



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**“CONDICIONES MICROBIOLÓGICAS Y AISLAMIENTO DE
BACTERIAS LÁCTICAS EN QUESOS ARTESANALES DEL
ESTADO DE HIDALGO”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

MARIBEL CLAVEL MAQUEDA

ASESORES:

**DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ
M. en C. IRAIS SÁNCHEZ ORTEGA**



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO, 2006



Este trabajo se desarrolló como parte del proyecto “Aislamiento y caracterización de bacterias lácticas bacteriocinogénicas a partir de alimentos y su aplicación como cultivos iniciadores en alimentos fermentados en el Estado de Hidalgo” financiado por el Programa Institucional de Investigación (PII)-2004 de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Clave: UAEH-DIP-ICBI-AAQ-011, a cargo de la Dra. Eva María Santos López.



Los resultados del presente trabajo fueron presentados en el Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2004, Monterrey Nuevo León; con las ponencias:

1. "AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) DE PRODUCTOS LÁCTEOS DEL ESTADO DE HIDALGO"
2. "CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS ELABORADOS ARTESANALMENTE EN EL ESTADO DE HIDALGO".

DEDICATORIAS

A mis padres Sixto y Julia con el más sincero y eterno agradecimiento por haberme dado la vida, por inculcarme siempre los principios y valores más importantes que una persona puede tener, pero en especial porque con tanto sacrificio y esfuerzo pudieron brindarme la oportunidad de estudiar una carrera profesional, mil gracias por todo su amor y apoyo.

A Mireya, Mayra y Martín, los mejores hermanos que pude tener, gracias por ser parte importante en mi vida, por brindarme siempre su apoyo, cariño y paciencia, quiero que sepan que los quiero muchísimo.

A Elfego porque siempre estas presente cuando mas te necesito, porque me has brindado siempre amor, comprensión y apoyo en todos los aspectos de mi vida, mil gracias por todo. Te amo...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, pues fue la casa de estudios que me otorgo un lugar entre tantos para poder formarme profesionalmente, de igual manera por el financiamiento otorgado a través del Programa Institucional de Investigación (PII)-2004 con Clave: UAEH-DIP-ICBI-AAQ-011

A todos mis profesores de la Lic. en Química en Alimentos por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia y apoyo muchas gracias.

A la Dra. Eva María Santos López por permitirme formar parte de su proyecto, por todas sus enseñanzas, paciencia y apoyo para la realización del presente trabajo; gracias por todo.

A la Dra. Armida, Dr. Santiago, Dra, Alma Delia, Dra. Angélica, M. en C. Irais y Q. A. Eduardo por todos sus consejos para la realización de este trabajo.

A toda mi familia por brindarme todo su cariño y apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis compañeras de la carrera Ale, Coco, Marineth, Mary, Yady, Paty, Viry, Fa, Yuri, Judith, Gloria, Elsa, Judith C., Angie, Mariana, Karol, Liz, Itzma, Zenia, Claus, por todos los momentos que compartimos juntas, por su amistad y apoyo que siempre me brindaron.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas, Aidé, Lili, Coco, Marineth, Ale, Gloria, Jaime, Tina, Mari y Yady porque siempre hubo una sonrisa para mí y por hacer tan amena mi estancia en el laboratorio.

A mis grandes amigos de la uni, Omar, Alfredo, Temo, Nahum, porque siempre buscaron lo mejor para mí, por cuidarme siempre y hacerme sonreír a cada instante, jamás olvidaré esos momentos.

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS	2
1.1.1. Leche	2
1.1.2. Productos lácteos	6
1.1.2.1. Composición de productos lácteos	7
1.1.2.2. Algunos productos lácteos	8
1.2. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS	16
1.2.1. Microbiología de la leche	16
1.2.2. Microbiología de productos lácteos	18
1.2.2.1. Microorganismos alterantes de la leche y productos lácteos	20
1.2.3. Normas microbiológicas para leche y productos lácteos	23
1.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	25
1.3.1. Características principales	26
1.3.2. Exigencias nutricionales	27
1.3.3. Metabolismo de bacterias lácticas	28
1.3.4. Clasificación de bacterias lácticas	32
1.4. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS INHIBITORIAS	37
1.4.1. Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas	38
1.4.1.1. Ácido láctico	38
1.4.1.2. Ácido acético	39
1.4.1.3. Acetaldehído	39
1.4.1.4. Peróxido de Hidrógeno	40
1.4.1.5. Diacetilo	40
1.4.1.6. Ácidos grasos	41
1.4.1.7. Bacteriocinas	42
1.4.2. Cepas de probióticos	43

1.5. CONSERVACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS	44
1.5.1. Congelación	44
1.5.2. Liofilización	46
2. OBJETIVOS	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1. MATERIAL	51
3.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	52
3.2.1. Determinación de flora aerobia mesófila.....	54
3.2.2. Determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	54
3.2.3. Bacterias ácido lácticas	57
3.3. SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	57
3.4. CONSERVACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	60
3.4.1. Congelación de cepas de bacterias ácido lácticas.....	60
3.4.2. Liofilización de cepas de bacterias ácido lácticas	62
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	68
4.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS	79
4.3. CONSERVACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS	83
5. CONCLUSIONES	85
6. BIBLIOGRAFÍA.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

No. de Tabla	Página
1. Composición de la leche de vaca	4
2. Principales productos lácteos utilizados universalmente	7
3. Composición aproximada, pH y a_w de algunos productos lácteos	8
4. Límite máximo para la presencia de microorganismos en Leche pasteurizada.....	24
5. Especificaciones sanitarias para los quesos frescos, maduraos y procesados.....	25
6. Especificaciones sanitarias para los quesos de suero	25
7. Algunos microorganismos utilizados como cultivos iniciadores.....	26
8. Productos analizados	51
9. Clasificación de productos lácteos analizados de acuerdo a su tipo	65
10. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de quesos Oaxaca	68
11. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de queso panela.....	70
12. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de queso canasto.....	73
13. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de queso manchego.....	75
14. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) realizado a las muestras clasificadas como otros productos	76
15. Cantidad de bacterias lácticas y levaduras por tipo de producto.....	80
16. Resultados obtenidos de las pruebas aplicadas a BAL.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Producción de leche de ganado bovino en México	3
2. Proceso general de elaboración de un queso típico.....	15
3. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas	30
4. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas	31
5. Procedimiento del análisis microbiológico realizado a las muestras de productos lácteos.....	53
6. Procedimiento para realizar la determinación de flora aerobia mesófila	55
7. Procedimiento para la determinación de coniformes y <i>E. coli</i>	56
8. Procedimiento para realizar el recuento de bacterias ácido lácticas	58
9. Procedimiento para realizar la prueba de catalasa.....	59
10. Procedimiento para realizar la congelación de cepas de BAL.....	61
11. Procedimiento realizado para liofilizar las cepas de bacterias ácido lácticas	63

1. INTRODUCCIÓN

A través de la historia, el hombre ha aprendido diferentes formas de utilizar las bacterias lácticas. Tradicionalmente las ha empleado para elaborar algunos productos alimenticios fermentados, heredando por generaciones la tecnología de la fermentación. Pasteur descubrió las bacterias lácticas en 1857, así como Lister reportó el aislamiento de bacterias a partir de leche ácida en 1873; Tissier descubrió especies de *Bifidobacterium* en 1889, y *Lactobacillus acidophilus* fue descubierto por Moro en 1900.

Las bacterias lácticas han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que se encuentran en productos lácteos fermentados como yogur, productos cárnicos y en algunas hortalizas e incluso participan en la modificación de características del vino además de proporcionar sabor y textura e incrementar el valor nutricional de los alimentos. Desde hace décadas además las bacterias lácticas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana, contribuyendo así a la prevención de la descomposición de los alimentos (Leveau y Bouix, 2000).

Dada la importancia de las bacterias lácticas en la elaboración de alimentos, en este trabajo se pretende el aislamiento de cepas nativas de bacterias lácticas de productos lácteos fermentados de forma artesanal para formar un banco de cepas de bacterias ácido lácticas que puedan utilizarse a posteriori como cultivo iniciador. De forma complementaria se analizarán las condiciones microbiológicas de productos lácteos elaborados principalmente en el Estado de Hidalgo y que no llevan cultivo iniciador.

1.1. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Debido a que la leche se considera como un alimento nutritivo, pero a la vez muy perecedero, ha estado sometida desde tiempos prehistóricos a distintos tratamientos de conservación, como son: pasteurización, termoesterilización, fermentación, deshidratación, refrigeración y congelación, dando lugar a numerosos productos lácteos con diferentes sabores y texturas además de una microflora alterante muy variada (Fernández, 2000).

1.1.1. LECHE

La leche se define como el producto de la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos siendo rica en sustancias de fácil digestión, es un producto nutritivamente muy completo y aporta las proteínas las cuales contienen gran cantidad de aminoácidos esenciales, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales, que son necesarios para la alimentación humana considerándose a nivel mundial como un alimento ideal, ya sea consumido en forma fluida o a través de sus derivados como el queso (Fernández, 2000; Early, 2000).

Para el año 2003, la producción de leche de vaca en México ascendió a 9,863.3 millones de litros, con un crecimiento respecto al año anterior del 2.2%; en tanto que la Tasa Media de Crecimiento Anual (TMCA) en los últimos 10 años en la producción de leche es de 2.9% ([http://www.sagarpa.gob.mx.](http://www.sagarpa.gob.mx), Diciembre 2005).

En figura 1 se muestra la producción de leche en México, en la cual se aprecia que el mayor incremento se registró en la segunda mitad de la década de los 90's, disminuyendo la pendiente de crecimiento en los últimos tres años.

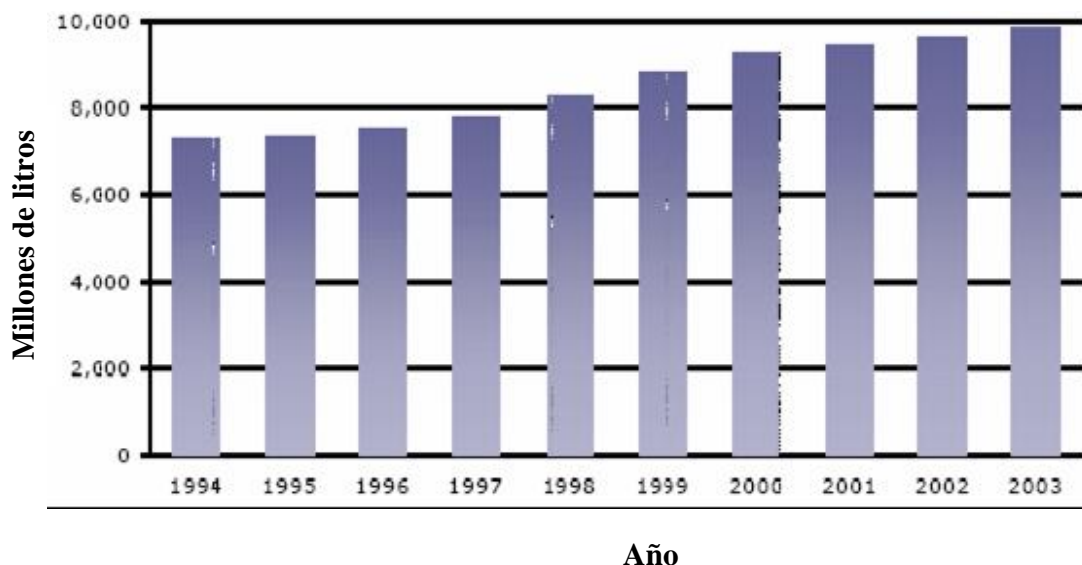


Figura1. Producción de leche de ganado bovino en México.

[http:// www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)., Diciembre 2005.

La leche es un buen medio de crecimiento para muchos microorganismos debido a su gran contenido de agua, a su pH neutro y a su gran variedad de nutrientes disponibles (Bishop y White, 1984). En la tabla 1 se muestran las concentraciones de los principales componentes de la leche.

La leche de vaca está formada de aproximadamente el 87.3% de agua y siendo el componente que se encuentra en mayor proporción. La producción de leche es afectada rápidamente por una disminución en el consumo de agua por parte del animal, de forma que disminuye la producción de leche cuando el suministro es limitado o no está disponible para el animal. Esta es una de las razones por las que la vaca debe de tener libre acceso a una fuente de agua abundante todo el tiempo (Alais, 1984).

Tabla 1. Composición de la leche de vaca (Jenness, 1988).

Componente	Cantidad
Agua (%)	87.3
Lactosa (%)	4.6
Lípidos (%)	3.9
Caseína (%)	2.6
Proteínas del suero (%)	0.6
Cationes de sales (mg/L)	
Sodio	58.0
Potasio	140.0
Calcio	118.0
Magnesio	12.0
Aniones de sales (mg/L)	
Citrato	176.0
Cloruro	104.0
Fósforo	74.0
Nitrógeno no proteico total (mg/L)	296.0
Nitrógeno de la urea (mg/L)	142.0
Nitrógeno peptídico (mg/L)	32.0
Nitrógeno aminoacídico (mg/L)	4.0
Nitrógeno de la creatina (mg/L)	25.0

El principal hidrato de carbono en la leche es la lactosa que está formada por glucosa y galactosa y que es fermentada por varias especies de bacterias lácticas para producir ácido láctico. A pesar de que es un azúcar, la lactosa no se percibe por el sabor dulce pero es quien le confiere el sabor a la leche. La concentración de lactosa en la leche es relativamente constante y promedia alrededor del 5% (4.6-

5.2%). A diferencia de la concentración de grasa en la leche, la concentración de lactosa es similar en todas las razas lecheras y no puede alterarse fácilmente con prácticas de alimentación. Sin embargo, no todos los productos lácteos poseen proporciones similares de lactosa. La fermentación de lactosa durante el procesado baja su concentración en muchos productos, especialmente en los yogures y quesos (Alais, 1984; Spreer, 1991).

En la leche de vaca el contenido de grasa varía notablemente debido a la raza, la edad, la alimentación y la salud del animal, sin embargo, los valores más comunes se encuentran entre el 3.5 y 6.0% (Keating y Rodríguez, 2002).

La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión. La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran en forma de triacilglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos. Las proporciones de ácidos grasos de diferente longitud de cadena determinan el punto de fusión de la grasa y por lo tanto da consistencia a la mantequilla que deriva de ella. La grasa de la leche contiene principalmente ácidos grasos de cadena corta (cadenas de menos de ocho átomos de carbono). Esta es una característica única de la grasa de la leche comparada con otras clases de grasas animales y vegetales. Los ácidos grasos de cadena larga en la leche son principalmente los insaturados, siendo los predominantes el oleico (cadena de 18 carbonos), y los polinsaturados linoleico y linolénico (Alais, 1984).

La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteína y su concentración en la leche varía de 3.0 a 4.0%, aunque dicho porcentaje varía según la raza animal. De todas formas existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la cantidad de proteína en la leche ya que cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína. Las proteínas se clasifican en dos grandes

grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%); dentro del grupo de las caseínas existen tres tipos (α , β y κ) y su comportamiento en la leche al ser tratada con calor, diferente pH (acidez) y diferentes concentraciones de sal, proporcionan las características peculiares de los diferentes productos lácteos (Alais, 1984).

Además la leche es una fuente excelente para el aporte de gran parte de los minerales requeridos por el ser humano. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto (Alais, 1984).

1.1.2. PRODUCTOS LÁCTEOS

Los productos lácteos constituyen sustratos de crecimiento microbiano muy diferentes de la leche líquida, ya que en ocasiones carecen de algunos nutrientes de ésta y en otros están muy concentrados o tienen un pH y una actividad de agua (a_w) menores (Frank, 1997).

En México, la industria láctea es la tercera actividad más importante en la industria de alimentos. Los principales productos lácteos en México son leche fluida 39%, yogurt 15%, leche en polvo 14%, queso 12%, crema 4% y otros 16%. En el caso del yogurt, su producción aumentó al doble entre los años 1996 y 2002, pues pasó de 174 a 415 mil ton (<http://www.inegi.gob.mx>., Enero 2006).

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, teniendo una participación del 4.3% con respecto al Total Nacional del Pronóstico 2005 y

ocupando el lugar número 8 en cuanto a la producción nacional (<http://www.sagarpa.gob.mx.>, Enero 2006).

En la siguiente tabla se muestran algunos de los productos lácteos elaborados y consumidos universalmente que incluyen fermentación en su proceso de elaboración.

Tabla 2. Principales productos lácteos utilizados universalmente (Jay, 1994).

Productos Lácteos	Materias primas	Microorganismos fermentadores
Leche acidófila	Leche	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Suero de mantequilla	Leche	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Quesos (madurados)	Cuajada de leche	Cultivos iniciadores
Kéfir	Leche	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i>
Yogur	Leche, sólidos de la leche	<i>Streptococcus termophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>
Crema	Leche	Cultivos iniciadores

1.1.2.1. COMPOSICIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS

Debido a que la composición de los productos lácteos es tan diversa, en la tabla 3 se indican los componentes principales, así como pH y a_w de algunos de los productos lácteos más comunes. El yogur es leche fermentada y por tanto constituye un medio rico en nutrientes pero con un pH bajo. Los quesos son menos ácidos que el yogur pero contienen menor cantidad de agua además de que se le añade sal lo que da lugar a una menor a_w . Además la naturaleza sólida de los quesos limita la movilidad de los microorganismos alterantes. La leche líquida concentrada, lo mismo que la leche desnatada evaporada, tienen una a_w que no es suficientemente baja para inhibir el deterioro bacteriano por lo que para conservarse

debe ser enlatada o refrigerarse. Las leches en polvo poseen una a_w suficientemente baja lo que puede impedir de alguna manera el desarrollo microbiano aunque no por completo (Frank, 1997).

Tabla 3. Composición proximal, pH y a_w de algunos productos lácteos (Bassette y Acosta, 1988).

Producto	Agua (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	a_w	pH
Mantequilla	15.9	81.1	3.6	0.06		6.3
Queso Cheddar	36.7	33.1	24.9	1.3	0.90-0.95	5.2
Queso suizo	37.2	27.4	28.4	3.4		5.6
Leche en polvo	3.2	0.8	36.2	52.0	0.20	
Leche evaporada	79.4	0.2	7.5	11.3	0.93-0.98	
Yogur	89.0	1.7	3.5	5.1		4.3

1.1.2.2. ALGUNOS PRODUCTOS LÁCTEOS

Los productos lácteos fermentados se producen por medio de la utilización de cultivos iniciadores que son microorganismos muy utilizados en la industria láctea con la finalidad de producir ácido láctico, por ejemplo en la elaboración de quesos de algunos tipos. Los cultivos iniciadores también se utilizan en la elaboración de mantequilla, de suero de mantequilla cultivado, 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: *Leuconostoc citrovorum*, *L. diacetylactis* o *L. dextransicum* (Jay, 1994).

A continuación se describen algunos de los productos lácteos comunes y sus características principales.

MANTEQUILLA. La mantequilla es una emulsión agua en aceite, está compuesta de más del 80% de grasa de leche, agua en forma de pequeñas gotas, y algunos sólidos no grasos de leche, con o sin sal; la textura es el resultado del amasado realizado durante el proceso a una temperatura apropiada, para formar una red de grasa cristalizada que le dará la suavidad deseada (Morales, 2003).

La tecnología de fabricación consiste en realizar la separación de la crema a partir de leche cruda, posteriormente se pasteuriza a 95°C y se realiza la maduración utilizando cultivos de *S. cremoris*, *S. lactis diacetyl lactis*, *Leuconostoc*, hasta tener un pH de 5.5 a 21°C y después a un pH 4.6 a 13°C, teniendo en cuenta que gran parte del sabor se obtiene a un pH entre 5.5 y 4.6. Posteriormente se realiza el añejamiento de la crema de 12 a 15 horas y seguida de un batido riguroso y violento provocando que la grasa coagule en forma de gránulos de mantequilla, mientras que el contenido de grasa en el líquido remanente, el suero de mantequilla, disminuye. Por último se realiza la separación de suero de mantequilla y mantequilla a la cual puede agregársele sal si así se desea (Morales, 2003).

SUERO DE MANTEQUILLA. La tecnología de fabricación para el suero de mantequilla parte de la fabricación de la mantequilla, donde después de realizar el batido de la crema se realiza la separación del suero de mantequilla al cual se le realiza una pasteurización y posteriormente una evaporación y secado (Morales, 2003).

LECHE ÁCIDA. La leche ácida es un producto obtenido de la leche normalizada y ligeramente enriquecida en su extracto seco. El microorganismo que típicamente

produce esta fermentación es el *Lactobacillus acidophilus*, en términos de sabor se trata de un producto ácido sin aroma característico, ya que este microorganismo no produce metabolitos en forma importante además del ácido láctico (Spreer, 1991).

Lactobacillus acidophilus crece muy lentamente en la leche, por lo cual ésta debe ser estéril para evitar que otras bacterias dominen la fermentación; la tecnología de elaboración consiste en inocular la leche con un volumen de 2-5%, y la incubación se realiza a 37–38°C durante 18-24 horas, y con esto se alcanza una acidez de 0.6-1% de ácido láctico, después de la fermentación el producto se enfría a 5–10°C y el coágulo se rompe por agitación mecánica; finalmente el producto se envasa y se mantiene en refrigeración (García y col., 2002).

CREMA AGRIA. La crema agria es un producto de crema fermentado generalmente se utiliza la misma tecnología de elaboración que en el caso de la leche ácida, sin embargo, para este caso la crema se pasteuriza antes de someterla al cultivo y después se enfría a 21°C antes de agregarla. La crema a la que se le ha adicionado el cultivo se mantiene a 21°C hasta que se produce la coagulación. En este punto la acidez llega a un nivel aproximado de 0.6%. El periodo de incubación es de 12 a 16 horas después de lo cual el producto se enfría y se mantiene a 4°C para evitar un mayor desarrollo de ácidos (Desroiser, 1999).

EL KÉFIR. El kéfir es un producto lácteo fermentado obtenido con un cultivo de kéfir y con leche fresca pasteurizada, normalizada en su contenido de grasa o desnatada, mediante un proceso de fermentación láctica y, en menor grado, de un proceso de fermentación alcohólica. El cultivo de kéfir esta compuesto por granos o gránulos de kéfir, que son los responsables de la fermentación. Estas formaciones tienen estructura de red y presentan una proporción aproximada de extracto seco de 10%. El extracto seco se compone principalmente de carbohidratos y proteínas. Los granos de kéfir contienen también una mezcla de bacterias y levaduras quienes son

las responsables de la estructura de red de los granos de kéfir, así como de la producción de alcohol y CO₂, mientras que las bacterias son las principales causantes de la acidificación (Spreer, 1991). La concentración final tanto de ácido láctico como de alcohol puede alcanzar un 1% (Jay, 1994).

YOGUR. El yogur es un producto lácteo fermentado que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* en leche. De esta fermentación debe resultar un líquido suave y viscoso, de textura firme, uniforme y con sabor característico. El yogur se elabora con leche clarificada, casi siempre de vaca, la cual puede ser entera o descremada, el contenido de grasa, adecuadamente homogenizada tratándose de yogur entero, tiene una importante contribución en la viscosidad, textura y apariencia del producto (García y col., 2002).

Debido a su alto consumo en México los quesos merecen un apartado especial por lo que a continuación se detallan más ampliamente.

QUESOS. Se cree que los quesos tienen su origen en la observación accidental de la fermentación de la leche cuando era transportada en estómagos de animales, lo que ocasionaba la separación de suero y cuajada; el secado y/o salado parcial de ésta última. En la actualidad, se conoce una gran diversidad de estos dependiendo de condiciones tecnológicas que con el tiempo se han desarrollado en diversas regiones de todos los continentes (ICMSF, 1998).

Se pueden clasificar en cuanto a su maduración en tres tipos (Keating y Rodríguez, 2002):

a) Frescos: se caracterizan por su alto contenido en humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración.

b) No madurados: son aquellos quesos que no son sometidos a ningún tipo de fermentación.

c) Quesos madurados: se les llama así puesto que se someten a un proceso de fermentación breve (horas) o prolongado (meses). En cuanto a su consistencia y contenido en humedad, se pueden clasificar en quesos blandos, medio duros y duros.

Los quesos difieren en sus características físicas y sensoriales 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%. En nuestro país se producen algunas variedades de quesos que no son comunes en los países industrializados, entre los que se pueden mencionar: panela, canasto, requesón, Oaxaca, cotija y Chihuahua. Únicamente estos dos últimos son madurados, pero a partir de su flora natural en la mayoría de los casos y con un pobre control del proceso (Fernández, 2000).

En la figura 2 se muestra el proceso general de elaboración de un queso que consta de las siguientes etapas:

1. La obtención de la leche es la etapa inicial en la fabricación de quesos. Su contenido microbiano influye marcadamente en la calidad del queso (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

2. Ajuste del contenido graso de la leche. Algunos quesos se elaboran con leche descremada y en ciertas variedades se incorpora grasa vegetal (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

3. Homogenización de la leche. La reducción del diámetro de los glóbulos de la grasa durante el proceso de homogenización (de aproximadamente 4 a 1 μm), se traduce en una cuajada más débil así como en una disminución de la sinéresis del suero, beneficio para quesos cremosos, y menos pérdida de grasa (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

4. Pasteurización de la leche. Es un procedimiento general para lograr la inactivación de microorganismos patógenos; una proporción considerable de la población general microbiana es eliminada, lo que facilita el progreso de la fermentación (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

5. Adición de cultivos iniciadores. En la elaboración de algunos quesos se utilizan cultivos microbianos que 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 mezclas de ellas (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

6. Coagulación. Uso de renina o cuajo (enzima obtenida de la mucosa del cuarto estómago de terneras), la coagulación es completada al cabo de 30 min (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

7. Separación de la cuajada y el suero. Esta separación se acelera por calentamiento, disminución del pH y manipulación del coágulo (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

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 (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

9. Desuerado. La cantidad de suero expulsado depende también de la forma de cortar la cuajada, de agitarla, y de la acidez y temperatura prevalentes (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

10. Moldeado. El moldeado tiene por finalidad dar al queso determinado formato y tamaño de acuerdo con sus características y de acuerdo con la tradición y exigencias del mercado. En general, al colocar la cuajada en los moldes se revisten éstos de tela o paño para facilitar la salida de algo 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. El formato y tamaño del queso tiene mucha influencia sobre la calidad del producto (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

11. Maduración. Es el proceso en el que evolucionan cambios físicos, químicos y sensoriales como consecuencia de la actividad de los cultivos microbianos agregados (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

12. Empacado. Una vez fabricado, el queso es empacado; se utiliza papel parafinado, envolturas plásticas, cajas de cartón, plástico o latas metálicas (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

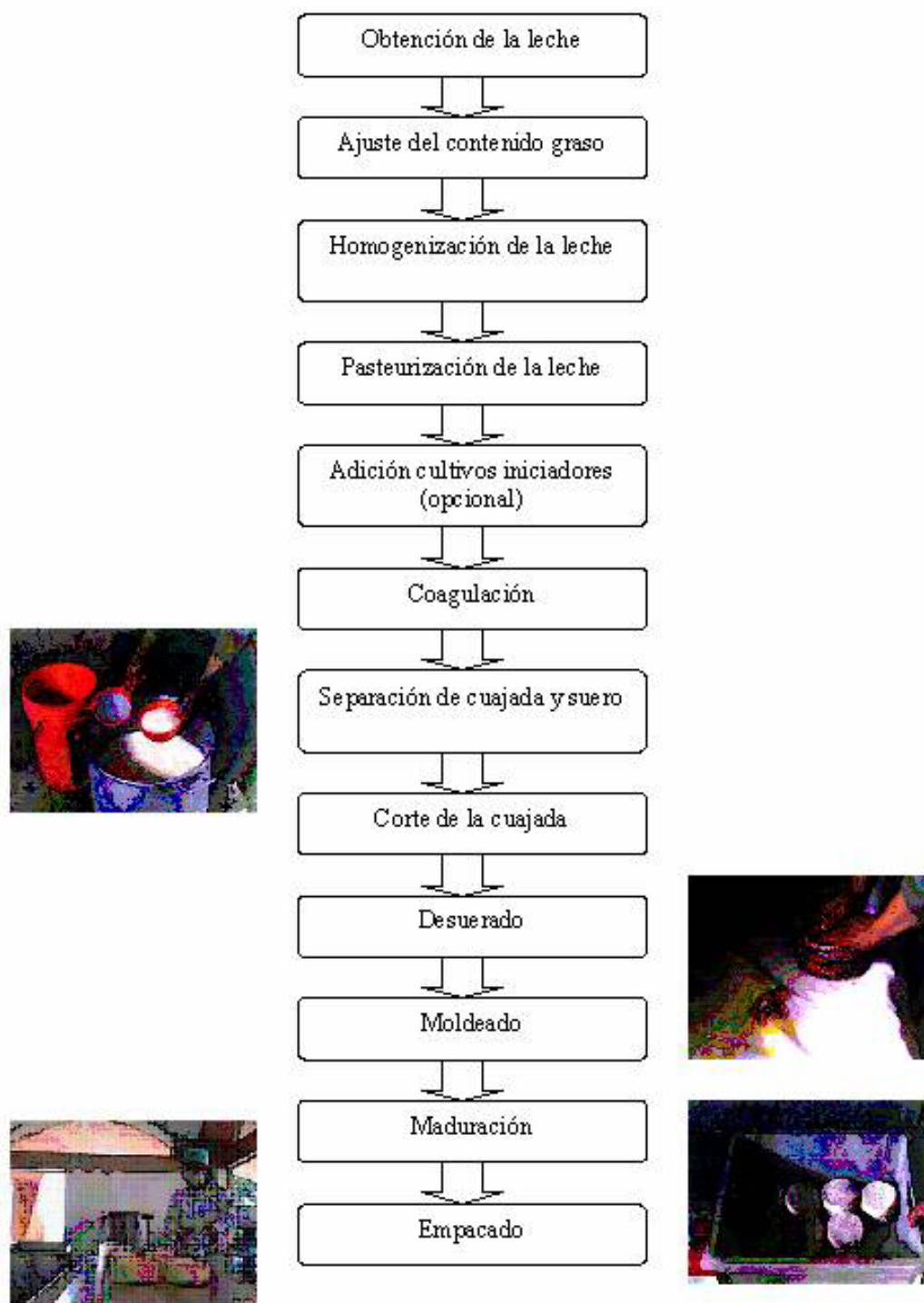


Figura 2. Proceso general de elaboración de un queso típico (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

1.2. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

1.2.1 MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE

La flora microbiana de la leche que no ha sido sometida a tratamiento alguno, suele estar constituida por algunas o todas las bacterias de los siguientes géneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, que es posible existan tanto en la ubre y en la piel de la vaca como en los utensilios o tuberías de ordeño; además de dichos géneros podemos encontrar coliformes y algunas bacterias patógenas como son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureoginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, *Salmonella* o *Campylobacter* que principalmente provienen de animales infectados (Nickerson, 1985; Fernández, 2000).

De igual manera la leche puede sufrir deterioros debido a la gran diversidad de componentes orgánicos, al pH cercano a la neutralidad, y al elevado contenido acuoso. Los principales tipos de deterioro que suelen observarse en la leche incluyen la fermentación (que progresa de una acidificación, coagulación hasta gasificación), proteólisis, mucosidad, diversas coloraciones y producción de aromas y sabores anormales, las cuales se describen a continuación.

Fermentación. A temperaturas entre 10 y 36°C, en condiciones normales, la fermentación ácida es la que tiene más posibilidades de producirse debida a la transformación de la lactosa en ácido láctico por la vía homofermentativa; sin embargo dicha fermentación puede impedirse refrigerando la leche a 4°C. Para la fabricación del queso, se favorece la acidificación por inoculación de un fermento láctico compuesto por diversas cepas de bacterias lácticas. Además de los fermentos lácticos, otros gérmenes que pueden producir la acidificación de la leche

son las bacterias coliformes, enterococos, estafilococos, micrococos, etc (Veisseyre, 1988; Amiot, 1991).

Gasificación. La producción de gas se acompaña generalmente de la formación de ácido. Excepto en algunos casos concretos, es indeseable en la leche y sus derivados. Los principales organismos productores de gas son los coliformes, *Clostridium* y algunas especies de *Bacillus*, que originan CO₂ y H₂ y *Propionibacterium*, BAL heterofermentativas y levaduras (Amiot, 1991).

Proteolisis. La hidrólisis de las proteínas de la leche por microorganismos suele ir acompañada de la producción de un sabor amargo originado por algunos de los péptidos liberados. La proteolisis es favorecida por el almacenamiento a temperaturas bajas, por la destrucción por el calor de las bacterias lácticas y de otras bacterias productoras de gas (Frazier y Westhoff, 2000).

Leche filante. Un hilamiento, espesamiento o mucosidad en la leche, resulta de la producción en exceso de gomas o mucinas secretados en forma de material capsular por diversas bacterias como son *Alcaligenes viscolactis*, coliformes y bacterias lácticas (Fernández, 2000).

Sabores y aromas anormales. El sabor y olor característico de la leche fresca, se daña fácilmente por la acumulación de los productos del metabolismo microbiano o por la incorporación de sustancias extrañas. El sabor ácido es el más frecuente; puede ser puro, como el producido por *Streptococcus lactis*, o acompañado de aromas, generalmente suaves, pero no agradables en la leche, debidos a otras bacterias lácticas. A veces es picante, debido a la producción de ácidos volátiles (fórmico, acético) generados por coliformes, ó butírico producido por *Clostridium* (Fernández, 2000).

Coloraciones. El aspecto característico de la leche fresca debe ser blanco y cremoso por lo que es fácilmente identificar la diversidad de defectos que pueden dañarla en términos de su color. El color de la leche está influido tanto por sus propiedades físicas como por su composición química, éste se afecta con el desarrollo de bacterias como por ejemplo: *Pseudomonas syncyanae* que le imparte el color gris azulada; *Pseudomonas synxantha*, *Flavobacterium* y algunos micrococos, amarillo; *S. marcescens*, *Brevibacterium erythrogenes*, rojo; *Pseudomonas fluorescens*, café; y *C. violaceum*, violeta. También pueden observarse manchas rojas debido a hemorragias en la ubre del animal (Frazier y Westhoff, 2000; Fernández, 2000).

Lipólisis. La lipólisis se debe fundamentalmente a la acción de la lipasa natural de la leche sobre los glóbulos grasos. Las bacterias psicrotrofas del género *Pseudomonas*, son microorganismos muy lipolíticos. Sin embargo, para causar serios problemas de lipólisis, se tienen que encontrar en la leche en número superior a 5×10^5 ufc/mL, aunque no siempre hay correlación entre el número de psicrotrofos y la cantidad de enzimas lipolíticas presentes (Amiot, 1991).

1.2.2. MICROBIOLOGÍA DE PRODUCTOS LÁCTEOS

Debido a la importancia en su producción y consumo especialmente de los quesos en nuestro país, resulta interesante el estudio de sus características microbiológicas.

Son de interés en la microbiología sanitaria aquellos microorganismos relacionados con el deterioro del producto, los patógenos y aquellos que tienen significado como indicadores de prácticas sanitarias de obtención y distribución. En los quesos frescos adquiere un significado importante la presencia de coliformes, así como la

presencia de materia extraña ya que es un indicador del ambiente sanitario en el cual se llevó a cabo la producción y maduración de dichos quesos (Hicks y col., 1982).

Aunque son mucho menos susceptibles al deterioro microbiano que la leche, los quesos soportan el desarrollo de diversos microorganismos que muestran un deterioro más o menos notable, esto se debe a su menor contenido acuoso (Hicks y col., 1982).

La descomposición del producto puede consistir en gasificación debido principalmente a la actividad de levaduras y coliformes; por ejemplo en el queso panela y Mozzarella lo cual se asocia al desarrollo de *K. pneumoniae* (Massa y col., 1992).

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

Finalmente al igual que en el caso de la leche, los quesos presentan malos olores, mucosidad, desarrollo de hongos y generación de sabores desagradables todos ellos debidos a los mismos microorganismos presentes en la alteración de la leche.

1.2.2.1. MICROORGANISMOS ALTERANTES DE LA LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

La conservación de la leche y de los productos lácteos depende de contar con medidas sanitarias eficaces, de la comercialización adecuada, así como de los tratamientos de pasteurización y refrigeración. Debido a los procesos antes mencionados que sufre la leche, ésta es muy susceptible al ataque por diversos microorganismos, entre los que sobresalen, las bacterias psicrotrofas las cuales provocan defectos del sabor que los consumidores detectan en la leche, todo ello se debe a la actividad residual de enzimas degradativas, en los productos que se elaboran con ella. De igual manera se pueden mencionar la alteración por bacterias fermentadoras no esporuladas, que tiene lugar cuando la temperatura de almacenamiento es suficientemente alta para que su crecimiento sobrepase al de las bacterias psicrotrofas, o cuando la composición del producto inhibe a los organismos aerobios Gram-negativos; también la presencia de bacterias esporuladas genera una alteración de la leche y productos lácteos debido a que dichas bacterias pueden encontrarse en productos lácteos líquidos de baja acidez que se conservan por el calor; por último puede encontrarse la alteración por levaduras y mohos cuyo crecimiento es una causa de alteración de los productos lácteos fermentados ya que estos microorganismos crecen bien a un pH bajo (Frank, 1997).

BACTERIAS PSICROTROFAS. Las bacterias psicrotrofas que alteran la leche cruda y la pasteurizada son principalmente bacilos aerobios Gram-negativos de la familia *Pseudomonadaceae*. Generalmente el 65-70% de los aislamientos psicrótrofos de la leche cruda pertenecen al género *Pseudomonas* (García y col., 1989).

La bacteria que más frecuentemente origina defectos de sabor en la leche refrigerada es *Pseudomonas fluorescens*, aunque también se puede encontrar *P. fragi* y *P. putida* (Ewings y col., 1984).

Aunque en la leche cruda puede haber representantes de otros géneros, como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Aerococcus* y *Staphylococcus* y de la familia *Enterobacteriaceae* de los que algunos son psicrótrofos, cuando la leche se conserva entre 3 y 7°C.

Estas bacterias tienen procedencia en el suelo, el agua, los animales y la materia vegetal como la hierba; aunque el agua de las granjas lecheras contiene un recuento de microorganismos psicrotrofos bajo, su empleo para limpiar y enjuagar el equipo de ordeño constituye una vía directa de entrada en la leche. Estas bacterias psicrotrofas aisladas del agua son productoras activas de enzimas extracelulares, que pueden tener implicaciones en la calidad de los productos elaborados con la leche. Esto ocurre cuando la población de bacterias psicrotrofas alcanza de 10^6 - 10^7 ufc/mL (Cousin, 1989).

BACTERIAS FERMENTADORAS NO ESPORULADAS. La leche líquida, el queso y las leches fermentadas son los principales productos lácteos sensibles a la alteración por bacterias fermentadoras no esporuladas. Dichas bacterias pertenecen en su mayoría al grupo productor de ácido láctico o al grupo de coliformes. Respecto al primer grupo se incluyen *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Para el segundo grupo de los coliformes, este altera frecuentemente más a los productos lácteos fermentados que a la leche. En este grupo se encuentran los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* mientras que *E. coli* sólo en ocasiones crece lo suficiente para provocar defectos (Chapman y Sharpe, 1990).

BACTERIAS ESPORULADAS. Los productos que frecuentemente se ven afectados por las bacterias esporuladas son la leche y la crema así como quesos duros, especialmente aquellos cuyas concentraciones internas de sal son bajas (Muir, 1989).

Las bacterias esporuladas que alteran los productos lácteos pertenecen principalmente a géneros como *Bacillus* generalmente *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*; y especies de *Clostridium* (Bramley y McKinnon, 1990).

Uno de los defectos mas notables que presentan los géneros de *Bacillus* es el que se conoce como coagulación dulce, pues surge al principio de la coagulación de la leche sin que al mismo tiempo se formen cantidades significativas de ácido ni de olor; el crecimiento de *Bacillus cereus* puede observarse en forma de botones en el fondo del recipiente que contiene la leche (Frank, 1997).

LEVADURAS Y MOHOS. La alteración por levaduras se manifiesta con un olor afrutado o a levadura y/o con la producción de gas. Los quesos duros contienen pequeñas cantidades de lactosa lo que limita el crecimiento potencial de las levaduras; mientras que el yogur y quesos frescos como el Cottage contienen concentraciones elevadas de lactosa y por lo tanto son muy sensibles a la alteración por este tipo de microorganismos (Fleet, 1990).

Así mismo las levaduras pueden alterar a aquellos productos lácteos con una a_w baja como es el caso de la leche condensada azucarada y la mantequilla; entre las levaduras alterantes que mas frecuentemente se encuentran están, *Kluyveromyces marxianus* y *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata* y *Candida kefyr* (Fleet, 1990).

Los mohos frecuentemente presentes en los quesos suelen ser especies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Geotrichum*, y a veces se han encontrado especies de *Hormodendrum*. Las especies más frecuentemente aisladas de los quesos fundidos son *Penicillium roqueforti*, *P. cyclopium*, *P. veridicatum* (Frank, 1997).

1.2.3. NORMAS MICROBIOLÓGICAS PARA LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

La norma oficial mexicana NOM-091-SSA-1994 “Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias”, establece en el apartado para las especificaciones microbiológicas los límites máximos permitidos de microorganismos en leche pasteurizada de vaca, refiriéndose principalmente a mesofílicos aerobios, dichos microorganismos están permitidos por esta norma con un límite máximo de 30 000 ufc/mL, mientras que establece la ausencia tanto de *Salmonella* como de *Staphylococcus aureus* y establece como negativa la presencia de *Listeria monocytogenes*; de la misma manera la norma oficial mexicana establece como especificaciones sanitarias que la leche debe estar libre de materia extraña, tener olor, sabor y color característico, así como dar reacción negativa a la prueba de fosfatasa y a la de inhibidores; tener una acidez mínima de 1.3 o máxima de 1.7g/L expresada como ácido láctico (Tabla 4).

Así mismo, la norma oficial mexicana NOM-121-SSA1-1994 “Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias”; establece los siguientes límites para la presencia de microorganismos para quesos frescos, con o sin maduración y procesados, para el caso de los quesos frescos, madurados y procesados deben estar ausentes de *Salmonella*, y negativa la presencia de *Listeria monocytogenes*; en el caso de coliformes fecales presenta para los quesos frescos un límite máximo de 100 NMP/g, mientras que para el caso de quesos madurados el límite máximo que establece la norma oficial mexicana es de 50

NMP/g. Además de establecer que los quesos frescos o frescales deben tener consistencia desde untable hasta rebanable, de aroma y sabor característico sin olores y sabores ajenos; los quesos madurados deber tener consistencia desde blanda hasta extradura sin aromas y sabores ajenos, pueden presentar o no ojos típicos de fermentación o vetas coloreadas de los mohos empleados para su maduración (Tabla 5).

Finalmente la norma para quesos de suero, se trata de la norma oficial mexicana NOM-035-SSA1-1993 “Bienes y servicios. Quesos de suero. Especificaciones sanitarias”; la cual establece también los límites máximos permitidos para quesos de suero, en este caso la presencia de coliformes totales establece un límite máximo de 100 ufc/g así como la ausencia de *Salmonella*, *Vibrio cholerae* y *Listeria monocytogenes* (Tabla 6).

Tabla 4. Límite máximo para la presencia de microorganismos en Leche pasteurizada.

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
Mesofílicos aerobios ufc/mL	30 000
Organismos Coliformes totales ufc/mL en planta	10
Organismos Coliformes totales ufc/mL en punto de venta	20
<i>Salmonella spp</i> en 25 mL	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> en 25 mL	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 mL	Negativo

Tabla 5. Especificaciones sanitarias para los quesos frescos, madurados y procesados.

MICROORGANISMOS	FRESCOS	MADURADOS	PROCESADOS
	LÍMITE		MÁXIMO
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

Tabla 6. Especificaciones sanitarias para los quesos de suero.

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO	
Organismos Coliformes totales	(ufc/g)	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ufc/g)	1000
Hongos y levaduras	(ufc/g)	500
<i>Salmonella</i>	en 25 g	Ausente
<i>Vibrio cholerae</i>	en 50 g	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i>	en 25 g	Ausente

1.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

El término de bacteria ácido láctica (BAL) fue usado similarmente en otros tiempos como “milk-souring organisms” es decir organismos acidificantes de la leche. El primer cultivo puro de una bacteria láctica fue *Bacterium lactis*, obtenida por J. Lister en 1873 (Axelsson, 1998).

Las bacterias ácido lácticas tienen gran importancia como microorganismos responsables de características sensoriales de productos lácteos y de hecho es común la utilización como cultivos iniciadores o "starters" que son mezclas de bacterias lácticas cuidadosamente seleccionadas que se añaden a la leche para llevar a cabo la fermentación deseada. Por ello se han utilizado durante muchos años en todos los países del mundo, en fermentaciones. Generalmente forman parte de cultivos mixtos naturales junto con otras bacterias, levaduras y mohos para la producción de diversos alimentos humanos o animales tales como productos lácteos (quesos, mantequilla, yogurt, leches ácidas, etc.), vegetales fermentados (encurtidos, aceitunas, etc.), embutidos, panes ácidos y encurtidos (Beech y Davenport, 1971).

En la tabla 7 se muestran algunos de los microorganismos que en la actualidad están siendo utilizados como cultivos iniciadores.

Tabla 7. Algunos microorganismos utilizados como cultivos iniciadores (Jay, 1994).

Grupo de microorganismos	Especies
Bacterias ácido lácticas	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus sake</i>
	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

1.3.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES

El grupo de las bacterias lácticas es bastante heterogéneo por lo que las principales características que las definen son las siguientes: se trata de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, catalasa-negativas, oxidasa-negativas, sin citocromos, no aerobias pero aerotolerantes, acidúricas y estrictamente fermentativas con el ácido

láctico como principal producto final durante la fermentación de azúcares (Axelsson, 1998).

La mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 5°C y otras a temperaturas tan altas como 45°C. Con respecto al pH de crecimiento, algunas crecen a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crecen a un pH entre 4 y 4.5 (Jay, 1994).

1.3.2. EXIGENCIAS NUTRICIONALES

Las BAL se asocian a hábitats ricos en nutrientes como son distintos productos alimenticios como son leche, carne y bebidas aunque también en granos, vegetales y la superficie de las mucosas de animales (Barakat y col., 2000).

Las bacterias lácticas son muy exigentes en cuanto a la nutrición se refiere. Todas fermentan glucosa aunque hay algunas que pueden multiplicarse en ausencia de azúcares como es el caso de *Leuconostoc citrovorum* el cual puede desarrollarse en presencia de citrato como única fuente de carbono y existen algunas que no fermentan la sacarosa, otras no atacan la lactosa, las pentosas o las dextrinas; además de que las bacterias lácticas requieren aminoácidos como fuente de nitrógeno siendo las sales amoniacales lo que estimulan su desarrollo y una diversidad de factores de crecimiento. La demanda de determinados nutrientes permite diferenciar algunas especies (Stamer, 1979; Leveau y Bouix, 2000).

Todas las bacterias lácticas necesitan vitaminas, por ejemplo B6, B12, B2. Las cantidades de vitaminas necesarias para cada especie varían con las condiciones de cultivo. Así, si una cierta vitamina es necesaria para determinada síntesis celular, el agregado al medio del producto en cuestión permite el desarrollo en ausencia de la vitamina o con cantidades menores de ésta, por ejemplo el *Lb. plantarum* necesita

biotina, pero el agregado de ácido aspártico al medio permite el desarrollo con una cantidad 10 veces menor de biotina. A su vez, la cantidad y calidad de aminoácidos necesarios dependen en parte de las vitaminas presentes. El *Streptococcus faecalis* requiere serina en medios carentes de ácido fólico, pero el aminoácido no es necesario si la vitamina está presente (Leveau y Bouix, 2000).

Algunas bacterias lácticas además necesitan bases purínicas y pirimidínicas, utilizadas en la síntesis de los ácidos nucleicos. La exigencia en estos compuestos está a menudo relacionada con la carencia de vitamina H (ácido p-aminobenzoico). O sea que son necesarias las bases citadas o bien la vitamina.

El ácido acético estimula el desarrollo de la mayoría de las bacterias lácticas. Algunas necesitan ácidos grasos de cadena larga (Leveau y Bouix, 2000).

1.3.3. METABOLISMO DE BACTERIAS LÁCTICAS

En base a los productos finales del metabolismo de la glucosa, las BAL se dividen en tres grupos; homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas (Jay, 1994).

Las bacterias homofermentativas son aquellas que producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa, dentro de dicha clasificación se encuentran los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*, junto con algunos lactobacilos. Dichas bacterias poseen las enzimas aldolasa y hexosaisomerasa, pero carecen de fosfoetolasa. Utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para producir dos moléculas de lactato por molécula de glucosa como se indica en la figura 3 (Jay, 1994).

Las bacterias heterofermentativas son aquellas que producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y etanol a partir de las hexosas; en este grupo se clasifican todas las especies de *Leuconostoc* y *Carnobacterium* así como algunos lactobacilos (Jay, 1994).

Este tipo de bacterias tienen la enzima fosfoacetolasa pero no poseen ni aldosa ni hexosaisomerasa y en lugar de degradar la glucosa por la vía de EMP utilizan la vía de la hexosa monofosfato o de las pentosas (figura 4) (Jay, 1994).

Las bacterias homofermentativas extraen de una determinada cantidad de glucosa el doble de energía con respecto a las bacterias heterofermentativas, aunque las bacterias heterofermentativas son más importantes que las homofermentativas, desde el punto de vista de la producción de componentes de aroma y sabor tales como el acetaldehído y diacetilo (Jay, 1994).

Las bacterias heterofermentativas facultativas utilizan la vía EMP o la vía de las pentosas para dar como productos en su mayoría ácido láctico, ácido acético y etanol (Sneath y col., 1986).

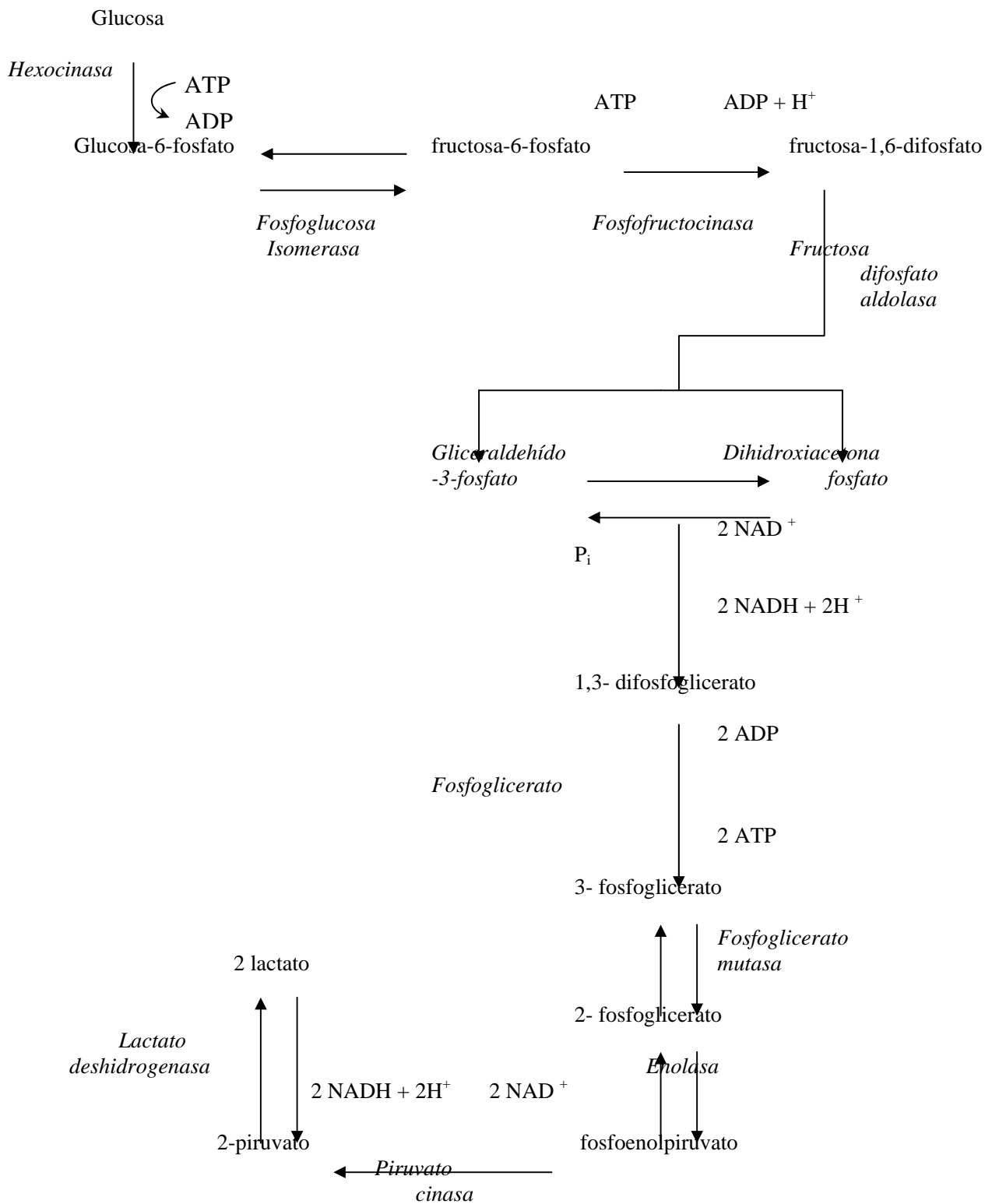


Figura 3. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Jay, 1994; Madigan y col., 1998).

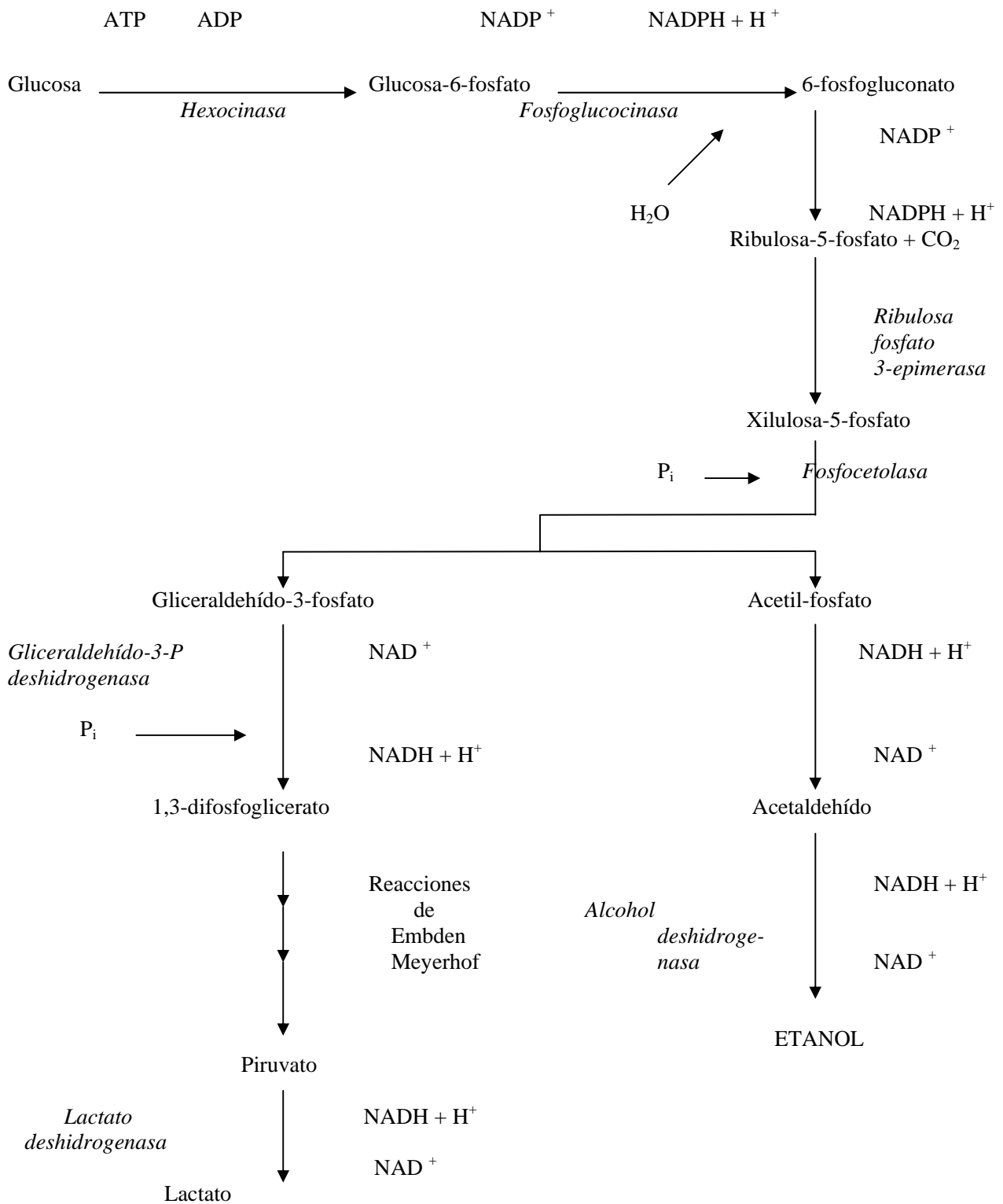


Figura 4. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Jay, 1994; Madigan y col., 1998).

1.3.4. CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS

Al tratarse de un grupo heterogéneo, las bacterias lácticas están representadas por varios géneros de importancia. En la actualidad este grupo de bacterias lácticas está conformado por los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Lactococcus* y actualmente se incluyen a los géneros *Enterococcus*, *Tetragenococcus* y *Weisella*. 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 (Axelsson, 1998).

1.- **STREPTOCOCCUS**

Fue justamente la primera bacteria reconocida por los microbiólogos, por lo que Rosenbach en 1884 utilizó el nombre genérico de *Streptococcus* y fue asociado a infecciones en el organismo. El género *Streptococcus* originalmente fue descrito basándose en la morfología y características fisiológicas y bioquímicas, dicho género 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).

Otra revisión que se realizó sobre la composición y diferenciación del género *Streptococcus* la hizo Jones en 1978 además de proponer 7 grupos incluyendo bacterias anaerobias estrictas y pneumococos. *S. thermophilus* es la especie de éste género más importante ya que es utilizado como cultivo iniciador para la producción de yogur y quesos; crece a 45 y 50°C pero no a 15°C (Jones, 1978).

2.- **PEDIOCOCCUS**

Pediococcus fue la primera bacteria estudiada por Louis Pasteur, *Pediococcus* son bacterias homofermentativas y con la excepción de *P. dextranicum* el cuál produce

L(+)-ácido láctico, todas las especies de éste género producen DL-lactato a partir de glucosa.

Los *Pediococcus* de cerveza y los originados en planta fueron incluidos en una sola especie como *P. cerevisiae*, pero estudios sobre el aislamiento de los dos microorganismos mostró que son diferentes por lo que fueron designados como *P. damnosus* y *P. pentosaceus* respectivamente (Raccach, 1987).

Actualmente existen 8 especies reconocidas del género *Pediococcus* que son: *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. dextranicum*, *P. inopinatus*, *P. urinae-equi* que fue reclasificado y ahora es *Aerococcus* y *P. halophilus* que también fue reclasificado como *Tetragenococcus* (Collins y col., 1990).

3.- LEUCONOSTOC

La clasificación original de la bacteria estuvo basada en su morfología, lo que colocó al género *Leuconostoc* junto con los *Streptococcus* ya que sus células son cocos en pares o en cadenas pero esta bacteria es heterofermentativa y produce ácido D (-) láctico, etanol y CO₂. Estas especies son mesófilas, cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre 20 y 30°C y se caracterizan por la producción (a partir del citrato de la leche), de diacetilo y a veces de acetato (Stiles y Holzapfel, 1997).

4.- LACTOBACILLUS

La división clásica del género *Lactobacillus* estuvo basada principalmente en sus características fermentativas, de tal modo que se establecieron 3 grupos: (1) el grupo de los homofermentativos obligados; (2) heterofermentativos facultativos y (3) heterofermentativos obligados (Stiles y Holzapfel, 1997).

Diversos lactobacilos del grupo 1 y 2 y algunos del grupo heterofermentativo 3; son usados en alimentos fermentados, pero el grupo 3 también son asociados comúnmente con el deterioro de alimentos (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las especies del género *Lactobacillus* son estrictamente fermentativas y sus requerimientos nutricionales son muy complejos; generalmente son acidúricos o acidófilos, y se encuentran principalmente en alimentos con un pH de 4.0; también son usados como cultivos iniciadores en diversas variedades de quesos (Stiles y Holzapfel, 1997).

Como ya se mencionó anteriormente la taxonomía de este género esta basada en sus características fenotípicas por lo que se han clasificado en 3 grupos que a continuación se detallan más a fondo.

Grupo 1. Incluye lactobacilos homofermentativos obligados, éstos fermentan exclusivamente glucosa generando ácido láctico, y no fermentan pentosas. Este grupo esta representado principalmente por las especies: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. helveticus* (Stiles y Holzapfel, 1997).

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* y *Lb. plantarum* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Lb. casei es asociado a muchos habitats pero principalmente con productos lácteos, de tal forma que participa en la fermentación de algunos quesos y en

algunos puede causar su deterioro por fermentación de citrato (Hammes y col., 1991).

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 (Stiles y Holzapfel, 1997).

5.- CARNOBACTERIUM

Este género de bacilos Gram-positivos se creó para encuadrar algunos microorganismos anteriormente clasificados como lactobacilos. Las especies más importantes de este género son: *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*. Generalmente son microorganismos heterofermentativos, creciendo la mayoría a un pH de 9 y 9,5. Algunas especies producen gas a partir de la glucosa, se diferencian de los lactobacilos por ser incapaces de crecer en un medio con acetato y porque sintetizan ácido oleico. Se encuentran en carnes envasadas al vacío y en alimentos afines, así como también en el pescado y en las carnes de ave (Stiles y Holzapfel, 1997; Axelsson, 1998).

6.- VAGOCOCCUS

Vagococcus está más relacionado con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* además de *Listeria*, que con *Streptococcus* y *Lactococcus*. Los *Streptococcus* aislados del pollo y agua fueron ahora designados como *Vagococcus fluviales* (Collins y col., 1989, 1993; Devriese y col., 1993).

Una nueva especie integrada al género con el nombre de *V. salmoninarum* fue aislada de peces enfermos de *Salmonella* (Wallbanks y col., 1990).

7.- LACTOCOCCUS

El género *Lactococcus* incluye diversas especies como: *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* y, *Lc. raffinolactis* (Schleifer y col., 1985; Williams y col., 1990).

Las subespecies de *Lc. lactis* son de gran importancia debido a que fue el primer cultivo puro bacteriano obtenido y descrito científicamente y se puede reconocer como la bacteria láctica por excelencia de la leche y la más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, por ello son estudiadas sus características bioquímicas y fisiológicas además de los efectos que producen en los alimentos (Teuber y col., 1991).

El género *Lactococcus* comprende bacterias homofermentativas, agrupados en cocos, crecen a 10°C pero no a 45°C y producen ácido láctico a partir de glucosa (Stiles y Holzapfel, 1997).

8.- ENTEROCOCCUS

Las bacterias del género *Enterococcus* han sido reconocidas por Thiercelin en 1899; Andrewes y Horder en 1906 usaron el término *S. faecalis* para los organismos del tipo *Enterococcus* pues fueron aislados de un paciente con endocarditis (Stiles y Holzapfel, 1997).

Los enterococos fueron descritos por Sherman en 1937 como aquellos organismos que crecen a 10 y 45°C con una concentración de 6.5% de NaCl y a un pH de 9.6 (Devriese y col., 1993).

Entre las especies que han sido incluidas en el género *Enterococcus* se encuentran: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. raffinosus*, *E. durans*, *E. hirae* y *E. flavescens* (Stiles y Holzapfel, 1997).

9.- TETRAGENOCOCCUS

La especie incluida en este género anteriormente estaba clasificada como *P. halophilus*. Para su crecimiento requiere NaCl a una concentración de 18%. Está más relacionado con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* que con *Lactobacillus* (Stiles y Holzapfel, 1997).

10.- WEISELLA

Este es un nuevo género que ha sido creado para incluir a un miembro del género *Leuconostoc* el cuál es *Leuc. paramesenteroides*. De igual manera se incluye dentro de éste género miembros heterofermentativos del género *Lactobacillus* como *Lb. viridescens* y que ahora fue renombrado como *Weisella viridescens* (Stiles y Holzapfel, 1997).

1.4. BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS INHIBITORIAS

Desde hace más de 60 años se ha observado el fenómeno consistente en que una bacteria láctica, cuando se encuentra en cultivo mixto inhibe o destruye a microorganismos estrechamente emparentados y a microorganismos que producen toxinas en los alimentos o que los alteran. Las bacterias lácticas que se relacionan con dicho antagonismo de los cultivos incluyen los lactococos, los enterococos, los lactobacilos, las carnobacterias y los pediococos (Jay, 1994).

Las bacterias lácticas son responsables de muchas fermentaciones en productos alimentarios de consumo humano, crecen en ambientes no aptos para la mayoría de los microorganismos. Pueden competir, dominar y controlar fermentaciones mixtas a consecuencia de la producción de sustancias inhibitorias como ácido láctico, ácido acético, acetaldehído, diacetilo, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Axelsson, 1998).

1.4.1. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS

1.4.1.1 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es el principal producto del metabolismo de los carbohidratos por las bacterias lácticas, Puede producirse en los dos tipos de fermentación: homofermentativo y heterofermentativo. En el metabolismo homofermentativo se fermentan azúcares por la vía glucolítica o de EMP como se ha mencionado anteriormente (Axelsson, 1998).

Durante el crecimiento bacteriano en medios de cultivos complejos, muchos otros compuestos presentes como aminoácidos y ácidos orgánicos darán lugar a reacciones metabólicas similares a la de los azúcares. Por ello se producen otros productos finales, tal es el caso del ácido acético. Así mismo la presencia de O₂ tiene efectos en el metabolismo, en este caso produciendo H₂O₂ (Axelsson, 1998).

El ácido láctico tiene un pKa 3.1, muestra acción bacteriostática cerca del pH de 4.5. El ácido láctico alarga el tiempo de generación de *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus spp.*, *Saccharomyces spp.* y *L. monocytogenes*.

1.4.1.2. ÁCIDO ACÉTICO

La fermentación de las pentosas produce un patrón diferente de compuestos finales con respecto a la fermentación de las hexosas. Las pentosas son metabolizadas por la vía 6-fosfogluconato y se incorporan a nivel de la ribulosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato.

En ésta fermentación no se produce CO₂ ya que no es necesario el paso de deshidrogenación. Por otra parte el acetil-fosfato es empleado por la acetatocinasa para la fosforilación a nivel substrato, rindiendo ATP y ácido acético en vez de etanol (Axelsson, 1998).

El pKa del ácido acético es 4.8, tiene efecto antimicrobiano principalmente contra bacterias, aunque también puede actuar contra levaduras y hongos. Se ha comprobado su efectividad contra *Bacillus spp.*, *St. aureus*, *Salmonella spp.*, *Pseudomona aureoginosa*, *Clostridium spp.*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces*, *Aspergillius*, *Penicillium* (Ray y Daeschel, 1992; Cabo y col., 2002).

1.4.1.3. ACETALDEHÍDO

Se ha reportado que cepas de *Lactobacillus delbrueckii* producen acetaldehído por acción de la treina aldosa, el cuál se encuentra en concentraciones promedio de 25 pm. El ácido pirúvico será transformado a ácido láctico durante la fermentación. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas como la aerobiosis, pueden formarse cantidades variables de acetaldehído, en cuyo caso se producirá una gran variedad de productos secundarios. Entre los productos secundarios de la fermentación ácido láctica se encuentran el ácido acético (0.3-0.4%), ácido fórmico, succínico, propiónico, valérico y caproico, además de CO₂ (Kyzlink, 1990).

1.4.1.4. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El H₂O₂ es producido por numerosas bacterias incluyendo las BAL como mecanismo para eliminar el oxígeno. El H₂O₂ es generado por reacciones tales como la reducción del ión superóxido y las reacciones mediadas por NADH oxidasas y por deshidrogenasas (Daeschel y Penner, 1992; Salminen y Von Wright, 1998).

El espectro de actividad del H₂O₂ es muy amplio e incluye a bacterias Gram positivas y negativas. El efecto antimicrobiano del H₂O₂ resulta de la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas, originando desnaturalización de enzimas esenciales y además oxidación de los lípidos de la membrana celular. Su actividad ocurre a concentraciones menores de 0.5%. Adicionalmente en leche cruda el H₂O₂ activa al sistema lactoperoxidasa que tiene efecto inhibitorio sobre microorganismos contaminantes (Daeschel y Penner, 1992).

1.4.1.5. DIACETILO

Es el compuesto 2,3 butanodiona, compuesto volátil, soluble en aceite y agua. Imparte aroma característico deseado a los productos lácteos fermentados. Es producido por algunas especies y cepas de *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* y muchas otras bacterias diferentes a las BAL (William-Campbell y Jay, 2002).

El diacetilo es producido por cepas de BAL que fermentan el citrato ocurriendo la mayor producción, alrededor de 4 mg/mL. Posee propiedades antimicrobianas solo a concentraciones elevadas (500-2500 µg/mL), a concentraciones mas bajas (150 µg/mL) se observa efecto bacteriostático. Se ha reportado efecto contra *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Pseudomas spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* entre otros (Yang, 2000; Ray y Daeschel, 1992).

La actividad antimicrobiana del diacetilo es máxima a un pH menor de 5.0. Por otra parte el pH del medio de crecimiento determina en gran medida la producción de diacetilo (Ray y Daeschel, 1992).

El diacetilo ha mostrado actividad antimicrobiana, aunque una de sus limitaciones como antimicrobiano es su baja producción por parte de los microorganismos fermentadores, sin embargo puede actuar sinérgicamente con otros factores, como se ha comprobado con tratamientos por calentamiento (Yang, 2000).

1.4.1.6. ÁCIDOS GRASOS

Los lactobacilos y lactococos que muestran actividad lipolítica pueden, bajo ciertas condiciones, producir cantidades significativas de ácidos grasos, mismos que muestran actividad antimicrobiana y que juegan un papel importante como componentes estructurales de las membranas celulares y como acarreadores de energía (Dykes y col., 1995).

Adicionalmente ciertas mezclas de ácidos grasos también contribuyen a mejorar las cualidades sensoriales de los alimentos fermentados (O' Leary, 1982).

Su actividad antifúngica depende de la longitud de la cadena alifática, de la concentración y del pH del medio. El efecto antimicrobiano de los ácidos grasos ha sido atribuido a la forma no disociada y no al anión, ya que el pH tiene efectos sobre su actividad, con efectos bactericidas más rápidos a bajos pH (Yang, 2000; Kyzlink, 1990).

1.4.1.7. BACTERIOCINAS

Entre las bacterias antagónicas producidas por las bacterias lácticas se encuentran: las bacteriocinas, son termorresistentes, y no afectan a las cepas que las producen, además se caracterizan por tener una actividad típicamente bactericida (Jay, 1994).

Se denominan como un grupo heterogéneo de naturaleza proteica, con actividad antibacteriana que son producidos por grupos amplios y diversos de especies bacterianas que varían en su modo de acción, espectro de actividad, peso molecular y propiedades bioquímicas (Klaenhammer, 1993).

Las bacteriocinas pueden utilizarse como conservadores naturales en algunos alimentos, o bien, las cepas de BAL bacteriocinogénicas pueden emplearse como cultivos iniciadores. El empleo de las bacteriocinas producidas por las BAL como conservadores en alimentos es cada vez mayor. Esto se debe a que son compuestos de origen biológico que prolongan la vida de anaquel de los alimentos y que carecen de los efectos colaterales producidos por los aditivos químicos que cumplen una función similar (Nettles y Barefoot, 1993).

Entre las cualidades de las bacteriocinas que las hacen interesantes prospectos para emplearse en los alimentos destacan su termorresistencia, sin sensibilidad a la congelación, solubilidad en agua, inocuidad, nulo efecto en el sabor del alimento, y sobre todo su efecto bactericida (Bunic y col., 1997).

Se tienen experiencia de su utilidad en carnes, pescados, cereales, frutas, verduras, bebidas y sobre todo en lácteos, con resultados favorables y algunas ventajas como son: el que no afecta sensorialmente a los alimentos y que es posible recurrir a coadyuvantes (otros conservadores) de la inhibición contra el patógeno (Eckner, 1992).

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas son péptidos altamente catiónicos a pH 7.0, presentan altos puntos isoeléctricos (8.6-11.3) y cuentan con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. Además de mostrar en su estructura mayor carga positiva a pH menor de 5.0 que a pH 6, por tal motivo la actividad antibacteriana es mejor a pH inferior a 5 que a pH fisiológico (Cintas y col., 2001; Jack y col., 1995).

1.4.2. CEPAS DE PROBIÓTICOS

La importancia del estudio de las BAL radica en que son indispensables en la elaboración de alimentos fermentados y contribuyen al desarrollo de la textura y el sabor de dichos alimentos debido a la producción de ácido láctico y otros compuestos. Recientemente han sido utilizados también como probióticos, los cuales se definen como cultivos simples o mixtos de microorganismos vivos que cuando se aplican al hombre o a los animales, lo afectan benéficamente mejorando las propiedades de la flora nativa (Havennar y J.H.J., 1992).

Las bacterias lácticas mas frecuentemente empleadas como cepas de probióticos son lactobacilos: *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii subesp. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis*, *Lb. salivarius*, *Lb. plantarum*. Estas bacterias, intestinales o no, deben ser resistentes a las enzimas digestivas de las cavidades bucal y gástrica, al pH ácido del estómago, a las sales biliares y tener eventualmente la capacidad de adherirse a las células intestinales para colonizar el tracto intestinal sin perturbar a la flora intestinal normal. En general, los probióticos deben ingerirse con leche. Diferentes preparaciones contienen cepas de *Lb. acidophilus* de origen humano asociados a la flora del yogur o incluso de cepas de *Lb. lactis* y que tienen efectos nutricionales en el organismo (Leveau y Bouix, 2000).

1.5. CONSERVACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos es de utilización general (Lapage y col., 1970).

Dentro de los métodos más comúnmente utilizados para la conservación de cepas se encuentran la congelación y la liofilización.

1.5.1. CONGELACIÓN

Este procedimiento consiste en colocar las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y guardar a temperaturas inferiores a 0°C, con lo que el agua se congela. De ésta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan incrementando la temperatura. Este es un buen método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de que algún fallo del sistema produzca una elevación no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el manejo o transporte de las cepas (Lapage y col., 1970).

Los factores más importantes que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

1. Edad de las células: En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado.
2. Velocidad en la congelación y descongelación: Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C.
3. Temperatura de almacenamiento: Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C , o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C .
4. Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar (Lapage y col., 1970).

Para la conservación en congeladores, las células se almacenan en tubos Eppendorf, preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, como por ejemplo el género *Clostridium*, ya que al estar las células en una superficie hay un mayor contacto con el oxígeno y puede afectarse la viabilidad.

1.5.2. LIOFILIZACIÓN

Llamada anteriormente criodeshidratación, la liofilización es un método de conservación desarrollado para superar las pérdidas de los compuestos responsables de los aromas en alimentos, los cuales se perdían en las operaciones convencionales de secado. El proceso de liofilización consiste esencialmente en dos etapas:

- 1) Congelación. La congelación del producto debe ser muy rápida para conseguir la formación de cristales de hielo pequeños y la temperatura sea inferior a 0°C.

- 2) Secado. El producto es secado por sublimación directa del hielo bajo una presión reducida y se realiza en dos fases: Fase de sublimación propiamente dicha, llamada a veces “deshidratación primaria” que elimina alrededor del 90% del agua de modo que el producto queda con una humedad del 15%; la otra fase es la de desecación o de “desección secundaria” que elimina el 10% del agua ligada restante y que permite conseguir un producto con una humedad de alrededor del 2%, esta fase es una evaporación a vacío a temperatura de 20 a 60°C (Mafart, 1994).

Durante este proceso de conservación no se da crecimiento en las células conservadas por este método, puesto que se les ha eliminado por completo el agua. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo. Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la congelación, pues la liofilización se hace en dos etapas y se añade la sublimación del agua a la congelación previa. Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez liofilizadas pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-20°C), con lo cual su manejo es muy cómodo (Beech y Davenport, 1971).

Los factores que hay que tener en cuenta para hacer una buena liofilización son lógicamente los mismos que influyen en la congelación, a los que habrá que añadir otros que surgen como consecuencia de la deshidratación. Sin embargo, antes de pasar a explicar éstos, hay que hacer unas breves consideraciones sobre los que antes hemos mencionado para el caso de la congelación. La congelación puede hacerse rápida o lentamente, la primera sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido. Respecto a los crioprotectores, se pueden utilizar varios dependiendo del tipo de microorganismo, pero para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que las cepas ya liofilizadas queden muy viscosas. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos, pero para algunos microorganismos pueden ser

más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el ácido glutámico 0.067 M para las bacterias lácticas (Beech y Davenport, 1971).

Los factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

1. Tipo de microorganismo. Hay algunos microbios que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos.
2. Concentración celular. Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 - 10^9 células/mL en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.
3. Temperatura durante la sublimación. Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .
4. Grado de deshidratación alcanzado. Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.
5. Atmósfera de oxígeno en el tubo. Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.

6. Condiciones de almacenamiento. La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C. Las cepas liofilizadas se deben guardar en la oscuridad.

En la industria de alimentos es donde tiene mayor aplicación, pues ofrece ventajas tan importantes como la conservación y transporte fácil de los productos, la ausencia de temperaturas altas, la inhibición del crecimiento de microorganismos, ó la recuperación de las propiedades del alimento al añadirle el volumen de agua que en un principio tenía. (Beech y Davenport, 1971).

Al igual que en la congelación el proceso de liofilización tiene varias ventajas lo que permite ser un buen método para la conservación de las cepas; algunas de estas ventajas son las siguientes:

- La temperatura de trabajo es muy baja y por lo tanto los productos termolábiles no se alteran
- No hay agua libre, por lo tanto no hay peligro de hidrólisis ni de crecimiento microbiano
- Al evaporarse el hielo, quedan poros que permiten una rehidratación o reconstitución rápida
- La humedad residual es baja
- La duración de la conservación es larga
- La retención de aromas es muy alta

Así mismo podemos encontrar desventajas del proceso de liofilización como:

- Gran inversión en equipamiento
- Altos costos de energía
- Proceso lento y largo

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar cepas de bacterias ácido lácticas de productos lácteos producidos en el Estado de Hidalgo y sus alrededores, para posteriores estudios de propiedades inhibitorias en productos fermentados; y su conservación por congelación y liofilización; así como, determinar las condiciones microbiológicas de los productos muestreados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar microbiológicamente productos lácteos elaborados artesanalmente y procedentes en su mayoría del Estado de Hidalgo.
2. Aislar cepas de bacterias ácido lácticas a partir de dichos productos fermentados.
3. Conservar las bacterias ácido lácticas que fueron aisladas por congelación y liofilización.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Se analizaron un total de 33 productos lácteos elaborados de manera artesanal y procedentes en su mayoría del Estado de Hidalgo según se detalla a continuación:

Tabla 8. Productos analizados.

CÓDIGO	PRODUCTO	ORIGEN
01	Queso Panela	Tulancingo
02	Queso Oaxaca	Tulancingo
03	Queso Canasto	Pachuca
04	Queso Doble Crema	Pachuca
05	Leche	Atotonilco
06	Queso Oaxaca	Actopan
07	Queso Panela	San Miguel Regla
08	Queso Ranchero	Pachuca
09	Queso Botanero	Pachuca
10	Queso Manchego	Pachuca
11	Queso Oaxaca	Richis Tulancingo
12	Queso Cotija	Tehuacan, Puebla
13	Queso Canasto	Acatlán
14	Queso Oaxaca	Tulancingo
15	Queso Oaxaca	Actopan
16	Queso Oaxaca	Tulancingo
17	Queso Oaxaca	Actopan
18	Queso Oaxaca	Actopan
19	Queso Canasto	México
20	Queso Molido	Pachuca

21	Queso Manchego	Jaltepec
22	Requesón	Tulancingo
23	Queso Oaxaca	Singuilucan
24	Queso Panela	Huejutla
25	Queso Oaxaca	Tezontepec
26	Queso Oaxaca	Tezontepec
27	Queso Panela	Actopan
28	Queso Oaxaca	Jaltepec
29	Queso Panela	Singuilucan
30	Queso Canasto	Pachuca
31	Queso Oaxaca	Tulancingo
32	Queso Oaxaca	Acatlán
33	Queso Blanco	Pachuca

Dichos productos se compraron en unidades en mercados locales de la ciudad de Pachuca y se transportaron en refrigeración en hielera al laboratorio de Biotecnología en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, donde se llevó a cabo su análisis microbiológico el cual se realizó en las 2 h posteriores a su llegada al centro.

3.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para realizar el análisis microbiológico, inicialmente se realizaron diluciones de cada una de las muestras. Para ello, se pesaron 10 g de la muestra en una bolsa estéril y se suspendieron en 90 mL de solución diluyente Ringer (Oxoid, USA). Posteriormente, se realizaron las diluciones mediante la transferencia de 1 mL de la muestra a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución Ringer considerando ésta como la dilución 10^{-1} . De esta dilución, se tomó 1 mL, y se realizó el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-6} (figura 5).

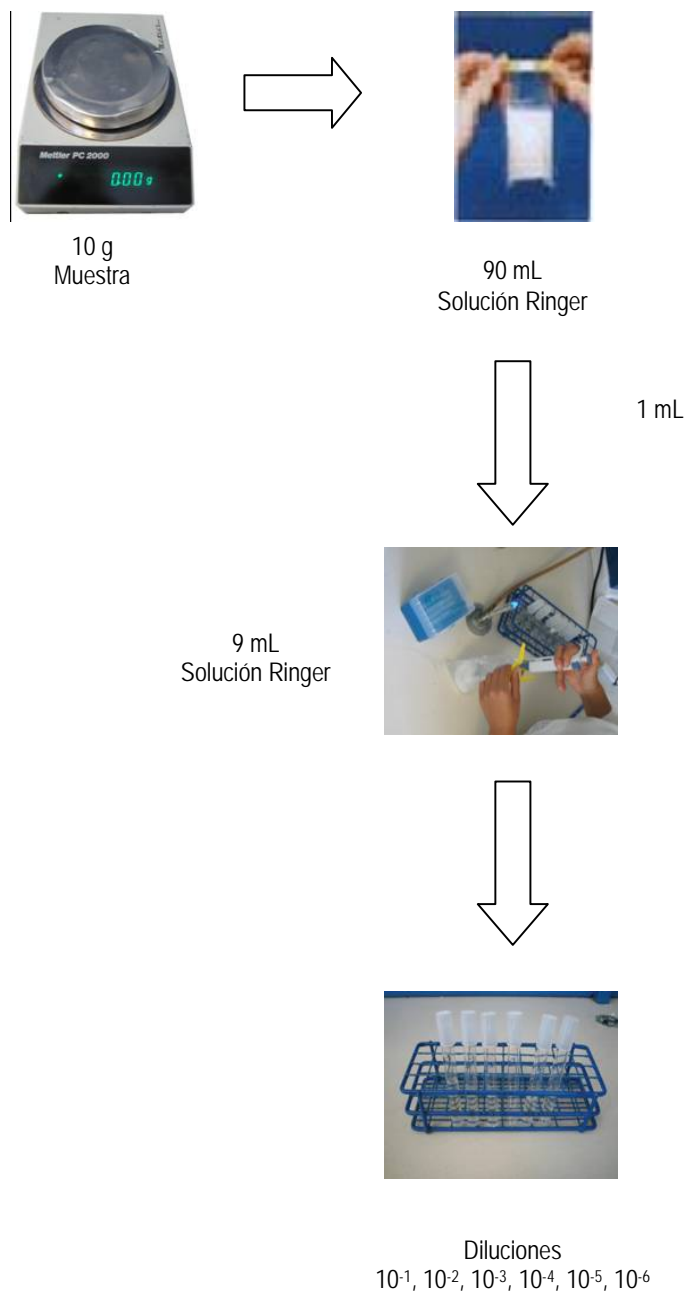


Figura 5. Procedimiento del análisis microbiológico realizado a las muestras de productos lácteos.

Los análisis microbiológicos que se realizaron a las muestras de productos lácteos, fueron los siguientes:

3.2.1. DETERMINACIÓN DE FLORA AEROBIA MESÓFILA

La flora aerobia mesófila (FAM) se determinó por duplicado transfiriendo 1 mL de la dilución correspondiente a una caja de Petri estéril y añadiendo 15 mL de agar de recuento estándar (PCA, Oxoid). Se agitó la placa y se dejó solidificar. Las placas se incubaron en posición invertida a 30°C durante 48 h con base en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, tal como se indica en la figura 6. Posteriormente se contaron las placas que contenían entre 30 y 300 colonias y los resultados se expresaron como Log ufc/g.

3.2.2. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y *E.coli*

El recuento de coliformes y *E. coli* se realizó por medio de la técnica de Coliformes/ *E. coli* (3M Petrifilm™, USA), la cual utiliza dos tiras de plástico que se unen entre sí por un solo lado impregnadas con los ingredientes de los medios de cultivo como son medio bilis rojo violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de glucuronidasa y un indicador de tetrazolio.

La técnica consistió en tomar 1 mL de la dilución apropiada y se colocó por duplicado entre las dos tiras de la placa 3M Petrifilm™ Coliformes/ *E. coli* y mediante presión se extendió sobre la zona del nutriente. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se realizó el recuento de colonias presentes; la aparición de colonias rojas se debe a la presencia de un colorante de tetrazolio en la fase nutriente. En general las colonias de *E. coli* son de color azul a rojo azul asociadas a gas atrapado; mientras que las colonias de coliformes son de color rojo brillante asociadas a gas atrapado. El procedimiento se muestra en la figura 7. Las colonias que no presentaron gas no se contaron. Los resultados se expresaron como Log ufc/g.

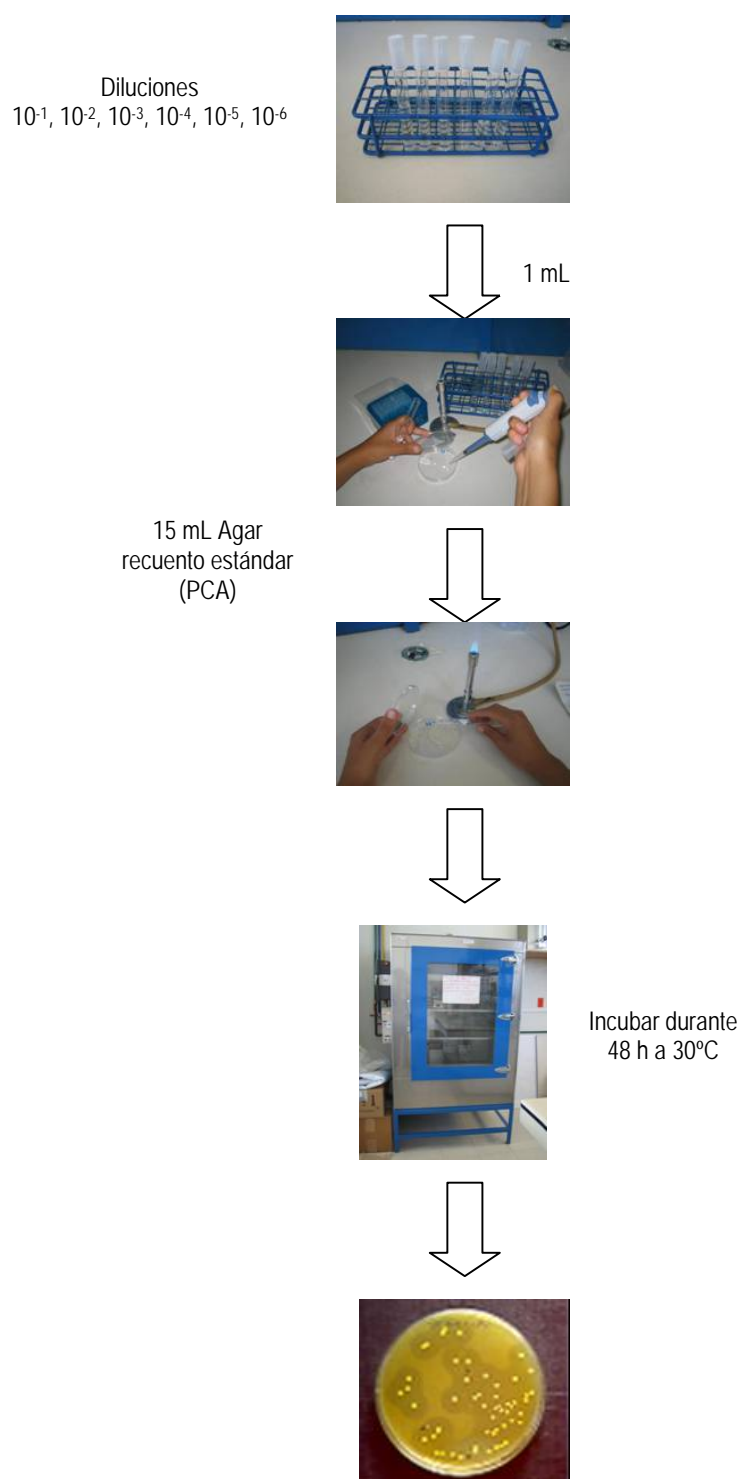
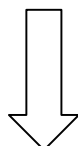


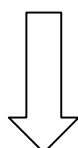
Figura 6 Procedimiento para realizar la determinación de flora aerobia mesófila (FAM).

Diluciones
 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}



1 mL

Placa 3M Petrifilm™ Coliformes/ *E. coli*



Incubar durante
24 h a 37°C

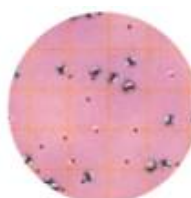
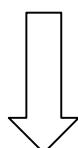


Figura 7. Procedimiento para la determinación de coliformes y *E. coli*.

3.2.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Para el recuento de BAL se inoculó por siembra en superficie 100 µl de las diluciones apropiadas en agar MRS (Difco, USA). Las placas inoculadas se incubaron a 30°C durante 24 h como se indica en la figura 8. La siembra se realizó por duplicado y los resultados microbiológicos se expresaron como Log ufc/g.

3.3. SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Una vez realizado el recuento de las placas de MRS que presentaron recuentos entre 30 y 300 colonias se seleccionaron diez colonias que presentaron la morfología típica de las BAL y posteriormente se resembraron por siembra en estría en agar MRS y se incubaron a 30°C durante 48 horas.

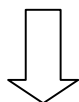
Se realizaron 2 siembras por estría para purificar, sembrando en agar MRS e incubando a 30°C durante 48 h. Una vez purificadas las cepas se realizaron las siguientes pruebas: Tinción de Gram, prueba de catalasa y prueba de oxidasa para confirmar por medio de estas técnicas que las colonias seleccionadas de los productos realmente son bacterias lácticas.

Tinción de Gram:

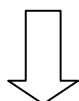
Se colocó en un frotis una gota de la muestra que se va a observar y se fijó a la flama, para que se secase.

Se cubrió con cristal violeta el portaobjetos, se dejó reaccionar por 1 min. Se quitó el exceso de colorante y se lavó con agua corriente brevemente.

Diluciones
 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}



100 μ L



Incubar durante
24 h a 30°C

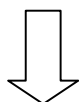


Figura 8. Procedimiento para realizar el recuento de bacterias ácido lácticas.

En seguida se aplicó la solución de yodo, se dejó reaccionar por 1 min y se lavó con agua corriente. Con cuidado se agregó una mezcla de alcohol cetona (70:30), gota a gota con el portaobjetos inclinado, sobre el fregadero tan pronto como las gotas de solución ya no arrastren color.

Se cubrió el portaobjetos con la solución de safranina y se dejó reaccionar por 10 o 20 s, se lavó el exceso de colorante y se dejó secar al aire. Posteriormente se observaron al microscopio y las muestras que presentaron un color rojo fueron consideradas como bacterias Gram-negativas, mientras que las que presentaron un color azul se consideraron bacterias Gram-positivas; independientemente de si son cocos o bacilos (INCB, 1993).

Prueba de la catalasa:

Se recogió con un asa de inoculación el centro de una colonia obtenida de un cultivo puro de 18 a 24 h. Se colocó sobre un portaobjetos, se agregó una gota de H_2O_2 al 30% sobre el cultivo y se observó la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) tomando lo anterior como prueba positiva, tal como se muestra en la figura 9 (INCB, 1993).



Figura 9. Procedimiento para realizar la prueba de catalasa.

Prueba de la oxidasa:

Se adicionó sobre una colonia del microorganismo unas gotas del reactivo para oxidasa (clorohidrato u oxalato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%) y se observó si la colonia cambió de color a azul, la presencia de éste color señaló la positividad de la prueba (INCB, 1993).

3.4. CONSERVACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La conservación de las cepas de bacterias lácticas formó parte de un proyecto más amplio que tiene como objetivo hallar bacterias lácticas con propiedades bacteriocinogénicas por lo cual las cepas aisladas se conservaron por congelación y liofilización para su posterior uso en el desarrollo de la investigación; se utilizaron éstos dos métodos de conservación ya que permiten conservar las características principales de las cepas con lo cual podemos alcanzar los objetivos fijados en la realización del proyecto.

3.4.1. CONGELACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

De la placa que presentó colonias puras se transfirió 1 colonia a un tubo con 10 mL de caldo MRS y se hizo un cultivo de noche u “overnigth” a 30°C durante 12 h. Tras el periodo de incubación se tomaron 100 µl del cultivo, se inocularon en otro tubo con 10 mL de caldo MRS, se incubaron por 24 h posteriormente se introdujeron en la centrifugadora (Hermile, Alemania) a 3000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 8 mL de caldo MRS con 20% de una solución de glicerol y se homogenizó en vortex.

Finalmente se distribuyó el cultivo en 8 tubos estériles (Eppendorf) y se llevaron al congelador a -20°C; tal como se muestra en la figura 10.

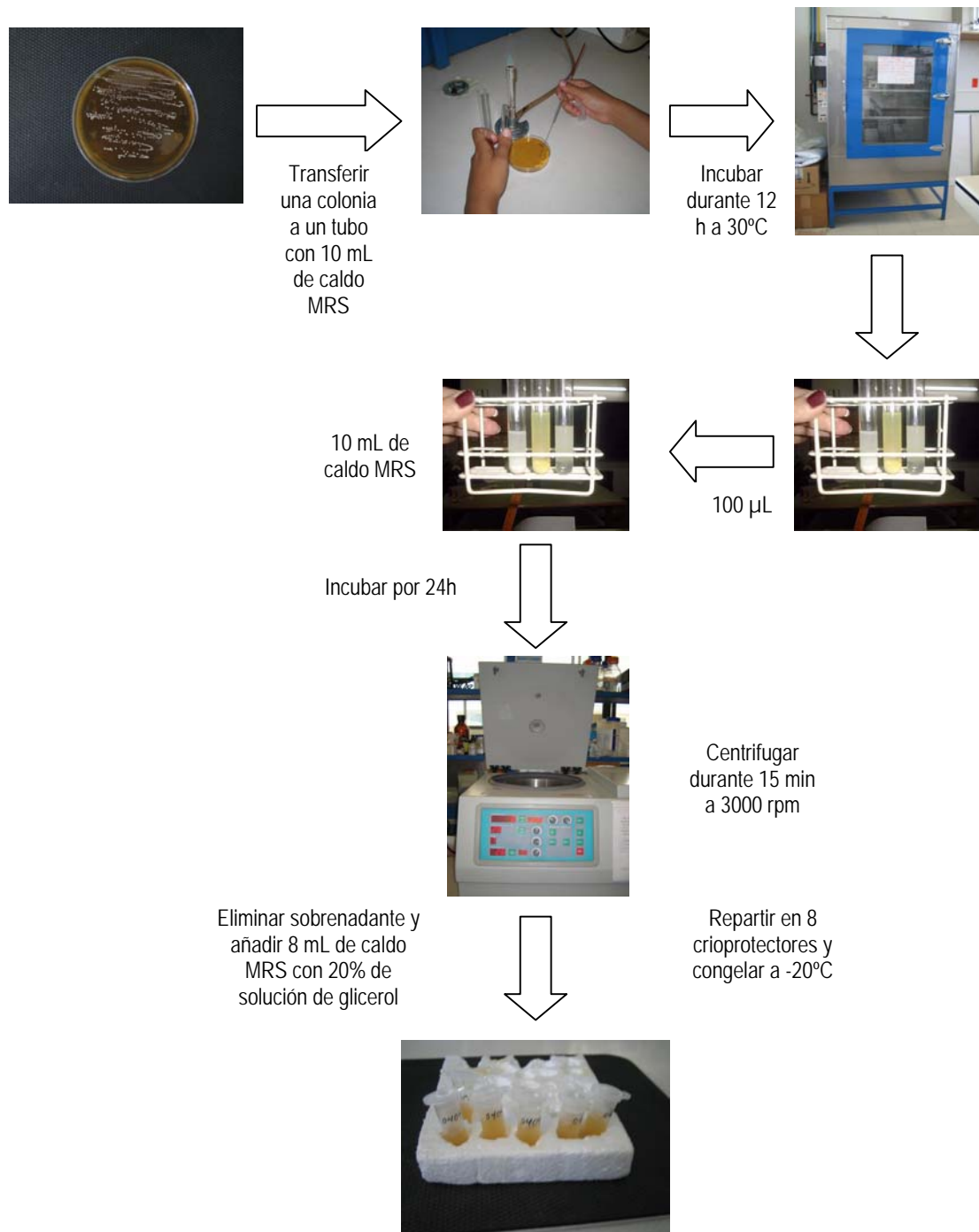


Figura 10. Procedimiento para realizar la congelación de cepas de bacterias ácido lácticas.

3.4.2. LIOFILIZACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Para realizar la liofilización, de la placa que presentó colonias puras, se seleccionó una colonia y se sembró en 9 mL de caldo MRS y se hizo un cultivo de noche u “overnigth” a 30°C durante 12 h.

Después del crecimiento de las bacterias lácticas en medio líquido se pasaron a unos contenedores estériles y se sometió a una centrifugación a 3000 rpm durante 15 min para la obtención de las células y así poder eliminar el medio de cultivo.

Posteriormente se resuspendió el sedimento celular en el mismo volumen de ácido glutámico 0.067 M estéril que había de medio de cultivo. Esto se hizo para lavar y eliminar los restos de medio de cultivo. Se volvió a centrifugar y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en un volumen 1/20 a 1/50 del volumen inicial de ácido glutámico 0.067 M, a fin de obtener una concentración celular elevada.

Esta suspensión se distribuyó en viales de liofilizar. Se congelaron en Nitrógeno líquido y se introdujeron en el liofilizador Freeze Dry System/Freezone 4.5 (Labconco, USA) durante 24 h. Posteriormente se cerraron al vacío y se sellaron con anillo metálico que se colocó con un sellador (Wheaton E-Z CRIMPER), como se muestra en la figura 11.

Tras un periodo de 6 meses de liofilización de las cepas de bacterias lácticas se seleccionaron un total de 50 cepas las cuales se volvieron a activar en agar MRS para comprobar la efectividad del método de conservación.

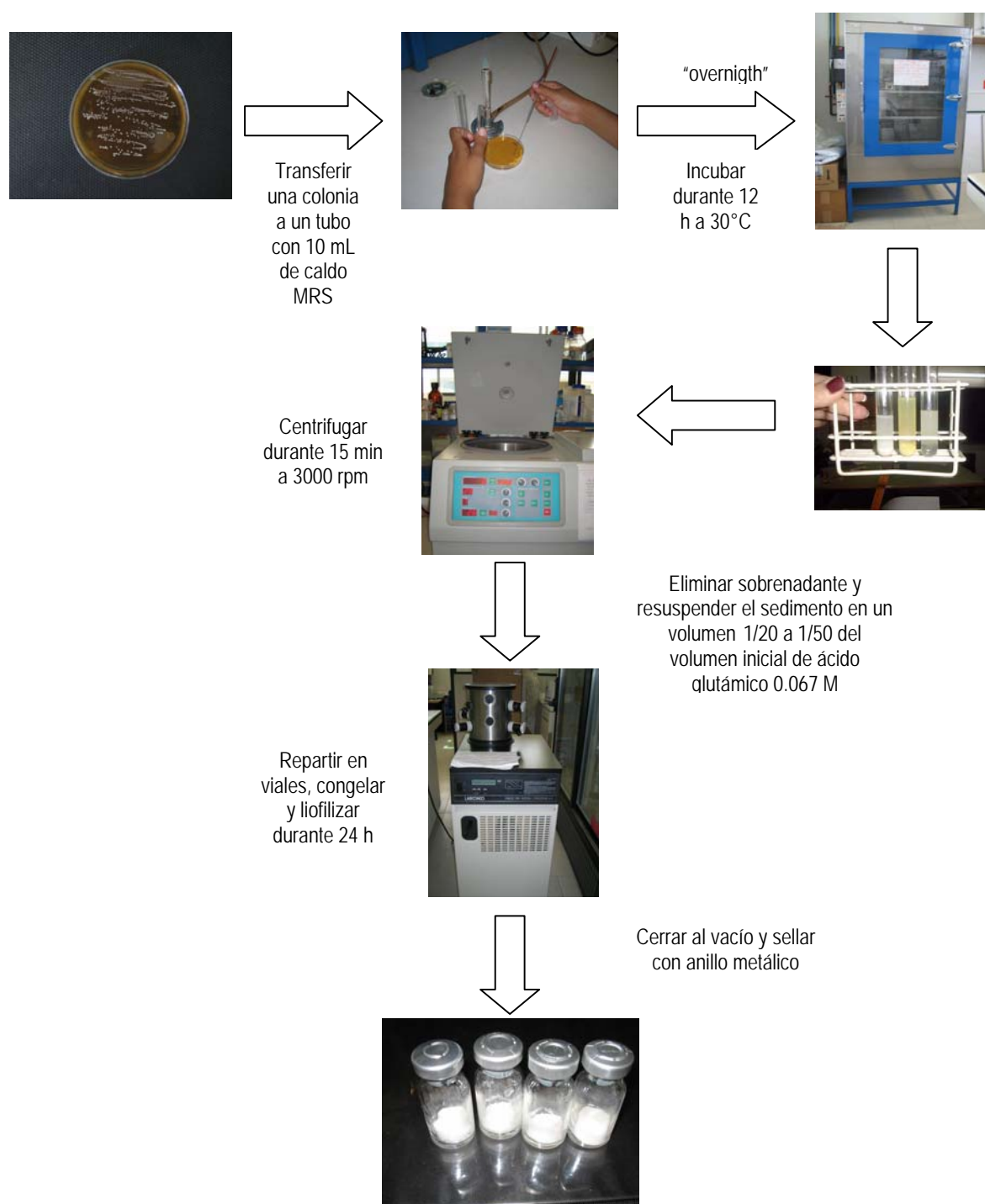


Figura 11. Procedimiento realizado para liofilizar las cepas de bacterias ácido lácticas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de 33 muestras de productos lácteos de los cuales el 96.96% corresponden a muestras de quesos, mientras que el 3.04% restante corresponde a la muestra de leche fresca. Los productos analizados fueron adquiridos en mercados públicos, tiendas y centrales de abasto. Estos productos fueron elaborados artesanalmente por lo que no incluía la adición de cultivos lácticos iniciadores en su elaboración o incluso se vendían sin etiqueta.

Para la realización del aislamiento de bacterias lácticas a partir de productos lácteos se buscó que fueran productos consumidos de manera habitual en las distintas regiones del Estado de Hidalgo además de que tuvieran la característica singular de ser elaborados sin cultivo iniciador o de forma artesanal.

Del total de productos obtenidos 31 muestras tuvieron su origen en el Estado de Hidalgo procedentes de las regiones de Acatlán, Actopan, Atotonilco, Huejutla, Jaltepec, Pachuca, San Miguel Regla, Singuilucan, Tezontepec de Aldama y Tulancingo, lo que corresponde a un 93.93% del total de los productos analizados; mientras que, de los restantes productos lácteos que fueron analizados y que corresponden al 6.07%, uno de ellos tuvo origen en el Estado de Puebla procedente de la región de Tehuacán y el otro producto lácteo procedía de la Ciudad de México.

De las 33 muestras analizadas de productos lácteos catorce productos corresponden a quesos del tipo Oaxaca, cinco de los productos lácteos corresponden a queso tipo panela, cuatro productos fueron quesos de tipo canasto, dos quesos tipo manchego; además de una muestra de los siguientes productos lácteos: queso ranchero, queso botanero, requesón, queso blanco, queso doble crema, queso cotija, queso molido y leche fresca, los cuales se han clasificado como otros productos y que son mostrados en la tabla 9.

Tabla 9. Clasificación de los productos lácteos analizados de acuerdo a su tipo.

Producto	Cantidad
Queso Oaxaca	14
Queso panela	5
Queso canasto	4
Queso manchego	2
Otros productos	Cantidad
Leche fresca	1
Queso blanco	1
Queso botanero	1
Queso cotija	1
Queso doble crema	1
Queso molido	1
Queso ranchero	1
Requesón	1

Debido a la gran variedad de quesos que fueron analizados, se describen brevemente a continuación los diferentes tipos de productos de acuerdo a las pequeñas diferencias en su composición y a la manera tan especial de su preparación incluyendo la estructura del queso, la cual depende de la forma de coagulación, del desarrollo de la acidez, de la cantidad de agua retenida, del contenido de materia grasa, y de algunas fermentaciones que pueden presentarse o no durante su elaboración.

El **queso Oaxaca** se elabora con leche de vaca, y pertenece a la familia de quesos de “pasta hilada” cuya tecnología de elaboración consiste en que a la leche ya pasteurizada se le agrega el cuajo (el cual se forma a partir de la mezcla de enzimas) y se deja reposar, posteriormente se realizan los cortes y se agita para eliminar el suero que se generó y es durante esta etapa en la que se deja acidificar

la mezcla hasta alcanzar un pH de 5.3. Dicha acidificación se logra por medio de la adición de cultivos iniciadores o por fermentación natural a partir de bacterias lácticas presentes en la leche. Posteriormente se sumerge en agua caliente (65 a 70°C) y se amasa para formar la pasta hilada, luego se enfría con agua a 4°C, finalmente se estira la pasta y se trenza para realizar el moldeado. Estas etapas en bajas producciones son muy normales, sin embargo, durante su elaboración se debe poner especial cuidado en ciertos puntos críticos cuyo control es indispensable para la obtención de un queso de buena calidad, algunos de los puntos críticos son: la acidez adecuada de la leche, la acidificación de la cuajada, la determinación del punto de hebra y el amasado de la pasta (Chapman y Sharpe, 1990).

El **queso panela** es un queso fresco de color blanco, es de pasta blanda con un sabor agridulce, autoprensado y elaborado con leche pasteurizada de vaca, entera o parcialmente descremada. Como todos los quesos frescos su composición incluye un porcentaje elevado de agua hasta 58% y por ello es altamente perecedero, por lo que debe conservarse bajo refrigeración desde el momento de su elaboración. La tecnología de elaboración inicia con la adición del cuajo a la leche pasteurizada, se deja reposar y coagular, luego se realizan los cortes y se deja reposar nuevamente, posteriormente la mezcla se agita por un corto tiempo, y se elimina el suero que soltó durante la agitación, por último se le añade sal y se vacía en moldes, tomando en cuenta que la característica principal de este tipo de queso es que a diferencia de otros una vez en el molde se deja escurrir y no se prensa lo que permite que sea un queso con mayor cantidad de agua retenida. Cabe mencionar que este tipo de queso no lleva una fermentación láctica (Chapman y Sharpe, 1990).

El **queso canasto** es un producto fresco caracterizado por ser un producto con un alto contenido de humedad, tiene un sabor suave y no tiene corteza. A dicho producto se le puede adicionar algún ingrediente adicional y tiene un periodo de vida de anaquel corto requiriendo por ello de refrigeración. El queso canasto es muy parecido al queso panela, sin embargo tiene una consistencia un poco más cremosa además de tener la particularidad de que su autoprensado y moldeado lo lleva a

cabo mediante un recipiente en forma de canasto, por lo que su nombre deriva de ahí (Chapman y Sharpe, 1990).

El **queso botanero** es conocido también como enchilado, es un tipo de queso fresco, contiene por ello un alto contenido en humedad, es de textura suave y cremosa, pero a diferencia de los demás quesos antes de ser moldeado se le adiciona chile para darle un sabor característico (Chapman y Sharpe, 1990).

El **queso manchego** es un queso clasificado como madurado caracterizado principalmente por ser de pasta blanda, durante su elaboración este producto ha sido sometido a una maduración mediante la adición de microorganismos o desarrollo de la flora presente, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar un cambio bioquímico y físico lo que le permite prolongar ligeramente su vida de anaquel (Chapman y Sharpe, 1990).

El **queso cotija** es un queso clasificado como madurado pues durante su elaboración se le han adicionado microorganismos, es considerado de pasta dura y con corteza además de que durante la etapa de moldeado ha sido prensado para eliminar la mayor cantidad de agua retenida (Chapman y Sharpe, 1990).

El **requesón** es llamado también queso de suero es un producto obtenido a partir del suero de quesos de leche entera, semidescremada o descremada pasteurizada de vaca, cabra u oveja; el cual es coagulado por calentamiento en medio ácido para favorecer la obtención de la cuajada, la que es salada, drenada, moldeada, empacada y etiquetada y posteriormente refrigerada para su conservación. Es considerado como un derivado lácteo, tiene un sabor muy suave, contiene más proteínas que la leche debido a que se obtiene a partir del suero de ésta una vez eliminada la mayor parte de agua. En la elaboración artesanal del requesón se puede adicionar vinagre (con una solución acuosa de ácido acético) o jugos de frutas ácidas en volúmenes aproximados de 5 a 10% en relación al volumen de lactosuero (Chapman y Sharpe, 1990).

4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos del análisis microbiológico realizado a los quesos tipo Oaxaca procedentes de las regiones de Acatlán, Actopan, Jaltepec, Singuilucan, Tezontepec de Aldama y Tulancingo. Dichos resultados corresponden al recuento de FAM, coliformes, *E. coli* y BAL expresados en (Log ufc/g).

Tabla 10. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de quesos Oaxaca.

Código	FAM	Coliformes	<i>E. coli</i>	BAL
2	8.74	4.08	4.08	8.54
6	8.66	>6.00	>6.00	8.88
11	8.72	>6.00	>6.00	8.43
14	8.92	4.26	4.21	8.81
15	6.92	2.70	ND	6.51
16	7.87	3.78	3.65	7.59
17	7.73	3.52	3.18	7.62
18	7.08	>6.00	>6.00	5.88
23	6.93	4.74	4.36	6.69
25	7.21	6.82	ND	6.95
26	7.28	7.55	ND	7.33
28	7.21	6.21	4.93	7.93
31	5.90	3.33	1.30	7.22
32	7.04	6.53	4.00	7.84
Media	7.59	4.86	3.71	7.59
SD	0.89	1.63	1.10	0.90
Máximo	8.92	7.55	>6.00	8.88
Mínimo	5.90	2.70	1.30	5.88

El promedio resultante del recuento para FAM fue de 7.59 Log ufc/g, presentando las muestras valores superiores a 5.90 Log ufc/g. La presencia de FAM está relacionada al nivel de frescura del queso, según el estudio realizado por Silliker (1963) se correlaciona el significado del contenido bacteriano con la calidad microbiológica del producto, de forma que cuando se presentan cifras mayores a 10^{6-7} ufc/g de FAM se considera que el producto presenta deterioro organoléptico.

Sin embargo, respecto a coliformes sorprenden los resultados obtenidos de las muestras 6, 11, 18, 25, 26, 28 y 32 procedentes de las regiones de, Actopan, Tulancingo, Actopan, Tezontepec, Jaltepec y Acatlán respectivamente; las cuales muestran cifras superiores a 6 Log ufc/g lo que puede indicar descuido en la higiene y limpieza del equipo y utensilios empleados durante la elaboración del producto así como deficientes prácticas de manipulación.

La presencia de *E. coli* está relacionada con contaminación de origen fecal por lo que resulta perjudicial en la calidad microbiológica del producto. En esta investigación realizada al queso Oaxaca la bacteria *E. coli* presentó valores superiores a 6 Log ufc/g en el 21% de las muestras analizadas, mientras que el 57% de las muestras analizadas sobrepasan los valores obtenidos en la investigación realizada por Orozco (1999) a muestras de queso Oaxaca donde obtuvo un recuento de 3.8 Log ufc/g en promedio.

Resulta preocupante el grado de contaminación observado en las muestras, especialmente cuando se trata de un producto que sufre una fermentación láctica dadas las características de elaboración y que permiten luego que la pasta se pueda hilar (Chapman y Sharpe, 1990). Por lo general el desarrollo de BAL inhibe el crecimiento de enterobacterias donde se incluyen coliformes y *E. coli* principalmente debido a la producción de ácido láctico (Axelsson, 1998). Sin embargo en la mayoría de los quesos analizados en este trabajo las bacterias lácticas presentes en elevados números por ser un producto fermentado, no son suficientes para inhibir la flora alterante y patógena.

El origen de la abundante contaminación puede deberse a que en los mercados públicos el producto generalmente carece de empaque y pueden haber sido elaborados partiendo de leche cruda no pasteurizada. Aunque las diferentes normas relativas a leche y productos lácteos exigen la pasteurización de la leche (NOM-091-SSA-1994) la utilización de leche cruda todavía es una práctica habitual en pequeñas empresas o talleres familiares (Orozco, 1999).

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis realizado al queso tipo panela procedente de las regiones de Actopan, Huejutla, San Miguel Regla, Singuilucan y Tulancingo (tabla 11).

Tabla 11. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de queso panela.

Código	FAM	Coliformes	<i>E. coli</i>	BAL
1	7.47	4.85	4.75	4.72
7	6.73	2.72	1.95	4.74
24	6.57	4.48	4.95	6.61
27	7.41	6.95	ND	7.06
29	7.83	3.24	2.36	6.98
Media	7.20	4.45	3.50	6.02
SD	0.53	1.65	1.57	1.19
Máximo	7.83	6.95	4.95	7.06
Mínimo	6.57	2.72	ND	4.72

El queso tipo panela es un queso no fermentado por lo que se esperaría no tener un índice elevado de BAL como se presenta en las muestras marcadas con el código 24, 27 y 29 procedentes de Huejutla, Actopan y Singuilucan respectivamente cuyos resultados de BAL son superiores a 6 Log ufc/g, dicha presencia se atribuye a las condiciones de elaboración y conservación del queso lo que permite el desarrollo de la flora láctica naturalmente presente, ya que la mayoría de las bacterias lácticas son psicrótrofas y pueden desarrollarse a baja temperatura durante el periodo de conservación. Además es frecuente que en algunos mercados no se mantengan los quesos a temperaturas de refrigeración estimulando aún más el desarrollo de bacterias lácticas.

Dentro de los resultados del recuento de *E. coli* la muestra marcada con el código 27 procedente de Actopan es la única en la cual no se detectó dicho microorganismo, mientras que las muestras 1 y 24 presentaron recuentos próximos a 5.00 Log ufc/g.

Torres y col. (2004) realizaron un estudio el cual tuvo como objetivo determinar la microflora natural de un queso artesanal mexicano, dicho estudio fue realizado con cuatro lotes de queso fresco y se realizó un análisis microbiológico a la leche empleada para la elaboración de los quesos así como a los productos terminados durante diferentes tiempos de conservación. En dicho análisis se detectó el contenido total de bacterias, coliformes totales y fecales, *Staphylococcus spp.*, mohos y levaduras. De acuerdo a los resultados obtenidos en dicho trabajo la leche empleada en la elaboración de los cuatro lotes de quesos mostró un alto contenido microbiológico cuyo promedio fue 5.44 Log ufc/g, atribuyéndose en principio a serias fallas en la higiene durante la colección y distribución de la leche empleada para la elaboración de los productos así como la falta de higiene durante la producción de los quesos. El contenido de grupos microbianos que fue detectado en los quesos durante el primer día de almacenamiento mostró en promedio 2 Log ufc/g más que el recuento encontrado en la leche es decir 7.44 Log ufc/g, que es un valor similar a

los hallados en nuestro trabajo ya que los recuentos microbianos rondan valores de 7 Log ufc/g.

De acuerdo a Rodríguez y col. (1995) el incremento en el contenido de microorganismos en el cuajo es un proceso normal en la elaboración del queso, lo cual se debe a la retención física de microorganismos en el cuáguo y a la multiplicación microbiana durante la coagulación y desprendimiento del suero. El incremento en el contenido microbiano en esta fase suele acompañarse de una disminución del pH, que probablemente se deba a la actividad metabólica de las bacterias lácticas naturalmente presentes en la leche.

En el estudio de Torres y col. (2004) los coliformes totales mostraron una ligera reducción de 1.5 Log ufc/g durante el periodo estudiado, es decir de un recuento inicial de 5.63 Log ufc/g, este disminuyó durante el almacenamiento hasta alcanzar valores de 4.13 Log ufc/g; lo cual fue probablemente debido a la disminución en el pH. Sin embargo en nuestro estudio la presencia de coliformes presentó valores menores en comparación con el primer recuento realizado en el estudio de Torres y col. (2004) a excepción de la muestra 27 la cuál mostró un valor elevado de coliformes de 6.95 Log ufc/g.

Torres y col. (2004) también estudiaron la presencia de BAL obteniendo un valor promedio de 7.99 Log ufc/g, que comparado con los resultados de nuestro estudio donde el recuento de BAL fue de 6.02 Log ufc/g, es ligeramente superior. De todas formas como se comentó anteriormente la presencia de BAL es bastante elevada para un producto que no lleva fermentación. La abundancia de bacterias lácticas en este tipo de queso va a afectar en gran medida a las características organolépticas del producto, especialmente en cuanto al sabor ácido.

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos del recuento de FAM, coliformes, *E. coli* y BAL presentes en el queso tipo canasto procedentes de las regiones de Acatlán, Ciudad de México y Pachuca.

Tabla 12. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de queso canasto.

Código	FAM	Coliformes	<i>E. coli</i>	BAL
3	3.16	2.79	ND	3.41
13	7.24	ND	ND	5.79
19	4.99	ND	ND	3.91
30	5.78	ND	ND	4.34
Media	5.29	2.79	ND	4.36
SD	1.70	—	—	1.03
Máximo	7.24	2.79	ND	5.79
Mínimo	3.16	ND	ND	3.41

De los recuentos obtenidos de FAM la muestra 13 procedente de la región de Acatlán fue quien presentó un valor de 7.24 Log ufc/g el cual es mucho más elevado en comparación con las demás muestras analizadas de este tipo de queso. Sin embargo, apenas se detectó presencia de coliformes en una de las muestras mientras que *E.coli* no fue detectada en ninguna muestra.

Por otro lado, la muestra 13 procedente de la región de Acatlán también presentó mayor contenido de BAL en comparación con las demás muestras analizadas y el cual corresponde a 5.79 Log ufc/g y siendo un producto no fermentado se esperaba un índice menor de presencia de dichas bacterias, aunque sin duda los recuentos

de los grupos microbianos observados en este tipo de queso son inferiores a los hallados en los quesos panela analizados (tabla 11).

Sorprenden los resultados mostrados pues no se detectó la presencia de *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas, mientras que el recuento de coliformes sólo se presentó en la muestra 3 con un valor de 2.79 Log ufc/g.

Debido a que este tipo de queso utiliza durante su moldeado un recipiente que es un canasto, se podría esperar que es un medio de contaminación directa hacia el producto y por tanto que los recuentos fueran más importantes que en el queso panela. Sin embargo no ha sido así, lo que hace pensar que posiblemente en los talleres donde se elabora este tipo de queso se mantiene un elevado grado de higiene en el proceso de elaboración y manipulación del producto.

Siguiendo con el caso del queso tipo manchego se presentan en la tabla 13 los resultados del recuento de FAM, coliformes, *E. coli* y BAL presentes en este tipo de queso procedentes de las regiones de Jaltepec y Pachuca.

El queso tipo manchego está clasificado como un queso madurado debido a que es sometido a una fermentación y durante su elaboración en producciones industriales son adicionadas BAL o simplemente se deja desarrollar la flora natural presente para proporcionar sabor, por lo cual las muestras 10 y 21 procedentes de las regiones de Pachuca y Jaltepec respectivamente presentan un elevado número de BAL que corresponde a 7.09 Log ufc/g en promedio y además dicha presencia favorece la inhibición de patógenos.

Tabla 13. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) de muestras procedentes de queso manchego.

Código	FAM	Coliformes	<i>E. coli</i>	BAL
10	7.21	ND	ND	7.24
21	7.33	>6.00	>6.00	6.94
Media	7.27	—	—	7.09
SD	0.09	—	—	0.21
Máximo	7.33	>6.00	>6.00	7.24
Mínimo	7.21	ND	ND	6.94

Sin embargo, a pesar de la elevada concentración de BAL la muestra 21 apareció muy contaminada por coliformes y *E. coli*, presentando dicha muestra recuentos superiores a 6 Log ufc/g, mientras que en la muestra 10 no se detectó ninguno de los microorganismos antes mencionados.

Durante la maduración que sufre este tipo de queso se desarrolla la flora láctica con lo cual disminuye el pH y ejerce efecto inhibitorio sobre todo con microorganismos gram (-) como son coliformes y *E. coli* (Chapman y Sharpe, 1990). Además durante la maduración se produce una desecación que disminuye la actividad de agua (a_w) del producto, inhibiendo de esta manera el desarrollo de algunos microorganismos.

La elevada presencia de *E. coli*, indicador de contaminación fecal, en el queso 21 indica unas muy deficientes prácticas de manufactura en la empresa, y también durante la distribución y conservación del mismo, lo que supone un riesgo microbiológico para el consumidor ya que aunque este tipo de queso se puede consumir en caliente fundido, es más frecuente su consumo directo como botana sin ningún tipo de preparación.

Por último se presentan en la tabla 14 los resultados obtenidos del recuento de FAM, coliformes, *E. coli* y BAL, correspondientes a las muestras clasificadas como otros productos debido a que sólo se analizó una muestra de cada producto y los cuales son procedentes de las regiones de Atotonilco, Pachuca, Puebla y Tulancingo.

Tabla 14. Resultados del análisis microbiológico (Log ufc/g) realizado a las muestras clasificadas como otros productos.

Código	FAM	Coliformes	<i>E. coli</i>	BAL
Leche *	>6.00	ND	ND	>6.00
Queso blanco	6.19	ND	ND	3.57
Queso botanero	6.49	2.32	ND	5.21
Queso cotija	5.91	ND	ND	5.81
Queso doble crema	7.27	ND	ND	6.60
Queso molido	5.13	ND	ND	5.09
Queso ranchero	6.64	ND	ND	6.45
Requesón	7.41	>6.00	>6.00	7.35
Media	6.43	2.32	—	5.72
SD	0.79	—	—	1.24
Máximo	7.41	>6.00	>6.00	7.35
Mínimo	5.13	ND	ND	3.57

* (Log ufc/mL)

En principio la leche analizada, que corresponde al código 5 y la cual es procedente de la región de Atotonilco, presenta recuentos superiores a 6 Log ufc/L en cuanto a la presencia de FAM. Este tipo de valores suele ser frecuente cuando se trata de leche cruda que no ha sufrido tratamiento de pasteurización. Una vez pasteurizada la norma oficial mexicana NOM-091-SSA-1994 establece un límite 30 000 ufc/mL,

es decir, 4.47 Log ufc/mL. Además de ser leche bronca, este producto parece ser que estuvo almacenado por varios días, lo que explicaría el elevado recuento de bacterias lácticas hallado, ya que se favorece su desarrollo durante la conservación a bajas temperaturas, y que en principio inhibió a coliformes y *E. coli*, ya que estos microorganismos no fueron detectados.

El efecto inhibitorio de las BAL sobre microorganismos alterantes y patógenos también depende de las características físicas del alimento donde se desarrollan. Así pues, en un alimento líquido como lo es la leche es más fácil la difusión de los metabolitos antimicrobianos que cuando se trata de un alimento sólido y compacto, lo que explicaría el menor efecto inhibitorio de las BAL sobre coliformes y *E. coli*, en los quesos anteriormente detallados.

Cabe resaltar que el requesón procedente de Tulancingo presenta recuentos superiores a 6 Log ufc/g de coliformes y *E. coli* y sobrepasa los límites establecidos por la norma oficial mexicana NOM-035-SSA1-1993, Quesos de suero, la cual establece un máximo de 100 ufc/g para la presencia de coliformes y que son relacionados a la inadecuada higiene del equipo y utensilios empleados para la fabricación del producto. De igual forma que lo comentado para el queso manchego, este producto constituye un riesgo para la salud de los consumidores por ser un producto que se consume fresco y sin ningún tipo de preparación.

El resto de los productos analizados excepto el queso blanco presentaron un elevado número de BAL por arriba de 5.00 Log ufc/g lo que puede favorecer la inhibición de patógenos.

En el caso del queso botanero la presencia de coliformes presentó un recuento de 2.32 Log ufc/g lo que representa un descuido en la higiene del equipo además de una no muy buena manipulación del producto durante su producción; sin embargo, tratándose de un queso al cual se le incorporan ingredientes vegetales como lo es el

chile puede influir directamente sobre su calidad microbiológica, lo que pudo haber ocasionado la presencia de este grupo microbiano en la muestra de queso botanero.

En general el crecimiento de diferentes grupos microbianos durante la producción y almacenamiento de quesos frescos producidos de manera artesanal puede deberse al empleo de leche cruda, a la no utilización de cultivos iniciadores y a las condiciones sanitarias en las que fueron obtenidos y almacenados, lo que origina productos de dudosa calidad sanitaria. Aunque en México no está permitido el uso de leche cruda para la elaboración de éste tipo de productos y se presupone que los quesos se elaboran con leche pasteurizada, los elevados recuentos hallados en algunos de ellos pueden ser consecuencia de la utilización de leche cruda (Orozco, 1999).

Así mismo muestra mayor interés el control sobre aquellos microorganismos relacionados con el deterioro del producto, los patógenos y los que tienen algún significado como indicadores de prácticas sanitarias, entre los que se pueden mencionar la bacteria *E. coli* la cual constituye un indicio consistente de acceso a gérmenes intestinales; puesto que se trata de productos que son elaborados de manera artesanal la técnica de fabricación es muy personal en cuanto a nivel de acidez, temperatura y tiempo de tratamiento por lo que la presencia de la población de coliformes adquiere un gran significado; así mismo de la presencia de materia extraña la cual es también un indicador directo del ambiente sanitario en el que se lleva a cabo la producción y maduración de los quesos (Orozco, 1999).

La presencia de coliformes en los quesos al igual que en el caso de la leche muestran evidencia de descuidos en la higienización del equipo empleado para su elaboración y en pobres condiciones de manipulación, así mismo el agua también es una fuente potencial de contaminación (Orozco, 1999).

4.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Para realizar el aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de las placas de recuento de BAL de las 33 muestras de productos lácteos en estudio, se seleccionaron de las placas que presentaban entre 30 y 300 colonias, diez colonias con morfologías diferentes. De la muestra 04 proveniente del queso Doble Crema se seleccionaron 12 colonias. Tras la selección las colonias fueron purificadas y se les realizaron las pruebas de tinción Gram, prueba de catalasa y oxidasa así como examinar al microscopio su morfología.

En total se aislaron 332 cepas de las cuales tras realizar las pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa, se reconocieron 39 colonias como levaduras debido a la morfología presentada tras examinarlas bajo el microscopio así como por presentar resultado positivo a las pruebas de catalasa y/o oxidasa (tabla 15).

En las muestras procedentes de queso canasto sorprenden los resultados obtenidos ya que de las 40 cepas aisladas y purificadas 10 de ellas resultaron ser levaduras, siendo este producto el portador de la mayoría de cepas desechadas.

De igual manera de la muestra de queso cotija procedente de la región de Tehuacán, Puebla, de la cual se analizaron 10 cepas, el 50% de cepas resultaron ser levaduras.

Sólo tres muestras obtuvieron al 100% el contenido de bacterias lácticas tras la identificación por medio de morfología y pruebas de identificación presuntiva de bacterias lácticas y corresponden a el queso doble crema, leche y el queso blanco, procedentes del mercado de Atotonilco y la central de abastos de Pachuca.

Tabla 15. Cantidad de bacterias lácticas y levaduras por tipo de producto.

Producto	Origen	Cepas de BAL	Levaduras
Queso Panela	- Mercado de Tulancingo - San Miguel Regla - Huejutla - Mercado de Actopan - Mercado de Singuilucan	45	5
Queso Oaxaca	- Mercado de Tulancingo - Mercado de Actopan - Tienda Richis, Tulancingo - Mercado de Tulancingo - Mercado de Actopan - Mercado de Tulancingo - En una tienda en Actopan - Mercado de Actopan - En una tienda en Singuilucan - Mercado en Tezontepec - En una tienda en Tezontepec - Jaltepec - Mercado de Tulancingo - Acatlán	132	8
Queso Canasto	- Mercado de Pachuca - Acatlán - Ciudad de México - Central de Abastos de Pachuca	30	10
Queso Doble Crema	- Mercado de Pachuca	12	0
Leche	- Mercado de Atotonilco	10	0
Queso Ranchero	- Pachuca	7	3
Queso Botanero	- Pachuca	7	3
Queso Manchego	- Pachuca - Jaltepec	17	3
Queso Cotija	- Tehuacan Puebla	5	5
Queso Molido	- Central de Abastos Pachuca	9	1
Requesón	- Mercado de Tulancingo	9	1
Queso Blanco	- Central de abastos Pachuca	10	0
Total		293	39

Las 39 cepas de levaduras que se identificaron (12% de las cepas aisladas) fueron desechadas posteriormente para así obtener un total de 293 cepas de bacterias lácticas, de las cuales se muestran en la tabla 16 los resultados obtenidos de las pruebas de tinción Gram y de morfología así como los resultados de las pruebas de catalasa y oxidasa de las 293 cepas de bacterias lácticas.

El mayor porcentaje registrado tras la identificación de los tipos de morfología de las cepas de bacterias lácticas, corresponde a bacilos cortos con un 57%, seguido de los cocobacilos con un 21%, y por último se encuentran los cocos registrando un 10% del total de cepas analizadas.

La diferenciación de bacterias lácticas de levaduras por medio de su morfología macroscópica resulta difícil de apreciar, y aunque las colonias de levaduras suelen presentar una coloración más amarillenta o color crema, es cuando se les observa al microscopio cuando se detectan si son levaduras por su peculiar morfología y un tamaño superior al de bacterias lácticas.

Tabla 16. Resultados obtenidos de las pruebas aplicadas a BAL.

Morfología	Código de cepas	Porcentaje (%)	Prueba Catalasa	Prueba Oxidasa
Bacilos cortos Gram Positivos	0101, 0102, 0103, 0104, 0105, 0106, 0107, 0108, 0109, 0201, 0202, 0203, 0204, 0205, 0206, 0207, 0208, 0209, 0210, 0401, 0402, 0403, 0405, 0406, 0409, 0410, 0411, 0412, 0501, 0502, 0503, 0504, 0505, 0506, 0508, 0509, 0602, 0603, 0604, 0605, 0606, 0607, 0608, 0609, 0610, 0701, 0702, 0703, 0705, 0707, 0803, 0804, 0805, 0806, 0807, 0808, 0905, 0906, 0909, 0910, 1001, 1004, 1005, 1008, 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1108, 1109, 1202, 1205, 1206, 1207, 1209, 1303, 1308, 1309, 1310, 1401, 1403, 1404, 1406, 1407, 1409, 1410, 1501, 1503, 1506, 1601, 1602, 1604, 1605, 1608, 1609, 1701, 1702, 1703, 1705, 1706, 1707, 1708, 1709, 1710, 1801, 1807, 1810, 1901, 1902, 1903, 1904, 1905, 1906, 1907, 1908, 1910, 2001, 2002, 2005, 2008, 2010, 2102, 2104, 2105, 2106, 2109, 2110, 2203, 2204, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2301, 2302, 2306, 2307, 2309, 2310, 2401, 2403, 2404, 2409, 2410, 2503, 2504, 2505, 2507, 2508, 2509, 2510, 2601, 2602, 2603, 2604, 2606, 2607, 2608, 2610, 2701, 2702, 2703, 2704, 2706, 2708, 2709, 2710, 2802, 2803, 2804, 2805, 2806, 2807, 2808, 2810, 3103, 3104, 3107, 3108, 3202, 3208, 3210, 3301, 3302, 3305, 0601, 1603, 1606, 3201.	57	Negativa	Negativa
Cocobacilos Gram Positivos	0110, 0404, 0408, 0704, 0709, 0810, 0904, 1006, 1007, 1009, 1010, 1106, 1107, 1110, 1301, 1302, 1304, 1305, 1306, 1307, 1402, 1405, 1408, 1502, 1510, 1610, 1704, 1802, 1803, 1805, 1806, 1808, 1809, 2003, 2202, 2205, 2308, 2406, 2407, 2506, 2605, 2408, 2501, 2502, 2609, 2801, 2809, 2901, 2902, 2904, 2905, 2907, 3001, 3002, 3005, 3007, 3008, 3010, 3102, 3106, 3109, 3110, 3203, 3207, 3303, 3304, 3307, 3308, 3309, 3310.	21	Negativa	Negativa
Cocos Gram Positivos	1804, 2705, 2910, 0301, 0302, 0407, 0507, 0510, 0903, 0907, 1504, 1507, 1508, 1509, 1607, 2007, 2009, 2101, 2103, 2405, 2903, 2906, 2908, 2909, 3006, 3009, 3101, 3105, 3205, 3206, 3209, 3306.	10	Negativa	Negativa

4.3. CONSERVACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS

Las 293 cepas fueron sometidas a dos métodos de conservación que son: congelación y liofilización; esto para poder ser reutilizadas en estudios posteriores.

En el caso de congelación se conservaron de 8 a 10 copias por cada cepa, manteniéndose en congelación a -20°C . La técnica de congelación es muy sencilla y práctica tal y como se menciona en la introducción pero depende mucho de la estabilidad de la temperatura del congelador, de forma que un fallo de corriente o problema en el congelador puede acabar con la colección de cepas de BAL recogidas.

Las cepas fueron utilizadas en estudios posteriores mediante inoculación de un vial, previamente descongelado a 37°C , en un tubo de MRS e incubación por 12h a 30°C . Ninguna cepa presentó problemas de crecimiento lo que indica que la congelación permitió la conservación de las cepas, pero en algunas ocasiones se observaron contaminaciones o cepas que no eran puras por lo que fue necesario repetir los pasos de purificación. Cuando se trabaja con varias cepas los problemas de contaminación cruzada son muy frecuentes si no se observan las adecuadas medidas de esterilidad y cuidado en el manejo.

Para la liofilización se partió de las cepas congeladas de forma que tras verificar que se trataba de cepas puras se procedía a la liofilización tal y como aparece descrito en el apartado de material y métodos.

Del total de cepas sometidas a la conservación por liofilización sólo con una de ellas no se pudo liofilizar debido a que la cepa murió durante la congelación y no pudo ser recuperada, dicha cepa corresponde al código 3001 la cual tuvo origen a partir del queso tipo canasto y fue procedente de la central de abastos de Pachuca. De hecho se sospecha que dicha cepa se trataba de una levadura.

Tras un periodo de 6 meses después de concluido el procedimiento de liofilización, 50 cepas fueron seleccionadas para realizar una prueba de confirmación de la efectividad del método de conservación. De las 50 cepas aisladas dos de las cepas no pudieron reactivarse como era de esperar. Para la liofilización es importante la concentración de células a liofilizar y en el caso de estas dos cepas su crecimiento era muy débil lo que habría ocasionado que no sobrevivieran al proceso de liofilización.

5. CONCLUSIONES

1. Se estudió la calidad microbiológica de 33 productos lácteos, los cuales en su mayoría mostraron elevados recuentos microbiológicos. En general, los quesos Oaxaca, panela, uno de los quesos manchegos y el requesón presentaron altos recuentos de coliformes y *E. coli*, que indican prácticas de higiene deficientes durante el proceso de elaboración, distribución y venta.
2. El resto de productos, en especial el queso canasto, presentaron una mejor calidad microbiológica respecto a la presencia de coliformes y *E. coli*.
3. Todos los productos presentaron importantes recuentos de BAL que no fueron suficientes para inhibir la flora alterante presente.
4. De los 33 productos lácteos en estudio se logró aislar y purificar un total de 293 cepas de BAL de un total de 332 cepas aisladas.
5. Tanto la conservación por congelación como por liofilización son excelentes métodos para mantener las BAL, aunque se recomienda la liofilización ya que no depende durante el almacenamiento del mantenimiento de temperaturas de congelación.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Alais, Ch. 1984. Ciencia de la Leche. Editorial Continental. 5ta Edición. México, D.F.
2. Amiot, J. 1991. Ciencia y Tecnología de la Leche. Editorial Acribia. Zaragoza España.
3. Axelsson L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen y Von Wright (editores), Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker New York, pp. 1-60.
4. Barakat, R. K., Griffiths, M. W y Harris, L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* sp. From cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 83-94.
5. Bassette, R., Acosta J. S. 1988. Composition of milk products, p. 39-79. En: N. P. Wong (ed.), *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Van Nostrand Reinhold., New York.
6. Beech, F.W., Davenport, R.R. 1971. "Isolation, purification and maintenance of yeasts". *Methods in Microbiology*. Vol 4. Academic Press. London, 153-182.
7. Bishop, J.R., White, C.H. 1984. Antibiotic residue in milk-a review. *J. Food Prot.* 47:647-652.
8. Bramley, A. R., and McKinnon, C. H. 1990. The microbiology of raw milk, p. 163-208. En: R. K. Robinson (ed.), *Dairy Microbiology*, vol. 1. Elsevier Applied Science, New York.
9. Buncic, S., Avery, A. M. and Moorhead, S. M. 1997. Insufficient antilisterial capacity of low inoculum *Lactobacillus* cultures on long-term stored meats at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 34:157-170.
10. Cabo, M. L. Braber, A., Koenraad, P. 2002. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Prot.* 65:1309-1316.
11. 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.

-
12. Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., Hernández, P. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Tech Int.* 7:281-305.
 13. Collins, M.D. Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Williams, A.M. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. Nov. *J. Appl. Bacteriol.* 67. 453-460.
 14. Collins, M.D., Facklam, R.R., Rodrigues, U.M. and Ruoff, K.L. 1993. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus* like organisms from clinical sources; description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 343. 425-429.
 15. Collins, M.D., Williams, A.M. and Wallbanks, S. 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 70. 255-262.
 16. Cousin, M. A. 1989. Physical and biochemical effects of milk components, p. 205-225, En: R. C. McKellar (ed.), *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Fla.
 17. Daeschel, M.A. y Penner, M.H. 1992. Hydrogen peroxide, lactoperoxidase systems, and reuterin. En: Bibek R., Daeschel M. *Food biopreservatives of Microbial origin*. CRC Press. México. 57-77.
 18. Desroiser, N.W. 1999. Elementos de Tecnología de Alimentos. CECSA. 14ª Reimpresión. México, D.F.
 19. Devriese, L. A., Pot, B., and Collins, M. D. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups, *J. Appl. Bacteriol.* 75:399-408.
 20. Dykes, G.A., Cloete, T.E., Von Holy, A., 1995. Taxonomy of lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged processed meat spoilage by multivariate analysis of cellular fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 89-100.
 21. Early, R. 2000. Tecnología de productos lácteos. Editorial Acribia. Zaragoza España.
 22. Eckner, K. F. 1992. Bacteriocins and food applications. *Dairy Food Environ. Sanit.* 12:204-209
 23. Ewings, K. N., O'Conner, E. E. and Mitchell, G. E. 1984. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in South East Queensland. *Aus. J. Dairy Technol.* 39:65-68.
-

-
24. Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México, D.F.
 25. Fleet, G. H. 1990. Yeast in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68:192-211.
 26. Frank, J. F. 1997. Milk and dairy products: 101-116. En: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle, M. P. Beuchat, L. R. and Montville, T. J. (Eds.) ASM Press. Washington, DC.
 27. Frazier, W.C., Westhoff, D.C. 2000. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. 4ª Edición. Zaragoza España.
 28. García, G., Quintero, R., López, M. 2002. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. 4ª Edición. México, D.F.
 29. García, M. L., Sanz, B., García-Collia, P. and Ordonez J. A. 1989. Activity and thermostability of the extracellular lipases and proteinases from pseudomonads isolated from raw milk. *Milchwissenschaft* 44:547-550.
 30. Hammes, W.P., Weiss, N. and Holzapfel, W. 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: A. Balows. H.G. Trüper. M. Dworkin. W. Harder and K.H. Schleifer (editors). The Prokaryotes. Vol II. 2nd edition. Springer-Verlag. New York. pp. 1535-1594.
 31. Havennar, R. B. y J.H.J. Huist in't Veld. 1992. Probiotics: a general view. The lactic acid bacteria volume 1: the lactic acid bacteria in health and disease. Chapman and Hall. New York.
 32. Hicks, C. L., Allauddin, M., Langlois, B. E. and O' Leary, J. 1982. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. *J. Food Prot.* 45:331-334.
 33. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas. (INCB). 1993. "Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria", Departamento de microbiología, 2ª Edición, pp. 217-223.
 34. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (ICMSF), 1998. Microorganisms in Foods. 6. Microbial Ecology of Foods Commodities. Blackie Acad. & Profess. Press, London.
 35. Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171-200.
 36. Jay, J.M. 1994. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia. 4ª Edición. pp. 441-475. Zaragoza, España.
-

-
37. Jenness, R. 1988. Composition of milk. En: N. P. Wong (ed), *Fundamentals of dairy Chemistry*. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
 38. Jones, D. 1978. Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. En: F. A. Skinner and L. B. Quesnel (editors). *Streptococci*. Academic Press. London. pp. 1-49.
 39. Keating, F.P., Rodríguez, G.H. 2002. Introducción a la lactología. Editorial Limusa. 2ª Edición. México, D.F.
 40. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12:39-85.
 41. Kyzlink, V. 1990. Principles of food preservation. Elsevier. Amsterdam. pp. 529-536.
 42. Lapage S.P., Shelton J.E., Mitchell, T.G. and Mackenzie, A.R. 1970. "Culture collection and the preservation of bacteria". *Methods in Microbiology*. Vol. 3. Academic Press. London, 135.
 43. Leveau, J., Bouix, M. 2000. Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia. Zaragoza España.
 44. Madigan, M., Martinko, J., Parker J. 1998. Brock. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. 8ª. ed. pp. 70-81.
 45. Mafart, P. 1994. Ingeniería Industrial Alimentaria. Vol. I Procesos físicos de conservación. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España.
 46. Massa, S., F. Gardini, M. Sinigaglia, and M. E. Guerzoni. 1992. *Klebsiella pneumoniae* as a spoilage organism in Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 75:1411-1414.
 47. Morales, V. V. 2003. Fabricación de Mantequilla. *Dairy Science and Technology*, University of Guelph, Canada.
 48. Muir, D. D. 1989. The microbiology of heat treated fluid milk products, p. 209-270. En: R. K. Robinson (ed), *Dairy Microbiology*, vol. 1. Elsevier Applied Science, New York.
 49. Nettles, C.G. y Barefoot S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56 (4): 338-356.
 50. Nickerson, S.C. 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187:41-45.

-
51. O' Leary, W.M. 1982. Lipoidal contents of specific microorganisms. En: CRC Handbook of Microbiology. Volumen IV. Microbial composition: carbohydrates, lipids and minerals. ed, Laskin & Lechevalier, H.A. pp. 391-429. Boca Ratón: CRC Press Inc.
 52. 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.
 53. Raccach, M. 1987. *Pediococci* and biotechnology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 14. 291-309.
 54. Ray, B., Daeschel, M. 1992. Food biopreservatives of microbial origin. CRC press. Florida. pp. 57-63, 177-199.
 55. Rodriguez, G.C., Mast, E.E., Greene. K.D. 1995. A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J. Inf. Dis.* 172:1122-1125.
 56. Salminen, S., Von Wright, A. 1998. Lactic Acid Bacteria, microbiology and functional aspects. Marcel Dekker. New York. pp. 1-6.
 57. 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* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6. 183-195.
 58. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA1-1993. Quesos de suero. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial, 30 de Enero, 1995, México.
 59. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA-1994. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Diario Oficial, 21 de Febrero, 1996, México.
 60. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial, 12 de Diciembre, 1995, México.
 61. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial, 23 de Febrero, 1996, México.
 62. Silliker, J.H. 1963. Total count as indexes of food quality: 102-112. En: Microbiological Quality of Foods. Slanetz, L.W., Chischester, C.O., Gaufin, A.R. and Ordal, Z.J. (Eds). Academic Press London.
-

-
63. Sneath, P.H.A., Hair, N.S., Sharpe M.E. y Holtz, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Williams & Wilkins Press. Baltimore. M.D.
64. Spreer, E. 1991. *Lactología Industrial*. Editorial Acribia. 6ª Edición. Zaragoza España.
65. Stamer, J.R. 1979. The lactic acid bacteria. *Microbes of Diversity. Food Technol.* 33 (1):60-65.
66. Stiles, M. E., Holzappel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.
67. Teuber, M., Geis, A., Neve, H. 1991. The genus *Lactococcus*. En: A. Balows. H. G. Trüper. M. Dworkin. W. Harder and K.H. Schleifer (editors). *The Prokaryotes*. Vol. II. 2nd edition. Springer-Verlag. New York. pp. 1482-1501.
68. Torres-Llenez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M.E., Mazorra-Manzano, M.A., González-Córdova, A.F. 2004. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control* 30:1-8.
69. Veisseyre, R. 1988. *Lactología Técnica*. 2ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España.
70. Wallbanks, S., Martínez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A. and Collins, M.D. 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40. 224-230.
71. William-Campbell, A. y Jay, J. 2002. Effects of diacetyl and carbon dioxide on spoilage microflora in ground beef. *J. Appl. Bact.* 65, 523-527.
72. 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.
73. Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. University of Helsinki. Ph, Tesis. Helsinki.

Páginas de Internet consultadas:

<http://www.sagarpa.gob.mx>. Sistema de Información Estadística y Pesquera, SAGARPA., Diciembre 2005.

<http://www.inegi.gob.mx>. Indicadores de la encuesta industrial. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. (INEGI)., Enero 2006.