* Resultados expresados en Log UFC/ g + Resultados expresados en NMP/g

A= Ausencia P = Presencia N= Número de muestras con incidencia INC= Porcentaje de incidencia

De acuerdo con los resultados, las muestras de queso fresco recolectadas en expendios del municipio de Tulancingo Hgo., indicaron una carga microbiana mayor en bacterias aerobias mesófilas y bacterias ácido lácticas en las muestras promedio de queso Oaxaca (Log 8.15 UFC/g) en comparación con las muestras de queso Panela (Log 7.93 UFC/g), esto se debe básicamente a las diferencias que existen en los principales puntos críticos de elaboración de los dos productos, como lo es en el queso Oaxaca, la acidificación por medio de la adición de cultivos iniciadores o bien a partir de bacterias lácticas (Chapman y Sharpe, 1990). En un estudio realizado por Turkoglu y col., (2003) a 29 muestras de queso fresco, reportaron una carga microbiana de 6.89 Log UFC/g para bacterias aerobias mesófilas y 6.78 Log UFC/ g para bacterias ácido lácticas, lo cual comparado con los resultados del presente estudio son menores para ambos tipos de queso.

Por otra parte, al determinar mohos y levaduras en las muestras, se encontraron valores promedio de 5.75 Log UFC/g en quesos tipo Panela y 6.20 de Log UFC/g en quesos tipo Oaxaca, valores que llegan a ser similares a los publicados por Díaz-Rivero y González (2001) donde al analizar quesos frescos obtenidos de vías públicas, se detectó un valor promedio de 5.19 Log UFC/g en estos microorganismos (Figura 7).

Con relación a los recuentos de coliformes totales, se presentan valores promedio de 6.15 Log UFC/g en los quesos tipo Panela y 6.36 Log UFC/g en Oaxaca respectivamente, valores que en esta ocasión son menores a los reportados por Márquez y García (2007) donde se obtuvieron valores de > 8 Log UFC/ g en muestras promedio de queso blanco. Los recuentos de coliformes totales en estas muestras, pueden deberse o tener su origen en la ausencia de condiciones higiénicas dentro de la etapa de fabricación o en la baja calidad de la leche empleada durante la elaboración así como maquinarias o superficies sucias, malas prácticas de manufactura, almacenamiento, transporte y comercialización (Ellner, 2000)



**Figura 7.-** Resultados expresados en Log UFC/g de análisis microbiológicos en muestras de expendios.

En la figura anterior, se presentan los resultados obtenidos de análisis microbiológicos en Log UFC/g en queso tipo Panela y Oaxaca recolectados de expendios. Es notable que debido a la gran diversidad del origen de las muestras los resultados presenten variabilidad entre ellos.

Por otra parte, en los recuentos de coliformes fecales, se obtuvo que el 16.66 % de queso tipo Panela y Oaxaca (3 muestras) contenían valores máximos  $> 1\ 100$  NMP/g respectivamente, resultados que son muy superiores a los permitidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 donde solo se admite un límite máximo de 100 NMP/g para quesos frescos y es de destacar que aun con la identificación de muestras que rebasaron lo límites permitidos, un 78% de muestras de queso tipo Panela y un 72% de tipo Oaxaca se ubican dentro del límite máximo permitido.

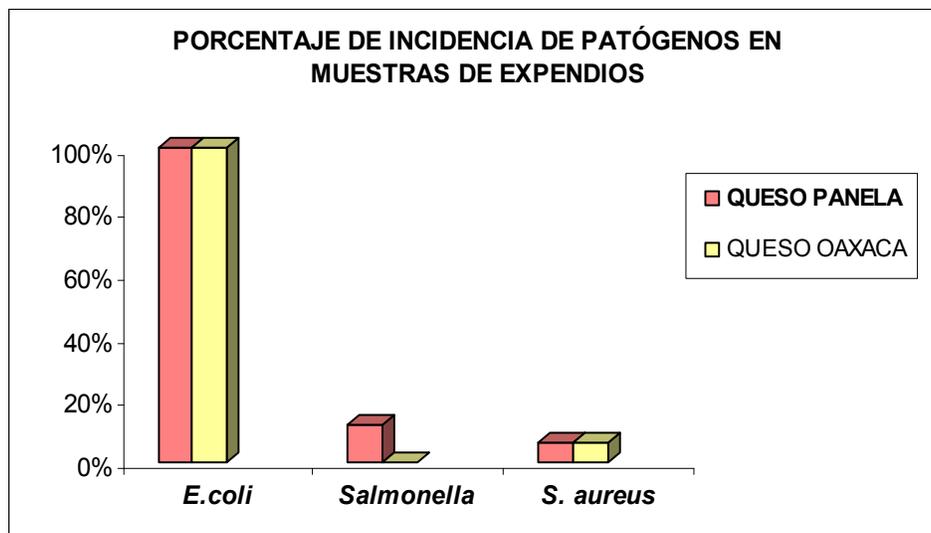
En cuanto a la incidencia de *E.coli*, esta fue evidente tanto en queso Panela como Oaxaca. Teniéndose en queso Panela un 72% de presencia y 83% en Oaxaca. Cabe mencionar que hoy día, no está establecido un límite permitido para incidencia de *E.coli* en quesos frescos pero es de suponerse que la presencia de este microorganismo origine tener un producto con

deficiencias sanitarias e higiénicas provenientes quizás desde su elaboración y/o conservación inapropiada (Orozco, 1999).

En cuanto a la presencia de *Salmonella*, esta se obtuvo en 2 muestras de queso tipo Panela (11.11 %) y una ausencia del 100% en muestras de queso tipo Oaxaca. Aunque el porcentaje de presencia de este microorganismo no es elevado con respecto al tamaño de la muestra (18 muestras tipo Panela), el interés radica en que su presencia en los alimentos se tiene como resultado de insalubridad con la que se maneja el producto desde su elaboración hasta su venta o lo que es igual, una mala intervención del operario con el producto, ya que *Salmonella* se difunde por medio de las heces de humanos o animales. Destacándose también, que esta bacteria puede multiplicarse y sobrevivir en diversas variedades (más de 60 días) en el post- proceso de los quesos (Roberts *et al.*2001).

Otro patógeno determinado fue *Staphylococcus aureus*, el cual se detectó en el 5.55 % del total de las muestras analizadas para cada tipo de queso (una muestra de cada 18) presentándose con un valor de 6 Log UFC/g en la muestra de tipo Panela y 2.69 UFC/g en la muestra de tipo Oaxaca. En un estudio similar realizado por Márquez y García (2007) reportaron una mayor presencia de este patógeno 48% en muestras de queso fresco (en el rango  $10^5$ - $10^7$  UFC/g). La importancia de la determinación de *S. aureus* radica en que un alimento presenta riesgo alimentario cuando se confirma la presencia en carga microbiana igual o superior a  $10^5$  UFC/g ya que de esta manera se pueda tener una de las enterotoxinas de este patógeno (Becquer-Lombard y col., 1997) por tanto, para el presente estudio, el riesgo existe en la muestra de queso Panela.

La Figura 8 representa el porcentaje de presencia y ausencia de los microorganismos *E.coli*, *Salmonella* y *S. aureus* en las muestras de quesos recolectadas en expendios de Tulancingo Hgo.



**Figura 8.-** Porcentaje de incidencia de patógenos en muestras de queso de expendios.

Generalizando los resultados obtenidos, en cuanto a la calidad microbiológica de quesos frescos obtenidos en expendios de Tulancingo Hgo., se puede mencionar que los productos que llegan al consumidor presentan una calidad microbiológica deficiente, debido a la presencia microorganismos como coliformes fecales, patógenos como *Salmonella*, *E.coli* y *S. aureus*.

Por una parte, las Normas Oficiales de nuestro país establecen parámetros específicos como el uso de materia prima pasteurizada (leche) dentro de la elaboración de quesos, lo cual si se llevara a cabo, ayudaría a disminuir o eliminar microorganismos provenientes de la leche cruda, no obstante la mayoría de productos lácteos procedentes de expendios pertenecen al comercio informal o microempresas con bajo o nulo control de calidad en sus procesos, acentuado posteriormente por la manipulación, superficies inadecuadas y/o exhibición de los quesos a temperaturas y periodos tiempo inapropiados. Es por ello que los resultados obtenidos en este apartado puedan tener su origen en alguna de las causas antes mencionadas.

## 6.2 Reactivación e incorporación de la cepa bacteriocinogénica en procesos industriales de elaboración de quesos

Después de reactivar e incorporar la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* en los procesos de elaboración de quesos frescos. Se seleccionaron al azar 6 muestras de queso tipo Panela y 6 muestras tipo Oaxaca procesadas con y sin la cepa (Figura 9).



**Figura 9.-** Muestras de queso tipo Panela y Oaxaca seleccionadas de LECH CARN S. A de C. V.

Del mismo modo, se realizó el análisis microbiológico a estas muestras, para conocer el efecto de la cepa en el control de la proliferación bacteriana y por ende, la prevención del deterioro y descomposición de los productos elaborados en la empresa.

Los resultados obtenidos para las muestras de queso tipo Panela y Oaxaca (con y sin la cepa 110 *Lb. plantarum*) se presentan a continuación:

**Tabla 10.-** Análisis microbiológico (Log UFC/g) a quesos tipo Panela elaborados con y sin la cepa 110 *Lactobacillus plantarum*.

QUESO TIPO PANELA								
	BAM		BAL		M Y L		CT	
CODIGO	Sin cepa	Con cepa						
<b>1 QP</b>	7.83	8.52	6.69	7.47	2.5	2.1	4.08	2.46
<b>2 QP</b>	6.73	7.64	5.89	6.73	2.38	1.87	3.77	2.01
<b>3 QP</b>	7.9	8.9	6	7.57	2.26	2.05	3.19	3
<b>4QP</b>	7.52	8.56	6.57	7.41	2.3	2.16	3.02	2.11
<b>5 QP</b>	7.83	8.38	5.77	7.72	2.45	1.99	2.85	2.39
<b>6 QP</b>	8.53	8.22	6.43	7.33	2.26	1.14	4.11	3.9
<b>MEDIA</b>	7.72	8.37	6.23	7.37	2.36	1.89	3.50	2.65
<b>SD</b>	<b>0.59</b>	<b>0.42</b>	<b>0.39</b>	<b>0.34</b>	<b>0.10</b>	<b>0.38</b>	<b>0.55</b>	<b>0.71</b>
<b>MINIMO</b>	6.73	7.64	5.77	6.73	2.26	1.14	2.85	2.01
<b>MAXIMO</b>	<b>8.53</b>	<b>8.9</b>	<b>6.69</b>	<b>7.72</b>	<b>2.5</b>	<b>2.16</b>	<b>4.11</b>	<b>3.9</b>

**Tabla 11.-** Análisis microbiológico de coliformes fecales y *E. coli* (NMP/g) a quesos tipo Panela elaborados con y sin la cepa 110 *Lactobacillus plantarum*.

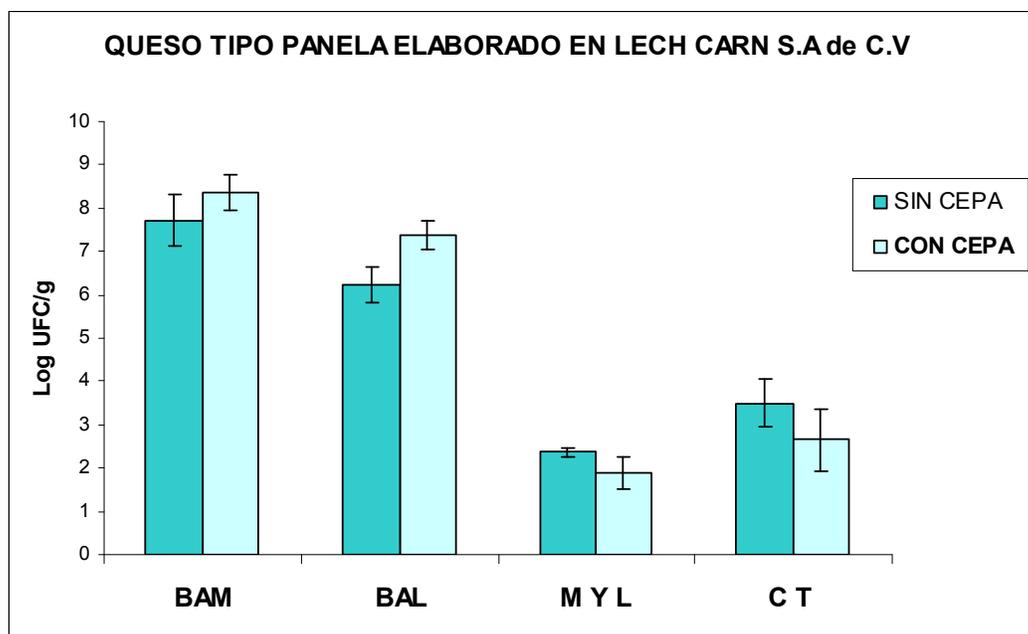
QUESO TIPO PANELA				
	CF		<i>E.coli</i>	
CODIGO	Sin cepa	Con cepa	Sin cepa	Con cepa
<b>1 QP</b>	15	7.4	3.6	3.6
<b>2 QP</b>	7.4	6.2	3.6	<3.0
<b>3 QP</b>	7.2	6.2	3	6.1
<b>4QP</b>	14	7.2	7.2	<3,0
<b>5 QP</b>	20	3	7.2	3.0
<b>6 QP</b>	27	3	11	<3.0
<b>MINIMO</b>	7.2	3	<b>3</b>	<b>&lt; 3,0</b>
<b>MAXIMO</b>	<b>27</b>	7.4	<b>11</b>	<b>6.1</b>

Con los resultados obtenidos en las muestras de queso Panela procesadas con la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* se puede apreciar que las BAM y BAL fueron mas altas en cantidad promedio con respecto a las muestras elaboradas de manera tradicional, lo anterior se tiene como resultado de la propia adición de dicha cepa; ya que si bien *Lactobacillus plantarum* pertenece al grupo de las BAL.

Hoy día, diversos cultivos lácticos son agregados en la elaboración de quesos, debido a que con su incorporación el medio del producto se acidifica (pH 4 – 5) inhibiendo así a gran flora patógena o banal del producto y junto con el uso de leche pasteurizada ayudan a obtener productos con características similares (sabor, aroma o textura) a los elaborados de modo tradicional (Centeno y col., 1996; Medina y col., 2001). Garantizando una prolongación de la vida de anaquel del producto así como la seguridad del consumidor (Villegas, 2004).

Por otra parte, en la determinación de mohos y levaduras se observó un valor promedio de 2.25 Log UFC/g en muestras fabricadas sin la cepa, valor que fue superior al registrado en quesos añadidos con la cepa donde se presento un valor promedio de 2.07 Log UFC/g.

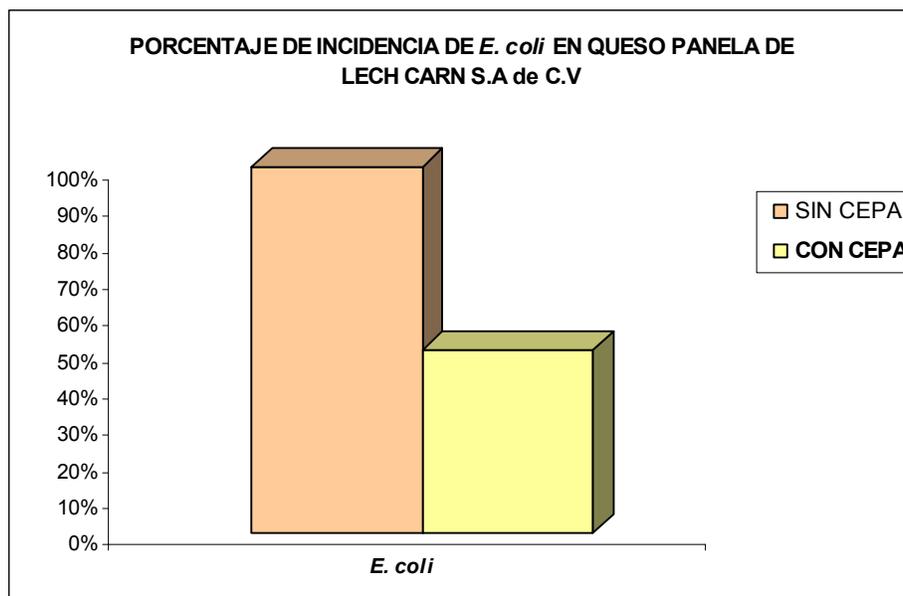
Para coliformes totales se presento una diferencia entre ambos tipos de muestras, reportando 3.50 Log UFC/g en muestras elaboradas de modo tradicional y 2.65 Log UFC/g en muestras tipo Panela procesadas con la adición de la cepa. Resultados que son similares al estudio previo que realizo López (2006), donde reporto una disminución de coliformes totales al elaborar quesos frescos de modo tradicional y después de controlar el proceso con leche pasteurizada y un cultivo iniciador, la disminución se dio de 5.73 Log UFC/g a 2.77 Log UFC/g (Figura 10)



**Figura 10.-** Resultados expresados en Log UFC/g de análisis microbiológicos en muestras de queso Panela de LECH CARN S.A de C.V.

Cabe mencionar que en la empresa LECH CARN S. A de C.V se utiliza leche pasteurizada como materia prima, así también se lleva un control de higiene y manipulación del producto durante su elaboración; aunado con el implementado de la cepa bacteriocinogénica los resultados para coliformes fecales se vieron modificados. Quizás y debido a ello, la cantidad de estos microorganismos presentaron valores máximos de 27 NMP/g en los quesos fabricados de modo tradicional y 7.4 NMP/g con la aplicación de la cepa.

Aunque la presencia de *E.coli*, se detectó en la mayoría de las muestras de queso Panela desarrolladas en la empresa, cabe destacar que los valores registrados para el primer grupo (elaboradas de modo tradicional) presentaron incidencia en el 100 % de las muestras dando valores máximos de hasta 11 NMP/g, mientras que para las muestras incorporadas con la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* la incidencia se detectó solo en el 50 % con un valor máximo de 6.1 NMP/g (Figura 11). Por lo que se puede decir que probablemente la cepa esta actuando de manera importante en la inhibición de este microorganismo.



**Figura 11.-** Resultados de la incidencia de *E.coli* en muestras de queso Panela de LECH CARN S. A de C.V.

Por otro lado, en cuanto a la presencia de otros patógenos como *Salmonella* y *S. aureus*, esta no fue detectada. Esto puede deberse a que la cepa de BAL, fue capaz de inhibir el crecimiento de estos microorganismos, debido a los diferentes metabolitos (ácido láctico o bacteriocinas) producidos en la fermentación láctica (Axelsson, 1998) y reforzar lo estudiado por Neria (2006).

Por otra parte, después de efectuar la fabricación de ejemplares de queso Oaxaca elaborados con y sin la incorporación de la cepa 110 *Lactobacillus plantarum*, las muestras se sometieron al análisis microbiológico. A continuación se presentan los resultados obtenidos en ambos casos:

**Tabla 12.-** Análisis microbiológico (Log UFC/g) a quesos tipo Oaxaca elaborados con y sin la cepa 110 *Lactobacillus plantarum*.

QUESO TIPO OAXACA								
	BAM		BAL		M Y L		CT	
CODIGO	Sin cepa	Con cepa	Sin cepa	Con cepa	Sin cepa	Con cepa	Sin cepa	Con cepa
<b>1 QO</b>	8.74	8.3	7.54	8.22	2.1	1.9	1.48	0.68
<b>2 QO</b>	8.92	8.81	8.08	8.02	2.1	2.08	1.26	0.33
<b>3 QO</b>	7.92	7.51	6.51	6.72	2.26	2.1	1.78	1.28
<b>4 QO</b>	8.87	8.33	7.59	7.21	1.78	1.14	1.7	1.03
<b>5 QO</b>	7.73	8.81	7.62	7.81	1.21	1.09	1.52	0.87
<b>6 QO</b>	8.22	7.9	6.9	5.78	1.81	1.75	0.33	0.35
MEDIA	8.40	8.28	7.37	7.29	1.88	1.68	1.35	0.76
<b>SD</b>	<b>0.51</b>	<b>0.51</b>	<b>0.57</b>	<b>0.93</b>	<b>0.38</b>	<b>0.45</b>	0.53	0.38
MINIMO	7.73	7.51	6.51	5.78	1.21	1.09	0.33	0.33
<b>MAXIMO</b>	<b>8.92</b>	<b>8.81</b>	<b>8.08</b>	<b>8.22</b>	<b>2.26</b>	<b>2.10</b>	1.78	1.28

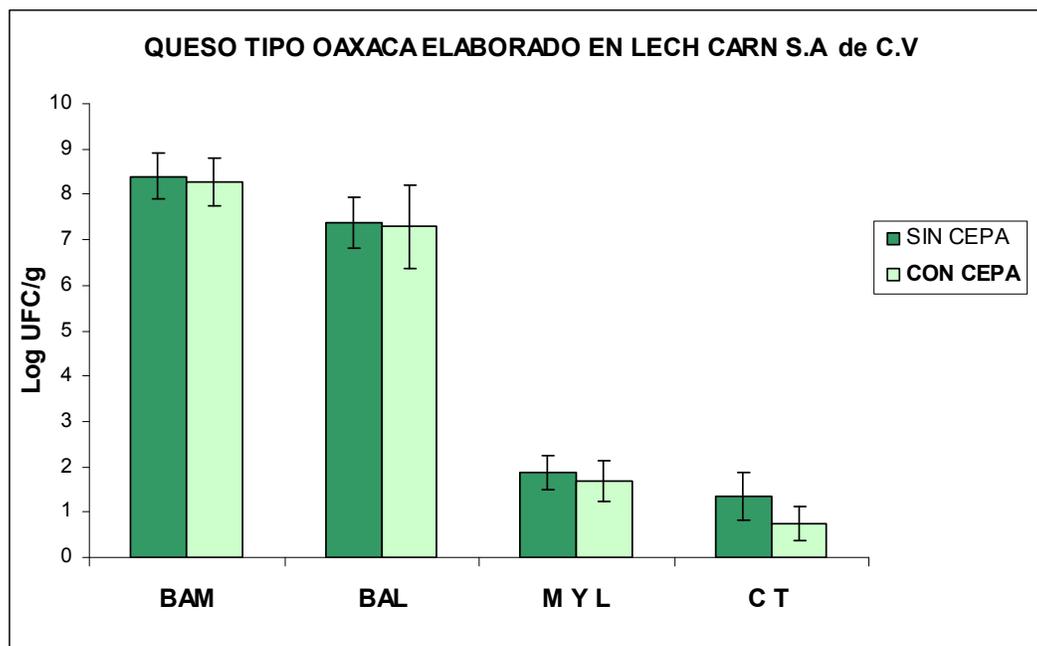
**Tabla 13.-** Análisis microbiológico de coliformes fecales y *E. coli* (NMP/g) a quesos tipo Oaxaca elaborados con y sin la cepa 110 *Lactobacillus plantarum*.

QUESO TIPO OAXACA				
	CF		<i>E.coli</i>	
CODIGO	Sin cepa	Con cepa	Sin cepa	Con cepa
<b>1 QO</b>	16	3	11	<3,0
<b>2 QO</b>	27	7.2	11	3.6
<b>3 QO</b>	11	11	3.6	6.2
<b>4 QO</b>	7.2	7.4	3	<3,0
<b>5 QO</b>	9.2	3.6	3.6	3
<b>6 QO</b>	15	7.2	7.4	6.1
MINIMO	7.2	3	<b>3</b>	<b>&lt; 3.0</b>
<b>MAXIMO</b>	<b>27</b>	11	<b>11</b>	<b>6.2</b>

De acuerdo al método de elaboración del queso tipo Oaxaca donde se mencionan puntos importantes y críticos como acidez adecuada de la leche, la acidificación de la cuajada (incorporación de cultivos lácticos), determinación del punto de hebra o hilado y el amasado de la pasta (Scott, 1991).

Es importante destacar que es en este tipo de muestras, donde existe una mayor competencia de los microorganismos por los nutrientes del producto, es quizás por ello, que al aplicar la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* se observó una diferencia en la determinación de las bacterias mesófilas aerobias (BAM) donde las muestras sin la cepa presentaron un valor promedio de 8.40 Log UFC/g y la adición de la cepa un valor de 8.28 Log UFC/g. Lo anterior, también se observó en las BAL donde los quesos elaborados de modo tradicional mostraron un valor promedio de 7.37 Log UFC/g y las incorporadas con la cepa presentaron un valor de 7.29 Log UFC/g.

La incorporación de la cepa de *Lb. plantarum* en los procesos de elaboración de productos lácteos, permitió tener una disminución en las cuentas de mohos y levaduras, siendo así que las muestras sin cepa alcanzaron un valor promedio de 1.35 Log UFC/g y con cepa reportaron 0.76 Log UFC/g. (Figura 12).

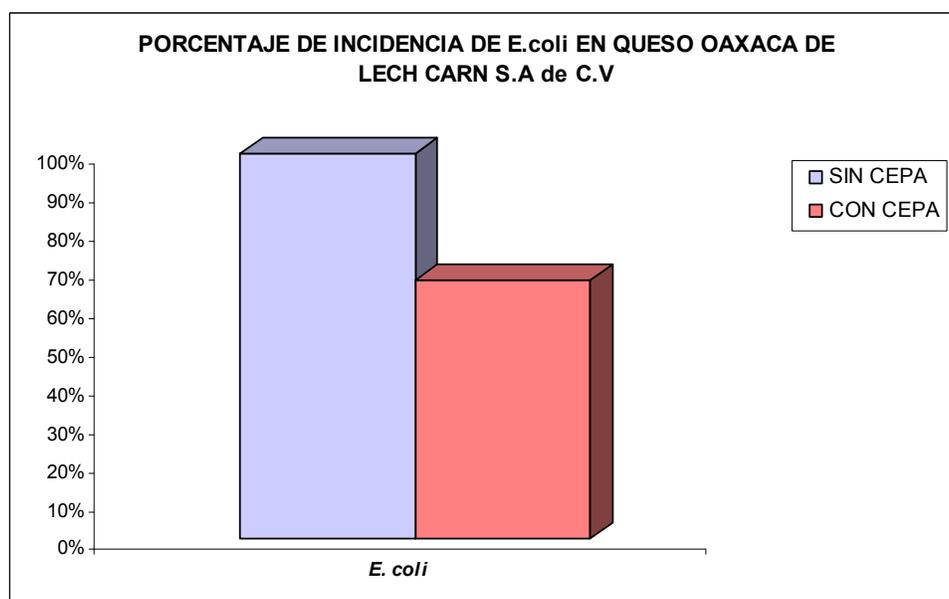


**Figura 12.-** Resultados expresados en Log UFC/g de análisis microbiológicos en muestras de queso Oaxaca de LECH CARN S. A de C.V.

Para coliformes fecales se presentó un valor máximo de 27 NMP/g y un valor de 11 NMP/g en las muestras fabricadas con la incorporación de la cepa, con lo anterior se logró observar una vez más el efecto bacteriocinogénico de la cepa.

En esta ocasión, la incidencia de *E.coli* se dio nuevamente en el 100% de las muestras elaboradas de modo tradicional teniendo como valor máximo 11 NMP/g y en las muestras elaboradas con la cepa la incidencia se dio en el 67% con un valor máximo de 6.2 NMP/g (Figura 13).

Nuevamente se dió una ausencia de 100% para la determinación de patógenos como *Salmonella* y *St. aureus*.



**Figura 13.-** Resultados de la incidencia de *E.coli* en muestras de queso Panela de LECH CARN S. A de C.V.

## 7. CONCLUSIONES

De las muestras de queso tipo Panela y Oaxaca obtenidas de expendios de Tulancingo Hidalgo, el 11.11% de muestras de Panela reportó presencia de *Salmonella*, el 5.55% en ambos quesos registro presencia de *S. aureus*; así también la incidencia de *E.coli*. se dio en el 72% de muestras tipo Panela y un 83% en Oaxaca.

Se detectó que en estos productos existen fallas tanto en su calidad sanitaria, como en los procesos de elaboración, manipulación y comercialización; por la considerable contaminación de microorganismos indicadores como coliformes fecales, coliformes totales y microorganismos patógenos.

Las muestras de queso fabricadas en la empresa LECH CARN S. A de C.V y adicionadas con la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* presentaron un reducción en incidencia de *E.coli* (reportando un 50% en tipo Panela y 33% en Oaxaca) en comparación con las elaboradas de modo tradicional.

Se observó ausencia de *Salmonella* y *S. aureus* en el 100% de los ejemplares elaborados en la empresa LECH CARN, lo que indica las buenas practicas de manufactura que en ella se llevan a cabo.

Las muestras de queso tipo Panela y tipo Oaxaca elaboradas con la cepa 110 *Lactobacillus plantarum* y de acuerdo con los bajos recuentos microbianos registrados, respaldan un producto final con calidad higiénica, de larga vida de anaquel y segura para el consumidor.

---

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alais, Ch. 2003. Bacterias lácticas y fermentos. En: Ciencia de la leche. Editorial Reverté. S.A España.

Amador, L.R., E.F. Rendón y R.R. Montaña.1993. Manual de laboratorio de Microbiología Sanitaria. 2ª Edición. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología.

Aray, C. 2002. Calidad microbiológica del queso blanco venezolano tipo telita. Trabajo de Especialización. Universidad Simón Bolívar. Sartenejal, Edo. Miranda. Venezuela.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds). Marcel Dekker, Nueva York.

Ayala, R.I. 2003. Quesos. Licuados depurativos.4-5. Radar Editores, S. A de C.V. México

Bascom, S. y Manafi, M., 1998. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. *Am. Soc. Microbiol.*11 (2): 318-340.

Becquer-Lombard, A., V. Legua-Castillo; C. Lara-Ortiz y L. Mota-De la Garza. 1997. Staphylococcus aureus, actividad termonucleasa y enterotoxinas en alimentos. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 11(2):89-93

Björktroth, J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., J. y Vandamme, P. 2002. Taxonomic study on *Weissella confusa* and description on *Weissella cibaria* sp., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52: 141-148.

Centeno, J. A, Cepeda, A. y Rodríguez-Otero, J. L. 1996. Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cows' milk cheese. *Inter. Dairy. J*, 6: 65-78.

Champagne, C.P., 1998. Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. En : La Fondation des Gouverneurs et Edisem. Sainte-Hyacinthe, Canadá.

Chapman, H. R., and M.E Sharpe. 1990. Microbiology of cheese, p.203-289. En: R. K. Robinson (ed), *Dairy Microbiology*, Vol.2. *Elsevier Applied Science*, New York.

Clavel, M .M. 2006. Condiciones microbiológicas y aislamiento de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Díaz-Rivero. C., y González de García, B. 2001. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Rev. Salud Pública y Nutrición*. Vol.2 No. 3. Nuevo León. México.

Ellner R. 2000. Microbiología de la leche y de los productos lácteos. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Madrid, España.

Fachlam,R., y Elliott, J.A., 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the *Streptococci* and *Enterococci*. *Am. Soc. Microbiol.* 8 (4): 479-495.

Fernández, E.E. 2000 Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1ª Edición. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Frazier, W.C y Westhoff, D.C. 2000. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España

González, A. F., Torres M. J., y Vallejo B. 2004. Tecnificación del proceso artesanal para la obtención de queso fresco mexicano. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora México.

Hammes, P.W., y S.P Tichaczek. 1994. The potencial of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Lebensmittel- Untersuchung und-forsching*.193-201

Hicks, C. L., Allauddin, M., Langlois, B. E. and O' Leary, J. 1982. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. *J. Food Prot.* 45:331-334.

Hoover, G.D y R.L Steenson.1993 Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press. E.U.A

<http://www.inegi.gob.mx>. Indicadores de la encuesta industrial. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. (INEGI). Agosto 2007.

<http://www.sagarpa.gob.mx>. Sistema de Información Estadística y Pesquera SAGARPA., Agosto 2007.

Jay, J. M. 2000. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia. 4ª Edición. Zaragoza, España

Keating, F.P., Rodríguez, G. H. 2002. Introducción a la lactología. Editorial Limusa, 2ª Edición. México.

Leveau, J.Y. y Bouix , M. 2000 Taxonomía y ecología: Los diferentes géneros de bacterias lácticas. Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial. (Eds). Acribia, Zaragoza España. pp 167-206

López, D. Á. 2006. Alternativas para fabricar queso colonial artesanal seguro para el consumidor. Projeto sebrae/atuaserra de capacitação de agroindústrias de laticínios. Universidad de Caxias. Brasil.

Medina, M., Fernández del Pozo, B., Rodríguez-Marin, M. A, Gaya, P. y Núñez, M. 1991. Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *J. of Dairy Science*. 58: 355-361.

Neria, P. A. 2006. Evaluación de la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Nettles, C.G., y S.F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 54(4): 338-356

Orozco, L. R. 1999. Algunos factores que afectan la inocuidad microbiana del queso Oaxaca durante su elaboración y almacenamiento. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Ortiz, B. M. 2006. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. México.

Raccach, M. 1987. Pediococci and biotechnology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 14: 291-309.

Roberts, T.A., Pitt, J.I., Grau, F.H. y Farkas, J. 2001. Microorganismos de los alimentos 6, Ecología microbiana de los productos alimenticios. Editorial Acribia. Zaragoza España

Rodríguez, G. E. Caracterización de una cepa de *Lactobacillus plantarum* aislada de productos lácteos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Schleifer, K.H., Graus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D., and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 183-195

Schöbitz, R., Marín, M., Horzella, M. y Carrasco, E. 2001. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Austral de Chile, Casilla: 47, Valdivia, Chile.

Scott, R. 1991. Starters. En: Fabricación de queso. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.

Secretaria de Salud. NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Secretaria de Salud. NOM-109-SSA1-1994. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Secretaria de Salud. NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Secretaria de Salud. NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Secretaria de Salud. NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

Secretaria de Salud. NOM-115-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en Alimentos.

---

Secretaria de Salud. NOM-121-SSA1-1994. Quesos frescos madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Reglamento de control sanitario de productos y servicios de la Secretaria de Salud.

Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70:331-34.

Stiles, M.E, y Holzapfel, W.H 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J.Food Microbiol.* 36:1-29

Tood, E.C.D 2001. Epidemiology and globalization of foodborne disease. En: *Guide to foodborne pathogens*, Labbé, R.G y García, S. (Eds). Wiley-Interscience.

Torres, V. M. R. 2002. Agentes Patógenos Transmitidos por los alimentos. Vol. I Universidad de Guadalajara, México.

Turkoglu, H., Ceylan, Z. G. and Dayisoğlu, K. S. 2003. The microbiological and chemical quality of Orgu cheese produced in Turkey. *Pakistan J. of Nutrition*. 2 (2): 92-94

Veisseyre, R. 1990. *Lactología técnica*, 3ª Edición (Eds). Acribia S. A Zaragoza España.

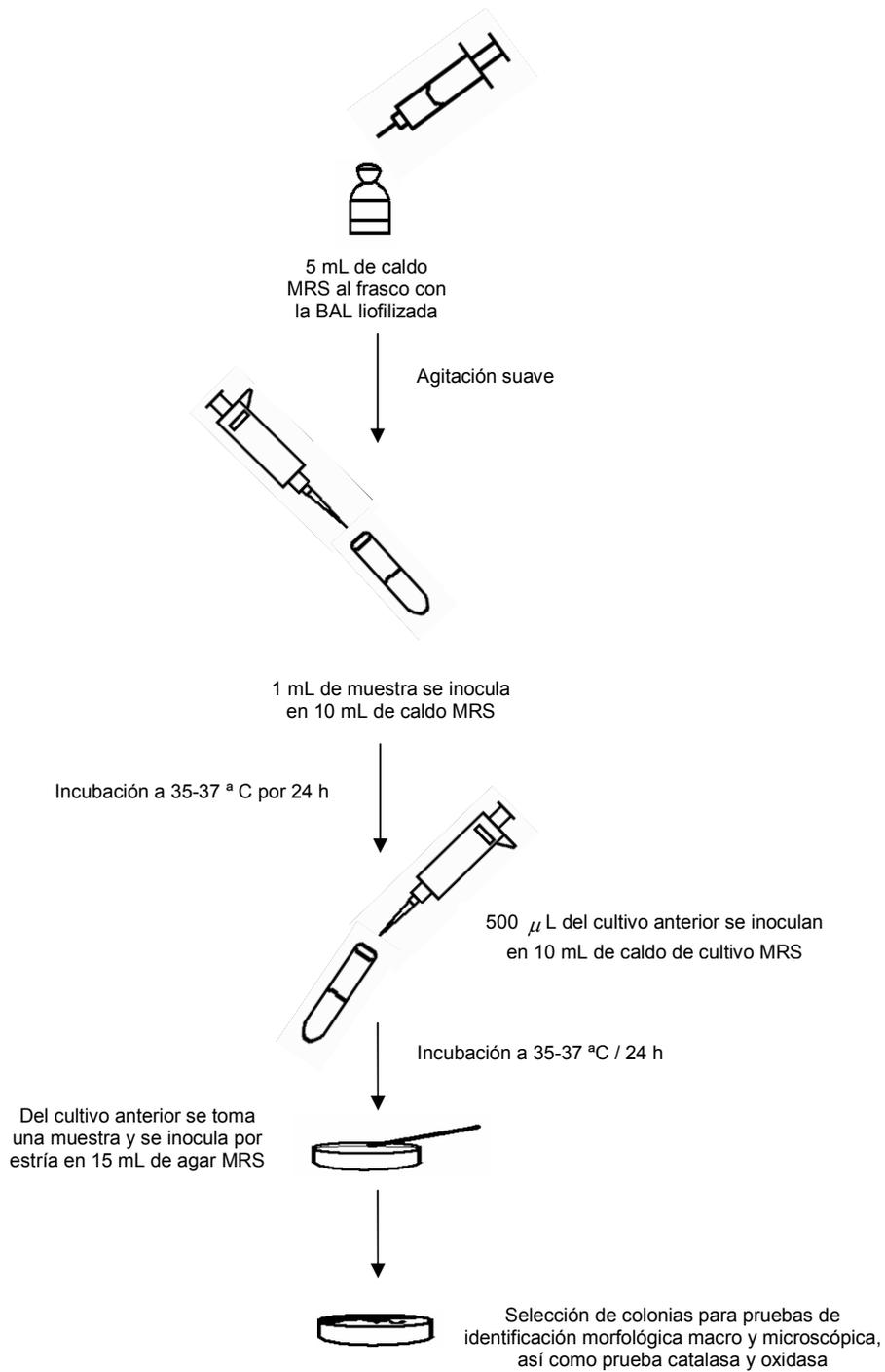
Villegas, A. 2004. *Tecnología quesera*. Primera Edición. Editorial Trillas. México.

Williams, A. M., Fryer, J. L., and Collins, M.D. 1990. *Lactococcus piscium* sp. Nov. A new *Lactococcus* species from salmonid fish, *FEMS Microbiol. Lett.*, 68: 109-114

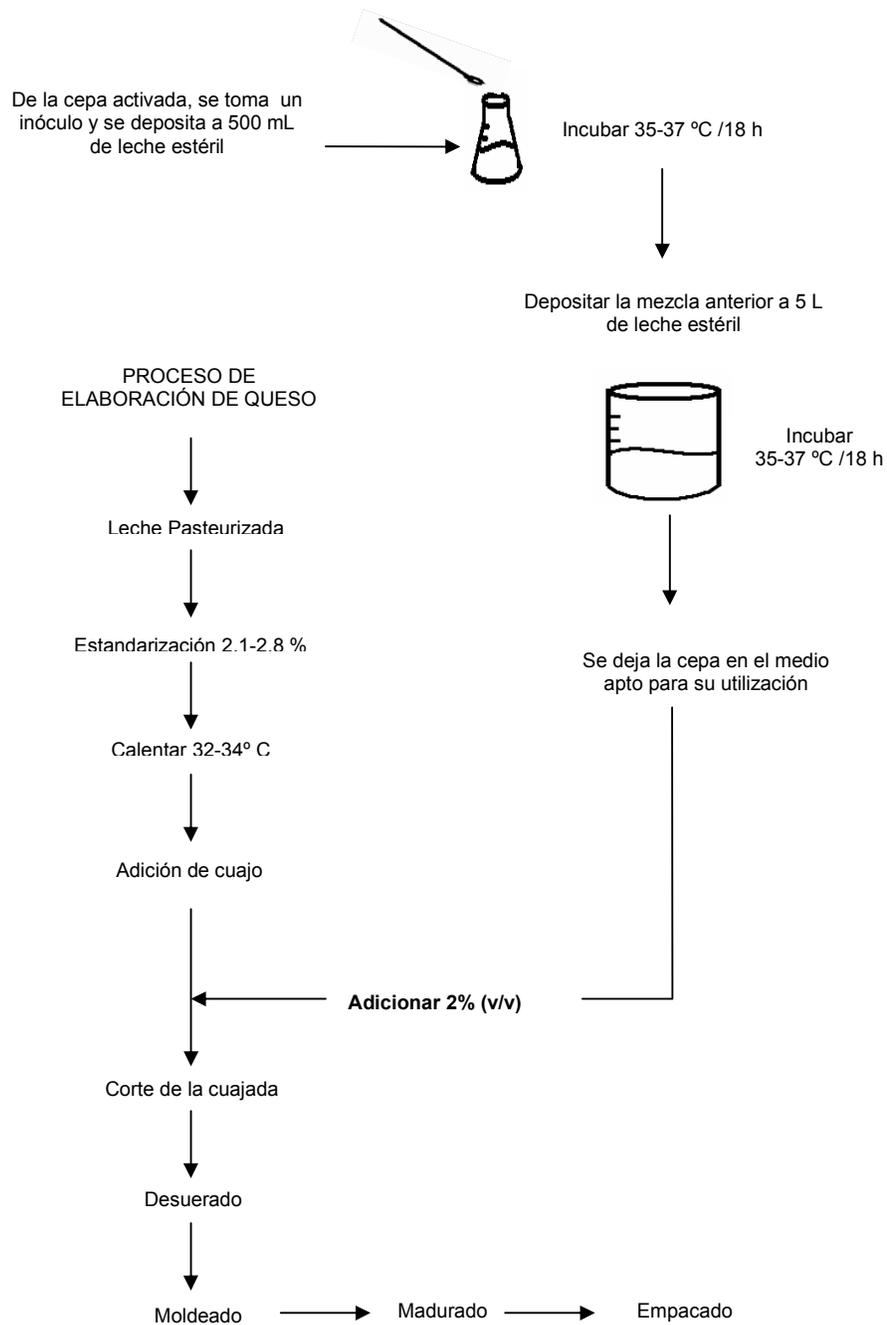
Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. University of Helsinki. Ph. Tesis. Helsinki.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Reactivación de la cepa bacteriocinogénica 110 *Lb. plantarum*



## 9.2. Incorporación de la cepa 110 *Lb. plantarum* en procesos de fabricación de quesos



**9.3. Equipos e Instalaciones de LECH CARN S. A de C. V.**



**Área de pesado**



**Área de pasteurización**



**Área para corte de cuajada**



**Área para desuerado**



**Área de producto terminado**