



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ELABORACIÓN DE QUESO TIPO DE BOLA MEDIANTE LA  
INCORPORACIÓN DE SUERO LÁCTEO FERMENTADO  
COMO CULTIVO INICIADOR”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**HUGO RAMÍREZ ARAUJO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ELABORACIÓN DE QUESO TIPO DE BOLA MEDIANTE LA  
INCORPORACIÓN DE SUERO LÁCTEO FERMENTADO  
COMO CULTIVO INICIADOR”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**HUGO RAMÍREZ ARAUJO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA**

**SINODALES**

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA** \_\_\_\_\_  
DIRECTOR

**Dr. GERARDO MANUEL NAVA MORALES** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**M. en C. MEYLI CLAUDIA ESCOBAR RAMÍREZ** \_\_\_\_\_  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Leche	1
1.1.1 Microbiología de la leche cruda	3
1.2 Queso	8
1.2.1 Proceso general de elaboración del queso	9
1.2.2 Tipos de quesos	13
1.2.2.1 Quesos tradicionales	14
1.2.2.1.1 Queso de Bola de Ocosingo	18
1.2.3 Microbiología de los quesos	21
1.2.3.1 Cultivos iniciadores: bacterias ácido lácticas	24
1.2.3.2 Bacterias ácido lácticas no iniciadoras	29
1.3 Estudio de poblaciones microbianas en alimentos	31
1.3.1 Análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA)	32
2. OBJETIVOS	34
2.1 General	34
2.2 Específicos	34
3. METODOLOGÍA	35
3.1 Materiales	35
3.1.1 Equipo	35
3.1.2 Material general	35
3.1.3 Reactivos	36
3.2 Métodos	37
3.2.1 Preparación del cultivo iniciador	37
3.2.2 Elaboración de queso tipo de Bola	39

3.2.2.1	Preparación de inóculo	39
3.2.2.2	Análisis de la leche utilizada para la fabricación de queso tipo de Bola	39
3.2.2.3	Proceso tecnológico del queso tipo de Bola	40
3.2.3	Caracterización Microbiológica del queso tipo de Bola	42
3.2.4	Análisis molecular	42
3.2.4.1	Extracción de ADN	43
3.2.4.2	Pureza de ADN	44
3.2.4.3	PCR-RISA	45
3.2.5	Evaluación sensorial	46
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	49
4.1	Preparación del cultivo iniciador	49
4.2	Elaboración de queso tipo de Bola	51
4.2.1	Análisis de la leche utilizada para la fabricación de queso tipo de Bola	51
4.2.2	Proceso tecnológico del queso tipo de Bola	52
4.3	Caracterización microbiológica del queso tipo de Bola	54
4.4	Análisis molecular	60
4.5	Evaluación sensorial	65
5.	CONCLUSIONES	67
6.	REFERENCIAS	69
7.	ANEXOS	77

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición básica de la leche de algunas razas de ganado especializado en porcentaje en peso.	3
2	Clasificación de quesos conforme a la norma A6 del Codex Alimentarius según consistencia, contenido de grasa y maduración.	14
3	Principales géneros de bacterias utilizados como cultivos lácticos.	26
4	Proporción de suero y leche UHT empleados durante la estandarización del inóculo del queso tipo de Bola.	38
5	Descripción de las muestras analizadas por PCR-RISA.	43
6	Formato de encuesta para la selección de panelistas.	46
7	Formato de encuesta para la prueba Dúo-Trío aplicada.	47
8	Características fisicoquímicas de la leche utilizada en la elaboración de queso tipo de Bola.	52
9	Contenido de microorganismos indicadores en el inóculo y en el queso tipo de Bola a los 0 y 50 días de maduración.	56
10	Pureza del ADN extraído de muestras lácteas.	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Composición de la grasa de leche.	2
2	Composición de una micela de caseína.	2
3	Queso de Bola de Ocosingo.	19
4	Organización estructural de genes de ARN ribosomal en bacterias.	33
5	Evolución del pH del suero de leche obtenido durante varios ciclos de fermentación.	50
6	Evolución de la acidez del suero de leche obtenido durante varios ciclos de fermentación.	50
7	Contenido de microorganismos indicadores a los 0 y 50 días de maduración del queso tipo de Bola elaborado con leche pasteurizada y la adición de un cultivo iniciador estandarizado.	57
8	Perfil de RISA de muestras de suero, inóculo y queso provenientes del proceso de producción de Queso tipo de Bola.	63
9	Perfiles RISA de comunidades bacterianas de muestras de queso de Bola por temporada.	64

## RESUMEN

Los quesos artesanales mexicanos son una riqueza cultural del país, en los últimos años los consumidores se han interesado en ellos principalmente por sus características sensoriales peculiares, que son el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos presentes en la leche cruda con que son elaborados. El uso de leche no pasteurizada trae consecuencias indeseables sobre la calidad de los productos, las principales son la falta de homogeneidad entre los lotes y la posible presencia de microorganismos patógenos que pongan en riesgo la salud de los consumidores. El queso de Bola de Ocosingo, Chiapas, se elabora con leche cruda y no se agrega cultivo iniciador alguno. El objetivo de este trabajo fue elaborar queso tipo de Bola de corta maduración mediante un proceso semi-tecnificado que emplea leche pasteurizada y la incorporación de suero lácteo fermentado como cultivo iniciador. El suero provino de la adición de cuajada de queso de Bola de Ocosingo a leche ultrapasteurizada y posteriores ciclos de fermentación hasta alcanzar la estabilidad del pH y la acidez. Una vez elaborado el queso, se realizó la cuantificación de los grupos de microorganismos indicadores (bacterias ácido lácticas, bacterias mesófilas aerobias, organismos coliformes totales, hongos y levaduras). El contenido de bacterias ácido lácticas, bacterias mesófilas aerobias, hongos/levaduras en el día 0 de maduración de maduración fue de 6.38, 5.68, 3.87 Log UFC/g respectivamente, y permanecieron constantes a lo largo de la maduración; no se detectó la presencia de coliformes totales. También se realizó la extracción de ADN de diferentes muestras lácteas del proceso de elaboración del queso y de su maduración. Se realizó un análisis molecular de poblaciones microbianas presentes en cada muestra, estas se determinaron mediante el análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA, por sus siglas en inglés). Se observó la conservación de dos bandas características que se asocian con *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (320 pb) y *S. thermophilus* (380 pb). Se realizó un análisis sensorial usando la prueba Dúo-Trío, donde se encontró que si hay diferencia significativa del sabor entre el queso tipo de Bola elaborado en la UAQ y el queso de Bola de Ocosingo ( $\alpha=0.05$ ).

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Leche

La NOM-121-SSA1-1994 define la leche para consumo humano, como el producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, o de otras especies animales. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro. Desde el punto de vista tecnológico la leche es un sistema fluido muy complejo formado por tres subsistemas fisicoquímicos bien definidos: una solución verdadera, una emulsión aceite-agua y una suspensión coloidal proteica (Villegas y Santos, 2009). La leche tiene una naturaleza mutifísica y para transformarla en sus derivados a menudo se debe operar sobre las fases que la componen, con el fin de alterarlas o separarlas; tal es el caso de la obtención de crema, queso y mantequilla (Villegas, 2004). Las tres fases de la leche incluyen varios componentes:

- Fase acuosa (solución): contiene agua, lactosa, sales minerales (fosfatos), iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , etc.), vitaminas hidrosolubles, componentes orgánicos solubles (urea, aminoácidos), elementos metálicos traza (Co, Mo, etc.).
- Fase grasa: se halla compuesta por partículas más o menos esferoidales, con un diámetro muy frecuente de alrededor de 2.5-3.0  $\mu\text{m}$ , constituidas por lípidos, básicamente triglicéridos, fosfolípidos, mono y diglicéridos, esteroides y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (Figura 1).
- Fase de suspensión coloidal proteica: esta comprende las micelas de caseína, que son corpúsculos más o menos esferoidales compuestos por estas proteínas (caseínas), las micelas contienen fósforo, calcio y magnesio (Figura 2). La mayor parte de las caseínas se hayan en forma de micelas (Villegas y Santos, 2009).

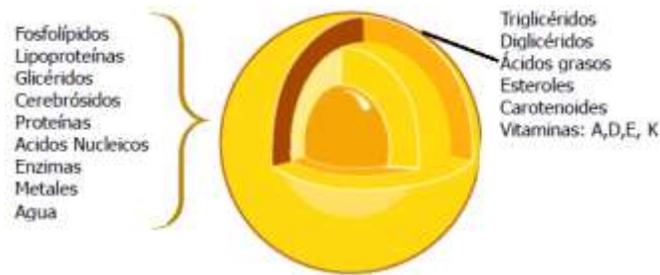


Figura 1. Composición de la grasa de leche (Bylund y López, 2007).

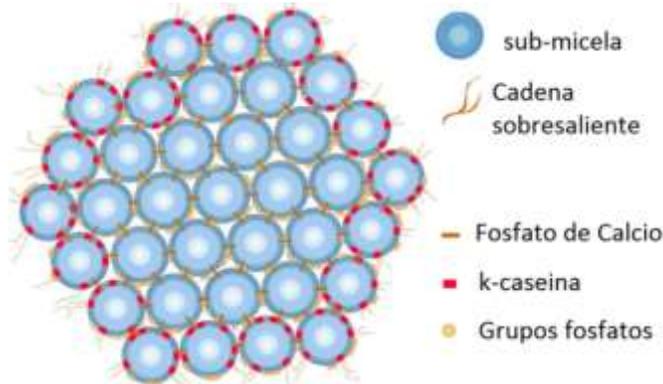


Figura 2. Composición de una micela de caseína (Bylund y López, 2007).

Como se observa en el Cuadro 1, la cantidad y composición de la leche que produce una vaca presenta variaciones importantes; esto trae como consecuencia que no todas las leches tengan las propiedades ideales para la elaboración de quesos y mantequillas ni el valor nutritivo. Los factores principales por los que se presentan estas variaciones son: ciclo de lactación, presencia de calostro, influencia de la alimentación, de los factores climáticos, de la ordeña, raza, etc. En México, la mayor parte de la leche que se comercializa proviene del sistema estabulado intensivo que explota la raza Holstein (Santos, 2007).

Cuadro 1. Composición básica de la leche de algunas razas de ganado especializado en porcentaje en peso (Villegas, 2004).

Raza	Agua (%)	Sólidos totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Lactosa (%)	Cenizas (%)
Holstein	87.72	12.28	3.41	4.32	4.87	0.68
Jersey	85.47	14.53	5.05	3.78	5.0	0.70
Pardo suizo	86.87	13.13	3.85	3.48	5.08	0.72
Guernsey	85.35	14.65	5.05	3.90	4.96	0.74
Ayrshire	86.97	13.03	4.04	3.51	4.81	0.68
Shorthorn	87.43	12.57	3.63	3.32	4.89	0.73

### 1.1.1 Microbiología de la leche cruda

La leche contiene una gran variedad de microorganismos, ya que constituye un medio nutritivo adecuado para su crecimiento; el contenido microbiano de la leche tiene dos orígenes: mamario y externo (Santos, 2007). La calidad microbiológica de la leche y productos lácteos está influenciada por la flora inicial de la leche cruda y las condiciones de procesamiento (Pouch e Ito, 2001). La leche contiene pocas bacterias al extraerla de la ubre de una vaca sana, pero se puede contaminar a partir del animal, especialmente de las zonas externas de la ubre y áreas próximas, del medio ambiente, desde el estiércol y el suelo, así como del lecho en el que descansan los animales y a través del polvo, aire, agua e insectos. Probablemente las dos fuentes de contaminación más significativas sean el equipo y utensilios utilizados para su obtención y recolección, así como las superficies que entran en contacto con la leche, incluidas las manos de los ordeñadores y demás personal (Torres y Castillo, 2006).

La presencia de microbiota activa determina la perecibilidad y la alterabilidad, dos de las principales propiedades de la leche. De manera general, los microorganismos de la leche están involucrados en:

- La conservación de la leche fluida, cruda o pasteurizada, y los productos derivados de ella; determinan, pues, su vida de anaquel.
- La transmisión de enfermedades a los consumidores; este riesgo se incrementa si la leche es cruda.
- La impartición de características sensoriales deseables en los productos derivados (por ejemplo leches fermentadas, quesos, cremas, etc.)
- La transformación de la leche en derivados, con diferente grado y tipo de fermentación, por ejemplo quesos y leches fermentadas (Villegas, 2004).

El desarrollo microbiano en la leche ocasiona una serie de modificaciones químicas que pueden dar lugar a procesos alternativos y útiles. Muchos de sus componentes pueden degradarse, pero las alteraciones más importantes resultan de la degradación de los tres fundamentales: lactosa, proteínas y grasa (Torres y Castillo, 2006). Los microorganismos autóctonos de la leche pueden alterar sus componentes, lo que trae como resultado el deterioro de las propiedades sensoriales, la pérdida del valor mercantil y el acortamiento de la vida de anaquel de los productos lácteos. Las bacterias más comunes de la leche cruda, consideradas como microbiota nativa pertenecen a los géneros *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium* y la familia de las Enterobacterias (Villegas y Santos, 2009). Los tipos de deterioro más frecuentes en leche cruda son: fermentación, coagulación dulce, producción de gas, proteólisis, leche filante o viscosa, alteración de las grasas, sabores y aromas anormales y modificaciones del color (Fernández, 2008).

La microbiota que forma parte de la leche cruda es normalmente heterogénea. Algunos de estos microorganismos, especialmente las bacterias ácido lácticas (BAL), son benéficas al impartir características organolépticas a la leche y a los productos lácteos, además que juegan un papel importante en el proceso tecnológico de su elaboración. Todavía en algunos quesos artesanales, las BAL autóctonas son las responsables de la producción de acidez pero en la mayoría de

los casos, se emplean cultivos iniciadores selectos para esta tarea. La fermentación de la leche no solo conserva nutrientes vitales, también modifica ciertos constituyentes que realzan su estado funcional y nutricional (Chandan y Kilara, 2011). La acción de los microorganismos sobre el sustrato se traduce en las diferentes fermentaciones de la leche y de la pasta del queso: sacarolítica (fermentación de la lactosa), proteolítica, lipolítica y otras específicas, por ejemplo cítrica (Villegas, 2004). Sin embargo, algunos miembros de estas comunidades complejas pueden ser responsables de los defectos de los quesos o son constituyentes de riesgos a la salud (Delbes y col., 2007).

De entre los grandes grupos de microorganismos existentes en la naturaleza, solamente las bacterias, las levaduras y los hongos desempeñan una función relevante en la tecnología de la leche. Las bacterias son el grupo de microorganismos más importantes presentes en la leche, entre las familias de bacterias presentes tenemos las siguientes (se muestran los géneros y especies que tienen importancia en leche):

- Familia Pseudomonadaceae:
  - *Pseudomonas*: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophilia*, *P. cepacia*, *P. fragi*, *P. putrefaciens*.
  - *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*.
- Familia Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia* y *Erwinia*.
- Familia Vibrionaceae: *Aeromonas*, *Flavobacterium* y *Chromobacterium*.
- Familia Neisseriaceae: *Moraxella* y *Acinetobacter*.
- Familia *Micrococcus*:
  - Género *Micrococcus*: *M. luteus*, *M. varians*.
  - Género *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*.
- Familia Streptococcaceae:

- Género *Streptococcus*: *S. pyogenes*, *S. equisimilis*, *S. zooepidermicus*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. acidominimus*, *S. bovis*, *S. thermophilus*, *S. faecalis*, *S. uberis*, *S. lactis*, *S. lactis* sub-especie *diacetylactis*, *S. cremoris*.
- Género *Leuconostoc*: *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. paramesenteroides*, *L. lactis*, *L. cremoris*.
- Familia Bacillaceae:
  - Género *Bacillus*: *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*
  - Género *Clostridium*: *C. thermosaccharolyticum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*.
- Familia Lactobacillaceae:
  - Género *Lactobacillus*: sobresalen las especies, *Lb. lactis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. jugurti*.
  - Género *Listeria*: sobresale la especie, *L. monocytogenes*.
- Grupo de bacterias Corineformes: *Corynebacterium* (*C. pyogenes* y *C. bovis*), *Arthrobacter*, *Micobacterium*, *Cellulomonas* y *Kurthia*.
- Familia Propionibacteriaceae: *Propionibacterium* (*P. freundenreichii* sub-especie *shermanii*).
- Familia Mycobacteriaceae: *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) (Robinson, 1987).

Las levaduras existen en la leche cruda, sobre todo aquella producida en malas condiciones higiénicas, también se les encuentra en las cortezas de quesos en proceso de maduración y en la pasta de quesos frescos. En diversos productos lácteos las levaduras pueden provocar fermentaciones gaseosas y sabores indeseables, estas se presentan normalmente en las cuajadas frescas de quesería, normalmente asociadas a *Torulopsis sphaerica* (Robinson, 1987). En la leche suelen encontrarse levaduras no esporulantes que pertenecen al género *Candida*, estas producen gas y poco o nada de alcohol. También pueden encontrarse levaduras, como *Sacharomyces fragilis*, *Sacharomyces lactis*, *Sacharomyces cerevisiae* que fermentan la lactosa, con producción de alcohol (Alaís, 1998).

Los hongos no tienen importancia práctica en la leche líquida; pero la tienen y en alto grado en la mayor parte de los productos lácteos, se desarrollan en la superficie y en las partes en contacto con el aire (Alaís, 1998). Constituyen una microbiota invasora de la corteza, y en ocasiones del cuerpo de quesos semiduros y duros, madurados prolongadamente. Sin embargo constituyen una microbiota deseable para la elaboración de quesos como el Camembert y de pasta de venas verde-azules como lo son el Roquefort y Cabrales (Villegas, 2004). Los hongos y levaduras se destruyen fácilmente por la pasteurización. Las especies de hongos relacionados a la leche son: *Geotrichum candidum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Sporendonema sebi*, *Penicillium roquefortii*, *Penicillium casei*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseicola*, *Rhizopus stolonifer* (Robinson, 1987).

La leche cruda y los productos lácteos fabricados con ella, al igual que los sometidos a un proceso de saneamiento, pueden contener microorganismos causantes de enfermedad para el hombre, entre los que se incluyen *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* spp. y *Yersinia enterocolítica*. La leche cruda puede contener patógenos como consecuencia directa de infecciones en la ubre; entre los microorganismos causantes de mastitis más comúnmente se encuentran: *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* y *E. coli* y con menor frecuencia cabe mencionar: *Leptospira* spp., *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia* spp., *Cryptococcus neoformans* y *Actinomyces* spp. (Torres y Castillo, 2006). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) realizó un estudio sobre la frecuencia de productos lácteos como vehículo de brotes en este país de 1993 a 2006, se reportaron 121 brotes relacionados a productos lácteos, de los cuales un 60% (73 brotes) se asociaron al consumo de productos elaborados con leche no pasteurizada. En los 121 brotes se reportaron 4413 enfermos, de los cuales 1571 casos (36%) se atribuyeron al consumo de productos lácteos no pasteurizados, donde se reportaron 202 hospitalizaciones, y 2 muertes, en contraste con los brotes atribuidos al consumo de productos lácteos pasteurizados donde se reportaron 37 hospitalizaciones y una muerte. De los 121

brotos reportados asociados a productos lácteos, en 65 (54%) está implicado el queso como vehículo y en 56 (46%) lo fue la leche fluida. De los 65 brotes donde el queso fue el vehículo, en 27 (42%) se involucraron quesos hechos con leche no pasteurizada y de los 56 brotes donde la leche fluida fue el vehículo, en 46 (82%) la leche no se pasteurizó. Un total de 55 brotes (75%) ocurrieron en 21 Estados que permiten la venta de productos no pasteurizados. En cambio, Estados que restringen la venta de productos no pasteurizados muestran una baja incidencia de brotes asociados a estos productos. Los microorganismos implicados en los brotes asociados al consumo de productos lácteos no pasteurizados se identificaron. Todos fueron causados por bacterias: 40 brotes (55%) fueron provocados por *Campylobacter* spp., 16 (22%) por *Salmonella* spp., 9 (13%) por la toxina Shiga producida por *E. coli*, 3 (4%) por *Brucella* spp., 3 (4%) por *Listeria* spp. y 2 (3%) por *Shigella* spp. (Langer y col., 2012).

## 1.2 Queso

Los quesos son productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, hongos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado (SSA NOM-121-SSA1-1994). El queso básicamente está compuesto por caseína, grasa, sales solubles e insolubles, agua, lactosa y albúmina. Desde el punto de vista nutricional, se considera que posee gran valor alimenticio por su contenido de proteínas, grasa, calcio, fósforo y vitaminas (Hernández, 2003).

### 1.2.1 Proceso general de elaboración del queso

En México, el queso que se consume es producido con leche de vaca, aunque se puede encontrar una pequeña cantidad de queso de cabra y oveja preparado en forma artesanal. En el mundo se producen cientos de variedades de quesos, las características en que difieren unas de otras así como las que existen dentro de una misma variedad son el resultado de las modificaciones practicadas en una o más de las diversas etapas básicas de la fabricación del queso. Estas etapas básicas son (Villegas, 2004):

- Recepción de la leche: implica la medición volumétrica, el muestreo, y la admisión de la leche en la quesería. La leche se somete a pruebas rápidas de calidad tales como la acidez titulable, densidad, estabilidad del alcohol al 68%, punto crioscópico, se detecta la presencia de inhibidores, recuento de células somáticas, cuenta total microbiana, porcentaje de grasa, sólidos totales, ausencia de materia extraña, color característico, etc.
- Pretratamiento de la leche para quesería: se somete a filtración para retirar impurezas, luego se somete a clarificación para eliminar partículas extrañas (clarificadora), en queserías grandes la leche clarificada se enfría con un intercambiador de placas, la leche se estandariza (se ajusta la proporción de caseína respecto a la de grasa), esto para lograr un queso de características sensoriales uniformes, y lograr una composición más o menos constante del queso elaborado. La pasteurización se puede realizar por varios métodos, en las plantas queseras grandes se usa el método HTST (73°C/15 s) debido a los grandes volúmenes que se manejan. En las queserías pequeñas y medianas se suele utilizar el método de pasteurización lenta (63°C/30 min).
- Incorporación de aditivos: se añade cloruro de calcio cuya función es restituir el calcio inmovilizado por la pasteurización, se utiliza una dosis de 10-20 g por cada 100 litros de leche. A algunos quesos se les adiciona el colorante achiote que nivela la concentración de carotenos en la pasta del queso.

- Fijación de la temperatura de cuajado: la temperatura de cuajado es un factor clave en el cuajado enzimático, con cuajo de renina, la temperatura óptima de la enzima es del orden de 40 a 42°C, en la práctica quesera es común cuajar entre 28 y 35°C; la temperatura afecta la velocidad de cuajado y las propiedades reológicas de la cuajada.
- Incorporación del cultivo láctico: esta etapa tiene como finalidad producir ácido láctico para acidificar la leche, y con ello favorecer la coagulación de la leche cuando se adiciona la renina e influye en la textura, el aroma y la vida útil de los quesos. El cultivo iniciador que se agrega depende del tipo de queso que se va a elaborar.
- Maduración de la leche: después de inocular, es conveniente dejar la leche en reposo (entre 20-60 minutos), con el fin de que las células bacterianas inoculadas se adapten a su nuevo ambiente, de esta forma las células que se encontraban en estado de latencia, se hidratan gradualmente y vuelven a manifestar sus funciones vitales, expresadas como actividad metabólica.
- El cuajado de la leche: la coagulación de la leche por vía enzimática se realiza incorporando “un cuajo” a la leche ya preparada, a la temperatura pertinente. Se suele utilizar cuajo líquido (de renina, pepsina-renina o microbiano) o en pastilla. El cuajo líquido es el más utilizado, se vende según su “fuerza” o capacidad de cuajado, así el cuajo de renina o pepsina-renina más común en México se expende con una fuerza o título de 1 a 10000 (1/10000), esto significa que con una leche “estándar” de vaca, a una temperatura de referencia, un mililitro de cuajo puede coagular 10000 mL de leche en 40 min.
- Cortado de gel: en un lapso que puede oscilar entre unos 15 min. y varias horas, la leche se transforma en un gel, debido a la interacción entre las micelas de caseína. El cortado del gel tiene el propósito de aumentar la superficie de exudación y favorecer la eliminación del suero. En la práctica quesera la división del coágulo no solamente se realiza por cortado, sino también por “quebrado” del gel, utilizando una espada o una pala de madera, tal y como se hace en la quesería tradicional mexicana. Sin embargo, lo recomendable, es cortar la cuajada con liras, el tamaño de apertura entre los

alambres de la lira es muy importante porque afecta el grado de humedad de la masa y la velocidad y grado de acidificación de la misma, esas dos propiedades son determinantes en las características sensoriales del producto.

- Asentado del grano: después del cortado, la cuajada fraccionada tiende a contraerse rápidamente liberando suero, los granos tiende a sedimentar en el fondo de la tina, además que muestran adhesividad entre sí. En la práctica, el asentado de la cuajada, tiene por objetivo que las partículas de gel, por sí mismas, empiecen a sinerizar para que comience a darse el amacizamiento de cada grano y de la cuajada como un todo.
- Trabajo y tratamiento del grano: tras el asentado del gel cortado, las partículas, tendientes a cohesionarse, son resuspendidas en todo el cuerpo del suero por medio de agitación suave impartida por dispositivos mecánicos (rastrillos, agitadores mecánicos o manuales, palas de madera, etc.), con el fin de que se individualicen, sufran sinéresis y expulsen suero desde su interior y tomen consistencia dura. El trabajo de grano, por su intensidad mecánica, se realiza en tres etapas, aumentando la intensidad de la agitación gradualmente para no dañar los granos que son muy blandos en un inicio. El tiempo de trabajo del grano depende del nivel de secado de la pasta, el cual esta en función del tipo de queso que se elabore.
- Desuerado de la cuajada: para proceder a realizarlo es necesario juzgar si el grano ya perdió suficiente suero y tiene la consistencia o textura tal que permita integrarse en una masa cohesionada, de cierta humedad, que favorezca la actividad enzimática y microbiana determinante de sus características fisicoquímicas y sensoriales *sui generis*.
- Bloqueo y manejo de bloques de cuajada en tina: una vez estimado el punto correcto de madurez del grano, éste se deja sedimentar o asentar para que forme un gran bloque en el fondo de la tina. Según lo requiera el queso que ha de fabricarse, de acuerdo con la humedad normal de su pasta, será el tiempo de manejo de los bloques de cuajada y la intensidad de desuerado de los mismos.

- Picado o molido de la pasta: el propósito es fragmentar la pasta ya escurrida, más o menos texturizada, según el tipo de queso, con el fin de facilitar el salado. En función de la consistencia de la pasta es que se efectuará un picado, molido o desmenuzado.
- Salado de la pasta: el salado del queso, cumple con los propósitos, de impartir cualidades de sabor, que lo hacen atractivo sensorialmente e inhibir o retardar el desarrollo de microorganismos indeseables. Existen varios métodos para salar el queso:
  - Por incorporación y mezclado de la sal en la pasta previamente picada, molido, desmenuzada; esto es, salado en masa.
  - Por inmersión de las piezas ya formadas en una salmuera con una concentración salina de 20%.
  - Por frotación de la superficie con sal fina.
  - Por un método mixto de los métodos anteriores.
- Moldeado: está operación cumple varios objetivos en la hechura del queso, entre ellos impartir forma a la cuajada, permitir el prensado y contribuir a la imagen del producto, con base en su forma típica. La forma, el tamaño y el peso no son rasgos banales del producto, ya que ejercen cierta influencia en su estabilidad, maduración y vida de anaquel. De acuerdo con el tipo de queso que va a elaborarse son los moldes, dependiendo de la cantidad de pasta para ser contenida en ellos, sus características de textura, si la pasta será o no prensada, etc.
- Prensado: el prensado de la pasta del queso busca cubrir algunos objetivos, entre ellos, dar forma a las piezas de queso, expulsar el suero intersticial que se halla clouido entre los granos discretos de cuajada moldeada, impartirle a la pasta una estructura lo más uniforme posible y formar una “corteza resistente” (esto en quesos de pasta semidura o dura). También existen tipos de quesos en los que la pasta no se prensa, sino que por su propio peso sufren una especie de autoprensado, ya sea en el molde o en una bolsa de tela permeable.

- Oreado: luego del prensado, el desmoldado y el retiro de los rebordes de las piezas de algunos quesos de pasta semidura y dura, se someten por un lapso corto a oreado, a temperatura ambiente (15 a 25°C) y humedad relativa media.
- Maduración: consiste en la transformación de la caseína y de la materia grasa, a través de procesos enzimáticos, que conducen a modificaciones de su calidad fisicoquímica y sensorial, haciéndose más atractivos para los consumidores. Según su naturaleza, los quesos requieren condiciones especiales de ambiente. En general, las condiciones de la pasta del queso y las del ambiente se combinan e influyen sobre la velocidad de maduración, y en consecuencia en el tiempo requerido.
- Conservación: una vez maduros los quesos, estos deben colocarse en un ambiente tal que mantengan sus características óptimas de calidad. La mejor manera de hacerlo es mantener el producto en refrigeración (2 a 4°C), con buen nivel de humedad relativa en el ambiente (Villegas, 2004).

### 1.2.2 Tipos de quesos

Se conocen en todo el mundo más de dos mil nombres de quesos; sin embargo, en realidad, hay menos de 50 tipos diferentes. Los distintos nombres que se les asignan a los quesos dependen del lugar de fabricación, de ligeras modificaciones en el proceso de elaboración o, incluso, de la presentación de los quesos (tamaño, forma) y del método de conservación (Hernández, 2003).

Una clasificación muy general se fundamenta en si los quesos, después de ser obtenidos, han sido sometidos o no a un proceso de fermentación (maduración) con microorganismos. En esta clasificación, se denominan quesos madurados y quesos frescos. Otra clasificación general se realiza de acuerdo con la textura de los quesos y los agrupa en: duros o de pasta dura, semiduros y suaves o de pasta blanda. La dureza del queso depende principalmente de su contenido de agua. En los diferentes quesos duros, el contenido de agua oscila entre un 13 y un 34%, mientras que, en los quesos suaves, el contenido de agua puede ser hasta de un 60%. Estos dos criterios de clasificación además del porcentaje de grasa en el

extracto seco, se pueden observar en el Cuadro 2. Otro tipo de clasificación está dada por los sistemas de producción empleados: artesanales, industriales tradicionales y nuevas tecnologías (Hernández, 2003).

Cuadro 2. Clasificación de quesos conforme a la norma A6 del Codex Alimentarius según consistencia, contenido de grasa y maduración [%HSMG= humedad del queso desgrasado, GES= grasa en el extracto seco] (FAO, 2000).

%HSMG	Designación	%GES	Designación	Designación según características de maduración
< 51	Extraduro	> 60	Extragraso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Madurado: en superficie o en toda la masa</li> <li>• Madurado por mohos: en superficie o en toda la masa</li> <li>• No madurado / fresco</li> <li>• En salmuera</li> </ul>
49-56	Duro	45-60	Graso	
54-69	Semiduro	25-45	Semigraso	
> 67	Blando	< 10	Desnatado	

#### 1.2.2.1 Quesos tradicionales

Se define actividad artesanal como “actividad realizada manualmente en forma individual, familiar o comunitaria, que tiene por objeto transformar productos o sustancias orgánicas e inorgánicas en artículos nuevos, donde la creatividad personal y la mano de obra constituyen factores predominantes que les imprimen características culturales, folklóricas o utilitarias, originarias de una región determinada, mediante la aplicación de técnicas, herramientas o procedimientos transmitidos generacionalmente”. Esa definición insiste en el carácter manual y las habilidades de la mano de obra, adquiridas principalmente por experiencia. Un queso tradicional debe ser reconocido por la población local, considerada como “garante de su autenticidad”. Es “propiedad cultural de un grupo”, quien genera y posee, de manera colectiva, los sabores específicos a través de los cuales se califica el queso tradicional. Otra condición es que sea un producto “vivo”, cuya producción se inscribe en la historia y la cultura local, pero sobre todo que se siga produciendo. Se hace referencia a quesería informal como aquellas unidades que no cumplen con reglas oficiales y aplican procesos tecnológicos “básicos”,

haciendo uso mínimo de equipos e insumos, y máximo de mano de obra; en otros términos se trata entonces de prácticas meramente artesanales, en el sentido de la importancia de la destreza del trabajador y el carácter relativamente aleatorio de la producción (François, 2011).

Los quesos desarrollados en México, Latinoamérica y el Caribe son referidos como de estilo Hispánico y la mayoría se basan en quesos europeos, pero modificados de acuerdo a las preferencias locales y condiciones de proceso (Van Hekken, 2007). Las empresas queseras más importantes se ubican en el norte y en los estados de Jalisco, Estado de México y Guanajuato, zonas que concentran la mayor parte de la producción de leche. Sin embargo, la producción de queso se ha mantenido también en varias pequeñas cuencas lecheras en todo el país. Existen así algunas regiones, más o menos grandes, especializadas en la producción de queso: Tulancingo en Hidalgo, la región del sur de Tlaxcala-Puebla, la Costa de Chiapas, las colonias menonitas de Chihuahua, la Sierra de Jalmich, etc. (François, 2011). En México se elaboran más de una treintena de tipos diferentes de quesos, la mayor parte artesanales y de difusión regional. Algunos rasgos notables de la agroindustria quesera en México son los siguientes:

- Transforma la materia prima alimentaria más perecedera de todas debido a su alta concentración de microorganismos (a menudo mayor a 500000 células/mL), a su riqueza en nutrientes y a su elevado porcentaje de agua (mayor a 85%).
- Debido a que la producción de leche está fuertemente influida por la estacionalidad, se enfrenta a problemas de volúmenes variables de proceso durante el año lo que provoca escasez y excedentes de leche. Esto influye en la capacidad utilizada en las plantas, mano de obra, mercado de los productos, etc.
- Labora paralelamente a la actividad productora lechera; esto es, intensa y continuamente durante el año ya que las vacas no dejan de producir, al menos a nivel de hato (Villegas, 2004).

En los últimos años en México han emergido grandes agroindustrias lácteas, organizadas según un paradigma industrial y dedicadas a productos estandarizados (leche UHT, algunos tipos de quesos pasteurizados, leche en polvo, y otros). Sin embargo, algunas cuencas lecheras han resistido esos cambios. Pero esa resistencia cada vez es más difícil, la globalización y su modelo de producción y consumo alcanzan día tras día nuevos espacios. Las formas de consumo del queso en México (en general fresco, y mezclado con otro alimento) facilitaron la sustitución de los quesos genuinos por quesos más industriales e insípidos; la pobreza de muchos consumidores, así como la falta de información y de regulación de los mercados hizo el resto. Así, en México como en otras partes del mundo, muchos quesos tradicionales amenazan con desaparecer, o ser apropiados y modificados por industriales y distribuidores. No se trata solamente de la pérdida de unos productos gastronómicos, sino también de sistemas productivos, de estilos de vida que los sustentan y están estrechamente asociados con ellos (François, 2011).

La tradición quesera mexicana está gravemente amenazada ya que además de los quesos importados producidos industrialmente, los quesos genuinos naturales deben elaborarse con leche pura de vaca o cabra y con el empleo mínimo de aditivos como cuajo, colorante, cloruro de calcio o sal. Por otro lado, existen desgraciadamente los llamados “quesos de imitación o rellenos”, los cuales son elaborados usando en parte leche de vaca, y en parte grasa vegetal, o aquellos que ya no utilizan leche fluida como los “quesos análogos” que son producidos utilizando leche en polvo, caseína o caseinatos, y grasa vegetal; y todo esto evidentemente representa un duro golpe para los quesos genuinos, entre otras causas, debido a que los quesos genuinos no pueden competir en un mercado en el que el precio es un aspecto importante que considera el consumidor al momento de adquirir este alimento (Cervantes y col., 2006).

A diferencia de las empresas grandes bien establecidas, las medianas y en mayor grado las pequeñas se enfrentan a problemas de conservación, presentación, heterogeneidad, inocuidad y comercialización del producto. En este tipo de

industria se utilizan técnicas de acidificación por bacterias ácido lácticas autóctonas, presentes en la leche, esto junto con la ausencia de controles de temperatura y pH, hace que la calidad final del producto sea muy variable entre lotes (François, 2011).

Los quesos tropicales se producen a partir de leche cruda, los más conocidos, principalmente a nivel regional son los siguientes: Cotija, Crema Tropical, Quesillo de Sal, de Bola, de Aro, de Cuajada, Ranchero Veracruzano, de Hoja y de Poro. Generalmente estos quesos presentan ciertas características fisicoquímicas y de composición: un pH bajo cercano a 5.0, una concentración elevada de sal (mayor de 4%), una actividad de agua relativamente baja (entre 0.88 y 0.90). En las pequeñas queserías regionales mexicanas, por ejemplo en el trópico, en las que todavía se trabaja con leche cruda caliente y se carece de tecnología, se efectúa un elemental control de calidad apreciando sensorialmente la leche, y constatando su capacidad de rendimiento con la hechura de un “queso de a litro”. Esto es, en función de la cuajada obtenida a partir de ese volumen, según un procedimiento estándar de coagulación del fluido y de manipulación del gel, los queseros artesanales experimentados, aunque a menudo carecen de registros escritos, conocen bien las variaciones estacionales de la leche que trabajan durante el año y, en consecuencia, del rendimiento normal esperado de su materia prima (Villegas, 2004).

Generalmente los quesos tradicionales son de circulación local o regional, tienen como nichos de mercado a consumidores de esos mismos espacios geográficos y, recientemente, a una creciente población de clientes que busca productos de calidad con evocación de lo tradicional y genuino, pero respetando las tradiciones locales y el medio ambiente (Villegas y Cervantes, 2011). Los consumidores están interesados en los quesos tradicionales, debido a su perfil único de sabor y aroma, características que son atribuidas a la actividad metabólica de la flora autóctona de la leche cruda. En contraste, el uso de leche pasteurizada resulta en una producción de menor heterogeneidad y mayor calidad sanitaria; sin embargo,

afecta negativamente la calidad sensorial del queso ya que elimina la microbiota autóctona y se sustituye por un cultivo iniciador comercial, que desafortunadamente confiere características sensoriales muy diferentes.

En México hoy en día ante la falta de normatividad, existen confusiones de las definiciones de quesos genuinos y auténticos, con respecto a sus imitaciones. La legislación Mexicana ha regulado la inocuidad en los productos lácteos, entre ellos los quesos. En el 2010 se publicó la NOM-243-SSA1-2010 que prohíbe su elaboración con leche cruda, lo que afecta directamente a la quesería artesanal mexicana. Uno de los aspectos negativos que se les atribuye a los quesos tradicionales, es que no son totalmente garantes de inocuidad, ya que una buena parte de ellos se elaboran con leche “bronca”, sin pasteurizar. Por lo tanto, se debe pugnar porque en un futuro los quesos mexicanos genuinos se produzcan a través de procesos estandarizados que garanticen inocuidad, pero siempre cuidando de no afectar las características organolépticas propias, que han dado origen a su especificidad (Cervantes y col., 2006). Una opción para asegurar la inocuidad de los quesos tradicionales, es seleccionar cepas lácticas autóctonas y añadirlas como cultivo iniciador a la leche pasteurizada, y así obtener quesos con características similares a los quesos elaborados con leche cruda.

#### 1.2.2.1.1 Queso de Bola de Ocosingo

El queso de Bola, es un producto originario del municipio de Ocosingo, Chiapas, teniendo este aspectos naturales como la altitud, clima, tipo de suelo, pastos, que brindan a la materia prima (leche) características especiales, que le dan al queso un sabor particular (Figura 3) (Villegas y Cervantes, 2011). El queso de Bola, posee características propias que lo diferencian de otros quesos derivados de un proceso artesanal acuñado en esta región (Vázquez y col., 2009). Solamente lo fabrican unos cuantos queseros artesanales cuyo conocimiento técnico ha pasado por tradición oral y práctica de generación en generación (Cervantes y col., 2006). Se estima que la producción anual de queso de Bola en Ocosingo es de entre 215 y 250 toneladas, con una producción mayor en tiempo de lluvias (François, 2011).



Figura 3. Queso de Bola de Ocosingo

Se presenta como una bola dura, con un diámetro entre 8 y 12 cm, y un peso comprendido entre 500 g y 1 kilogramo, aproximadamente (Figura 3). El queso está formado por dos partes: dos forros y el queso interno. El queso interno es un queso de doble crema cuyo periodo de maduración tarda 21 días, aunque varios de los productores producen quesos con mayor tiempo de maduración. Los forros están formados por una corteza dura, realizada con leche descremada con una acidez de 35 °D. A medida que el tiempo transcurre la corteza se va poniendo rígida conservando así el queso interior. Cuando el producto es fresco, por ejemplo de una a dos semanas, tras cortar la corteza con un cuchillo, se halla una pasta relativamente blanca, o amarilla-marfil, blanda, algo ácida, y aromática, de gran riqueza sensorial, que puede ser extraída con una cuchara (Cervantes y col., 2006).

La leche con la que se elabora el queso proviene exclusivamente de ganado propio de la región, estas son de la raza Suizo Europeo, Suizo Americano y Cebuino (que comprende a razas de Cebo Indobrasil, Brahman y Nelore), razas que presentan características particulares para sobrevivir bajo un sistema extensivo y en un terreno demasiado agreste, con típicas condiciones durante el estiaje, las que se manifiestan por la falta de alimento y de agua durante esa temporada. No obstante, durante el temporal de lluvia el ganado se alimenta solo de praderas naturales en donde son pastos nativos de la región de la variedad gramas y es sometido a la ordeña diaria. Este panorama es la razón de la peculiar composición de la leche y, por consecuencia, lo que permite que el queso tenga sus características distintivas. La ordeña en la mayoría de los casos se practica a mano, la leche se colecta en botes lecheros y de ahí se traslada para su venta a aquellos productores que

realizan el queso de Bola. Existen en total nueve productores de queso de Bola, algunos de ellos tienen ranchos en donde ordeñan al animal y ahí mismo producen el queso, otros productores compran la leche para el procesamiento del producto. La leche con la que se elabora el queso contiene alrededor de 3.2% de proteína y el 3.9% de grasa, la proporción de estos componentes propicia la distinción de la calidad sensorial de la leche y por consecuencia del queso (Vázquez y col., 2009).

A continuación se destacan los principales pasos de fabricación del queso de Bola:

- Recepción y colado: la leche cruda dulce, se recibe por la mañana, y se cuela en un lienzo de algodón de trama fina.
- Cuajado y reposado: previamente a la adición de cuajo, se agrega un poco de crema, si el queso será “doble crema”; si no, se tratará de queso crema, simplemente. Luego se agrega una dosis de cuajo líquido y se deja reposar la leche 24 horas.
- Levantado o manteado: al otro día, con un cucharón o pequeño recipiente, cuidadosamente, se coloca la cuajada en una bolsa o manta de algodón.
- Ecurrido: tras incorporar un poco de sal fina a la cuajada, se deja escurrir el suero durante unas horas.
- Salado: después de unas 20-24 horas de escurrido, se sala la cuajada y se cambia la manta.
- Madurado de la pasta: la masa se deja reposar, para que madure, en un lapso de unos ocho días, cambiándole la manta cada tercer día. Durante cada cambio de manta se vuelve a amasar la pasta. También se puede dejar madurar hasta por tres meses.
- Moldeado: porciones de unos 500 g o más se “formatean” compactándolas con las manos, impartiendo una forma casi esférica. Finalmente, las piezas cuasi-esféricas se forran con dos sucesivas capas de cuajada “hilada” y caliente elaborada con leche completamente descremada. Este material, rico en caseína, al enfriarse y orearse, se endurece y funciona como un verdadero empaque protector (Cervantes y col., 2006).

Las etapas del proceso de elaboración que se presentan no abarca toda la variedad de las prácticas de los productores de queso de Bola de Ocosingo. Algunas variantes pueden entrar en un mismo tipo queso de Bola, mientras que para otras, se podría pensar que los cambios son tan importantes que se trata de otro tipo de queso. Algunos queseros afirman que la crema adicionada debe agregarse antes de cuajar, y otros al amasar el queso, después de la etapa de añejamiento, bajo la forma de mantequilla lavada. Otra variante concierne al tamaño, lo más común es un peso de unos 700 g, con 450-500 g de relleno y 200-250 g de forro. Sin embargo, también se preparan presentaciones más pequeñas de 600 g (con 400 g de relleno), 400 g (con 250 g de relleno) y 200 g (130 g de relleno). El tercer elemento de variación es la duración del madurado de la masa, que puede ir desde 15 días hasta un mes (el promedio es de tres semanas), o incluso hasta dos o tres meses, en función de la temperatura y de la humedad, que dependen obviamente de la temporada (François, 2011).

Por lo que concierne a la pasteurización, su aplicación en la elaboración del queso de Bola de Ocosingo genera varias dudas e interrogantes, ya que la eliminación de la microbiota autóctona, impacta fuertemente en la tipicidad del queso. De los nueve productores de queso de Bola, dos pasteurizan la leche utilizada para hacer el relleno. Esa práctica es bastante reciente, y fue impuesta por la Secretaría de Salud a partir de noviembre del 2007 a los productores. Algunos productores se rehúsan a aplicarla, especialmente porque el queso de Bola debe ser añejado (François, 2011).

### 1.2.3 Microbiología de los quesos

En el perfil microbiológico del queso, influyen múltiples factores entre ellos: el empleo de leche cruda o pasteurizada, la presencia o ausencia de la etapa de maduración del queso, las condiciones sanitarias del proceso de elaboración y el almacenamiento del producto final. Son de vital interés aquellos microorganismos relacionados con los patógenos y el deterioro del producto, cabe mencionar coliformes, hongos y levaduras, BAL y bacterias mesófilas aerobias (BMA). Por

ejemplo, los coliformes en los quesos frescos es evidencia de descuidos en la higienización del equipo y malas prácticas de manufactura. La presencia de BAL, aumenta la velocidad de acidificación, resultando en quesos con alta acidez. Si se presentan coliformes u otros organismos fermentadores de lactosa, resultarán en quesos con “ojos” o con sabores indeseables (Robinson, 1987; Villegas, 2004).

Los quesos fabricados con leche no pasteurizada son más probables que sean un vector de enfermedades transmitidas por alimentos (Fox, 2004). El queso elaborado con leche pasteurizada resulta en un producto más uniforme de mejor calidad sanitaria; sin embargo, la pasteurización afecta adversamente su calidad de sabor, ya que elimina microbiota nativa de la leche, la cual es responsable del desarrollo del sabor típico del queso (Torres y col., 2005). La microbiota bacteriana de la leche pasteurizada destinada a la fabricación de queso está compuesta de microorganismos termodúricos que han sobrevivido el tratamiento térmico; entre ellos cabe destacar a corinebacterias, micrococos, enterococos, estreptococos termófilos, lactobacilos y esporulados del género *Bacillus* y *Clostridium*. No obstante, también existe una microbiota contaminante post-pasteurización entre la que puede existir micrococos, ocasionalmente estafilococos coagulasa positivos, coliformes, bacterias ácido lácticas y enterococos. Estos microorganismos proceden de las tuberías, tinas de cuajado y microbiota ambiental (Robinson, 1987).

En comparación con la leche, los quesos soportan el desarrollo de diversos microorganismos que se traduce en deterioro más o menos notable. Ello se debe a su menor contenido acuoso, y en los productos madurados a la reducida o nula concentración de materiales fermentables y el efecto antagónico de los cultivos iniciadores incorporados (Fernández, 2008). Todos los quesos están expuestos a que se produzcan fermentaciones microbianas anormales que originan la alteración y una apariencia física anómala. Los hongos, levaduras y los anaerobios formadores de esporas son los que con mayor frecuencia están implicados en la alteración. El crecimiento de hongos se localiza más a menudo en la superficie de

los quesos y con frecuencia, se propaga al interior del mismo a través de grietas dando lugar a una coloración y una apariencia visual anormales. En muchos quesos es habitual la formación anómala de gas, desarrollándose con mucha frecuencia masivas oquedades internas que hacen que el queso se hinche e incluso llegue a agrietarse, los microorganismos responsables son principalmente *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum*, si se asocia otros clostridia (*C. sporogenes* y *C. lentoputrescens*), el producto además entra en putrefacción (Alaoui y col., 1985). La gasificación también resulta de la actividad de levaduras y de procesos heterofermentativos por BAL y coliformes, los quesos más susceptibles son aquellos con humedad y pH relativamente elevados y bajo contenido salino (Fernández, 2008).

El conocimiento del comportamiento de las bacterias patógenas en los quesos es de interés mayor para el análisis de riesgos de estos alimentos. En contraste con la leche, los factores ecológicos que prevalecen en el ecosistema propio de los quesos no son propicios para una actividad ilimitada de los microorganismos patógenos (Fernández, 2008). El aumento en el consumo y la producción de queso en todo el mundo es directamente proporcional a la preocupación por los aspectos de seguridad relacionados con este producto. Múltiples estudios han reportado la incidencia de patógenos como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *Aeromonas hydrophila*, *S. aureus*, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* (Planzer y col., 2009).

La magnitud del riesgo a la salud por consumo de quesos no es la misma para todas las variedades. La gran diversidad de procesos tecnológicos utilizados en la fabricación de los quesos, da como resultado diversas propiedades físicas, químicas, y cualidades microbiológicas para el producto elaborado y así se pueden crear condiciones ambientales favorables para el desarrollo de patógenos (Planzer y col., 2009). El empleo de leche cruda, la ausencia de maduración, el uso de empaques, y las condiciones sanitarias de manejo del producto antes del empaque y durante la comercialización, son factores contribuyentes. Los brotes más frecuentes tienen como agente etiológico *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Brucella*

*melitensis* y *L. monocytogenes*. Se conocen incidentes de intoxicación por *C. botulinum* y aminas biogénicas. La presencia de aflatoxinas en quesos es un hecho conocido (Fernández, 2008). También pueden estar afectados por la presencia de la verocitoxina (toxina shiga) producida por *E. coli* (VTEC/STEC) (Baylis, 2009).

Buyser y col. (2001) en sus revisiones a reportes de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con productos lácteos, identificaron al queso como un importante vehículo de la enfermedad, y demostraron la capacidad de los patógenos para sobrevivir a las condiciones de procesamiento, con la supervivencia registrada de *S. enteritidis* y *E. coli* O157:H7 en salmuera utilizada en la fabricación de queso. También es necesario considerar que algunos quesos permiten la multiplicación o la supervivencia de los agentes patógenos, debido a su entorno favorable, como lo es un alto pH y alta actividad de agua.

#### 1.2.3.1 Cultivos iniciadores: bacterias ácido lácticas

La calidad de un queso esta determinada por su sabor, propiedades reológicas, y apariencia visual (Carbonell y col., 2002). Las enzimas de la leche, cuajo, cultivos iniciadores, y microbiota secundaria son responsables de la degradación de proteínas, lactosa, citrato y lactato de la leche, resultando en la formación de un alto número de compuestos responsables del sabor. El tipo y concentración de compuestos del sabor confiere a cada variedad de queso sus características únicas (Garde y col., 2002). Los componentes del sabor son producidos a través de glucólisis, lipólisis y proteólisis, seguido por reacciones secundarias que toman lugar durante el madurado del queso (Carbonell y col., 2002).

Un cultivo iniciador es cualquier preparación de microorganismos activos, intencionalmente agregados durante la manufactura del producto para iniciar cambios deseables. Consisten en BAL iniciadoras (SLAB por sus siglas en inglés) principalmente, aunque también son de interés las propionibacterias, bacterias superficiales maduradoras, levaduras y hongos (Marth y Steele, 2001). Las BAL constituye un grupo de bacterias gram positivas con metabolismo fermentativo

(Porcellato y col., 2012). Las BAL, aisladas, seleccionadas y preparadas debidamente se expenden en el comercio como cultivos lácticos, listas para ser inoculados en leche pasteurizada destinada a diferentes derivados. Por su temperatura óptima de multiplicación, la microbiota láctica puede clasificarse en BAL mesofílicas y BAL termofílicas (Villegas y Santos, 2009).

El papel principal de los cultivos iniciadores es la conversión de la lactosa de la leche a ácido láctico, el cual es sustancial para la preservación del producto, además imparte el característico sabor ácido a la cuajada, ayuda a la formación de la cuajada y, al favorecer la concentración de la cuajada y expulsión del suero, contribuye a que el queso adquiera la textura típica (Lortal y Chapot-Chartier, 2005). Los cultivos iniciadores en quesos son usados para modificar las características organolépticas, entre ellas la textura, y características microbiológicas y sensoriales (Aydemir y Dervisoglu, 2010). Los cultivos iniciadores usados en productos lácteos se dividen en mesófilos y termófilos, basados en su temperatura óptima de crecimiento. En el Cuadro 3 se muestran especies de ambos tipos de bacterias que se utilizan como cultivos iniciadores. Los cultivos mesófilos se multiplican entre 15 y 40°C, su temperatura óptima de crecimiento se ubica entre los 30 y 37°C. Los cultivos termófilos tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 40 y 50°C, destacan los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Villegas, 2004).

Los cultivos lácticos se pueden clasificar según los productos naturales de su metabolismo en cultivos acidificantes (homofermentativos principalmente) y aromatizantes (heterofermentativos principalmente). También se pueden clasificar según la pureza del cultivo, en cuanto tipo y número de especies o subespecies:

- De cepa simple. Si solamente contienen una especie, por ejemplo *L. lactis* o *L. helveticus*
- De cepa múltiple. Si contienen bacterias de mismo género, pero de diferente especie o subespecie. Por ejemplo, *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*.

- De cepa mixta. Si presentan una mezcla de diferentes géneros, por ejemplo *S. salivaricus* subsp. *thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Villegas, 2004; Jokovic y col., 2011).

Cuadro 3. Principales géneros de bacterias utilizados como cultivos lácticos (Villegas, 2004).

Tipo de fermentación	Mesófilos	Termófilos
Homofermentativos	<i>Lactobacillus</i>	
	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. lactis</i> <i>Lb. acidophilus</i>
	<i>Streptococcus</i>	
	Estreptococos mesófilos: <i>S. cremoris</i> <i>S. lactis</i> <i>S. diacetylactis</i> Enterococos <i>S. faecalis</i> <i>S. faecium</i> <i>S. durans</i>	Estreptococos termófilos: <i>S. thermophilus</i>
Heterofermentativos	<i>Leuconostoc</i> <i>L. cremoris (citrovorum)</i> <i>L. lactis (paracitrovorum)</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	
	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. fermentum</i>

Existen 11 géneros considerados bacterias ácido lácticas, de las cuales cuatro (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*) son comunes en cultivos iniciadores para lácteos (Marth y Steele, 2001).

*Lactococcus*. Son los microorganismos mayormente usados en producción de ácido en fermentaciones lácteas. De cinco especies reconocidas como *Lactococcus*, solo una, *L. lactis* tiene significancia en fermentaciones lácteas. Entre sus subespecies están: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis*

subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Son cocos usualmente en arreglo de cadena, aunque pueden encontrarse células individuales y en duplas, son homofermentativas, crecen a 10°C pero no a 45°C. Son débilmente proteolíticos (Marth y Steele, 2001).

*Streptococcus*. La única especie útil es *S. thermophilus*, es termotolerante, capaz de crecer a 52°C y fermentar solo un limitado número de carbohidratos. Muchos productos lácteos sometidos a altas temperaturas durante la fermentación (mayor a 40°C) son acidificados por la combinación de *S. thermophilus* y *Lactobacillus* spp (Marth y Steele, 2001).

*Leuconostoc*. Se distingue de otras BAL por ser un coco mesofílico y heterofermentativo. Los empleados en fermentaciones lácteas producen diacétilo, dióxido de carbono y acetoina a partir de citrato. Algunos producen exopolisacáridos a partir de sacarosa. Convierten el exceso de acetaldehído a diacétilo, con lo que se reduce el sabor a pasto. Se emplea combinado con *Lactococcus*. En este género los organismos que se asocian con los cultivos iniciadores son *L. mesenteroides* spp. (antes conocido como *L. cremoris* o *L. citrovorum*), *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, y *L. lactis*. Este género comparte muchas características con los *Lactobacillus* heterofermentativos (Marth y Steele, 2001).

*Lactobacillus*. Este género se divide en tres, basado en los productos finales de fermentación:

- Homofermentativos: fermentan exclusivamente hexosas a ácido láctico. Los empleados en fermentaciones lácticas son: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. acidohylus*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*. Crecen a altas temperaturas (mayores a 45°C).
- Heterofermentativos facultativos: producen solo ácido láctico o ácido acético, etanol y ácido fórmico cuando la glucosa es limitada. Incluye *Lb. casei*, el cual

no suele encontrarse en cultivos iniciadores, pero se agrega con fermentaciones secundarias benéficas durante la maduración de quesos. También se usa *Lb. paracasei*, subsp. *paracasei*, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*.

- Heterofermentativos: fermentan hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono. Pueden causar sabores indeseables y formación de gas en madurado de quesos. Una sola especie *Lb. kéfir* (Marth y Steele, 2001).

Las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides*, *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* son frecuentemente usados individualmente o en combinaciones como bacterias iniciadoras mesofílicas y termofílicas en la producción de queso (Hoier y col., 2010).

Existen cultivos iniciadores naturales y el suero es el cultivo comúnmente usado para producir diferentes variedades de queso. La ecología microbiana de los quesos madurados producidos a partir de leche cruda usando suero fermentado como cultivo iniciador esta basada en una compleja interacción entre SLAB y NSLAB, la cuales están caracterizadas por sus diferentes capacidades para crecer en un substrato cambiante (Gatti y col., 2013).

El suero fermentado utilizado como cultivo iniciador para producir quesos artesanales contiene una microbiota indefinida que se obtiene al conservar el suero drenado durante la elaboración del queso. La temperatura de calentamiento de la cuajada, el gradiente de temperatura durante la fermentación del suero, y el incremento en la acidez, conducen a la selección de una microbiota característica. (Rossetti y col., 2009; Gatti y col., 2011). El cambio en uno o más de estos parámetros puede conducir a un suero iniciador con diferentes características (Santarelli y col., 2008). Sin embargo, esta modalidad de preparación también garantiza la supervivencia de diferentes biotipos que son útiles para el desarrollo de su propio ecosistema: una mezcla de cepas de la misma especie facilita el desarrollo de un iniciador natural con una poca composición definida, pero con una fuerte capacidad de adaptación a condiciones tecnológicas variables, como se

requiere en las operaciones de fabricación no estandarizadas del queso (Gatti y col., 2013).

El cultivo iniciador es uno de los principales factores que determinan la calidad y propiedades del producto final. Cuando las condiciones físicas (tales como temperatura,  $A_w$ , pH) permiten el desarrollo, hay competencias entre las diversas bacterias (Salminen y Wring, 1993). Además, reduce la tasa de crecimiento de las bacterias patógenas y deterioradoras. Por otra parte, participa en el desarrollo de sabor y textura; si la acidez es muy baja, desarrolla malos sabores como amargor, sabor afrutado y sabores rancios. La alta acidez conlleva a obtener quesos de textura frágil y colores jaspeados. Durante la maduración, el cultivo iniciador produce factores para facilitar el crecimiento de organismo no-iniciadores los cuales colectivamente, son responsables del sabor y textura deseables (Chandan y Kilara, 2011). El uso de un apropiado cultivo iniciador comercial puede resultar en un producto de mercado con características estándares (Dervisoglu y col., 2006).

#### 1.2.3.2 Bacterias ácido lácticas no iniciadoras

Los quesos de leche cruda son descritos como poco uniformes, esto puede estar directamente relacionado con la influencia de la microbiota nativa de la leche, su presencia introduce una variabilidad dentro del proceso que esta más allá del control de la fabricación del queso. Al hacer queso de leche cruda, la introducción de una gran diversidad de microorganismos desconocidos y variables generará alta variabilidad de compuestos de sabor (Aydemir y Dervisoglu, 2010).

En años recientes ha habido muchos reportes acerca de la microbiota de diferentes quesos de leche cruda. Estos estudios han mostrado que los quesos tradicionales tienen una compleja y única microbiota predominante por BAL, conocida como BAL no iniciadoras (NSLAB por sus siglas en inglés) (Jokovic y col., 2011). Las NSLAB generalmente no crecen bien en leche, por lo tanto no contribuye a la producción de ácido; sin embargo, son capaces de crecer bajo condiciones selectivas de maduración del queso (Cogan y col., 2007). Durante la maduración de queso, los

organismos iniciadores se autolizan, liberando sustratos de crecimiento y enzimas, permitiendo, un incremento en los niveles de NSLAB (Fitzsimons y col., 1999). Las NSLAB tienden a dominar la microbiota en las etapas de la maduración del queso, en los que pueden llegar a una población de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (Porcellato y col., 2012). Varias investigaciones sugieren que la NSLAB puede contribuir al desarrollo típico o atípico, pero deseable del sabor y a las propiedades organolépticas de quesos (Kolakowski y col., 2012). Las enzimas proteolíticas y lipolíticas de diferentes especies de NSLAB son mejor adaptables a condiciones severas, presentes en el queso (en comparación con las enzimas de las bacterias iniciadoras), donde ellas influyen en el desarrollo de la textura y sabor de el producto final (Jokovic y col., 2011). La NSLAB también puede ser responsable del desarrollo de sabor desagradable y la sobreproducción de  $\text{CO}_2$ , en los quesos (Briggiler y col., 2007).

Las NSLAB no solo se han aislado de quesos tradicionales, los cuales son producidos sin la adición de cultivos iniciadores, sino que también en quesos maduros producidos con leche pasteurizada donde cultivos iniciadores son típicamente usados (Jokovic y col., 2011). La adición intencional de cepas NSLAB seleccionadas como cultivo adjunto se ha aplicado debido a su capacidad para acelerar la proteólisis, para el desarrollo de sabor del queso (Kieronczyk y col., 2003). Aunque ampliamente variable, la mayoría de la población de NSLAB se compone de bacterias del genero *Lactobacillus* (heterofermentativos facultativos o heterofermentativos obligatorios) entre ellas las especies, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermeiituni*, *Lb. buchneri*, *Lb. parabuchiieri*, *Lb. corynifonnis* y *Lb. rhanmosiis*. Es comúnmente conocido que la presencia de la microbiota no iniciadora en los quesos depende de la condición sanitaria del proceso de la leche, y biopelículas microbianas formadas sobre la superficie de los equipos utilizados en el proceso (Kolakowski y col., 2012).

### 1.3 Estudio de poblaciones microbianas en alimentos

La microbiología de alimentos ha tendido a dividir en partes la investigación de los microorganismos, enfocándose en el estudio o la detección de ciertos grupos de microorganismos. Recientemente, se ha visto la necesidad de tomar en cuenta el ecosistema completo, ya que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies. Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en los alimentos se reconoce en la actualidad la importancia de su estudio con un enfoque ecológico. Los conceptos ecológicos constituyen las bases tanto para el control de microorganismos indeseables como para el uso racional de microorganismos en la producción de alimentos (Díaz y Wachter, 2003).

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Éstos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares. La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales (Amann y Kühn, 1998). No es posible obtener cultivos puros de ciertos microorganismos porque dependen de las actividades de otros microorganismos o porque no se conocen las condiciones para su cultivo. En otros casos los microorganismos pierden la capacidad de reproducirse, pero retienen su actividad metabólica (Díaz y Wachter, 2003). Aunque las pruebas bioquímicas siguen siendo hoy día muy importantes en la identificación de los microorganismos, tienen sin embargo, serios inconvenientes (Martín, 2008). Las metodologías clásicas, sólo permiten la enumeración de género microbiano, y raramente a nivel de especie (Giraffa, 2004).

Se dispone de una amplia gama de técnicas para el estudio de las poblaciones microbianas, las cuales pueden dividirse en tres grupos:

- Dependen del cultivo seguido de caracterización fenotípica.
- Dependen de cultivo seguido de caracterización molecular.
- Dependen solo de caracterización molecular (Beresford y col., 2001).

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas debido al uso de métodos moleculares que no requieren el cultivo de microorganismos y al de herramientas usadas en estudios filogenéticos para identificarlos (Díaz y Wachter, 2003). Las técnicas moleculares proporcionan una herramienta sobresaliente para la detección, identificación y caracterización de microorganismos encontrados en muestras ambientales, alimentos y otros ecosistemas complejos (Pogacic y col., 2010).

#### 1.3.1 Análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA)

El análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA por sus siglas en inglés) es un método de análisis de la comunidad microbiana, el cual provee una estimación de la diversidad microbiana y la composición de la comunidad. Esta tecnología no depende del aislamiento bacteriano y no es tan laborioso como la construcción de librerías de clones del gen de la subunidad pequeña del rARN. El método implica la amplificación por PCR de todo el ADN de la comunidad bacteriana de la región intergénica de los genes del ARNr entre las subunidades pequeña (16S rRNA) y la grande (23S rRNA), con primers que tienen como blanco las regiones conservadas de los genes 16S y 23S. La mayoría de las investigaciones están enfocadas a muestras ambientales (Figura 4) (Borneman, 1997).

Los genes que codifican para el rRNA han emergido como el objetivo más prominente en la detección de microorganismos. Su popularidad se debe al hecho de que la región representa una mezcla versátil de segmentos altamente conservados y de moderada a alta variabilidad. Por otra parte, se conocen las secuencias de genes del operón rARN de virtualmente todos los microorganismos de interés sanitario en veterinaria y salud humana (Sachse, 2004).

Debido a su tamaño manejable de aproximadamente 1500 pb, el gen 16S rRNA se ha convertido en la parte del operón mejor caracterizado con más de 33000 secuencias de fuentes bacterianas. Sin embargo, la detección y diferenciación basada en 16S rRNA, puede ser obstaculizado por la heterogeneidad secuencial intraespecies o por homología entre especies relacionadas. Los genes de la unidad grande ribosomal del ARN, el 23S rRNA, ha sido menos usado debido a su mayor tamaño. El número de secuencias disponibles en bases de datos es muy pequeña, comparada con los datos del 16S rRNA. Localizada entre los dos mayores genes ribosomales del ARN, se encuentra la región espaciadora intergénica 16S-23S, se ha convertido en un objetivo alternativo atractivo (Figura 4). Además de su variación en secuencia, es su variación de tamaño la que la hace adecuada para la identificación y diferenciación. La longitud de espaciador se ha encontrado que varía entre 60 pb en *Thermoproteus tenax* y 1529 pb en *Bartonella elizabethae* (Sachse, 2004).

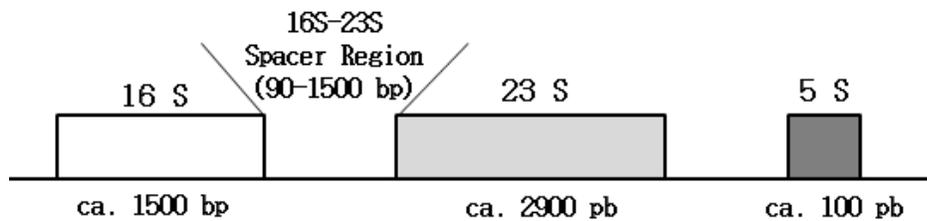


Figura 4. Organización estructural de genes de ARN ribosomal en bacterias (Sachse, 2004).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 General

Elaborar queso tipo de Bola de corta maduración mediante un proceso semi-tecnificado que emplea leche pasteurizada y la incorporación de suero lácteo fermentado como cultivo iniciador.

### 2.2 Específicos

- Elaborar queso tipo de Bola a partir de leche pasteurizada y la adición de suero lácteo fermentado.
- Determinar las poblaciones de microorganismos indicadores en el queso tipo de Bola elaborado.
- Determinar la evolución de las poblaciones microbianas presentes en el queso tipo de Bola mediante la técnica molecular RISA.
- Evaluar sensorialmente el queso tipo de Bola.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Equipo

Analizador de composición de leche, MilkoScan™ FT2

Balanza analítica, Denver Instruments APX-602

Baño termostático, She Lab

Centrifuga Universal, Zentrifuge Z400, Hermle

Equipo de electroforesis, Owl Easycast B2, Thermoscientific

Espectrofotómetro Spectronic Instruments Genesys 2

Fuente de poder para electroforesis, EPS301, GE

Fotodocumentador, Minibis Pro, Bio-Imaging Systems

Incubadora para prueba de antibiótico, Allsheng MiniS

Incubadoras de precisión (22, 30 y 35 °C)

Parrilla eléctrica con agitador magnético

Potenciometro Orion 410 A

Termociclador, Techne TC512

##### 3.1.2 Material general

Asas de vidrio en forma de “L”

Agitador de leche

Bandejas de acero inoxidable

Bolsas de plástico

Bureta

Cajas Petri

Canastos de plástico

Centrifuga descremadora

Coladeras de metal

Costales de tela permeable

Crónometro

Cubeta graduada de 5 L  
Cuchillos  
Espada de 40 cm  
Hielera  
Kit QIAamp® DNA stool  
Lactodensímetro  
Micropipetas  
Manta de cielo  
Matraces Erlenmeyer  
Mazo de madera  
Microtubos 1.5 mL  
Ollas de metal de 40 L y 20 L  
Pipetas graduadas de diferentes volúmenes  
Probeta de 500 mL  
Puntas 0.5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL  
Recipientes de plástico de 0.5 L con rosca y tapa  
Tazones de acero inoxidable  
Termómetro (0-110°C)  
Tubos para PCR 200 µL  
Tubos Eppendorf de 2 mL  
Tubos con tapón de rosca

### 3.1.3 Reactivos

Agar cuenta estándar, BD Bioxon  
Agar Lactobacilli, MRS BD Difco  
Agarosa Ultrapure™, Invitrogen  
Agua libre de nucleasas, Sigma  
Caldo soya tripticaseína, BD Bioxon  
Cloruro de sodio, grado alimenticio  
Cloruro de calcio (líquido)  
Cuajo líquido de fuerza 1:20000, Maphsa

Citrato de sodio, 2%  
Fenolftaleína al 1%  
Hidróxido de Sodio 0.1 N  
Marcador de peso molecular de AND 100pb, Invitrogen  
Peptona de caseína, BD Bioxon  
Tampón TBE 10X Ultrapure™, Invitrogen  
Tampón TE Ultrapure™, Invitrogen  
Tampón de carga 10X, Invotrogen  
Tampón de PCR 10X, Invitrogen  
Solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL)  
Solución stock de dNTP (2.5 µM), Invitrogen  
Solución stock de primers ITSF 100 nmoles (5´-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3´)  
e ITSReub 100 nmoles (5´GCCAAGGCATCCACC-3´), Integrated DNA  
Technologies  
TaKaRa Ex Taq™hotstart versión

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparación del cultivo iniciador

Para la obtención del cultivo iniciador se tomaron 10 g de cuajada previamente congelada de queso de Bola de la fábrica Bulush Bak, localizada en Ocosingo Chiapas. A la cuajada se le adicionaron 20 mL leche entera ultrapasteurizada (UHT, por sus siglas en inglés) comercial a temperatura ambiente, la leche se incubó a 35°C por 24 h, pasado este tiempo se separó el suero de la cuajada, y el suero obtenido se homogeneizó por 1 min mediante un magneto y el agitador de una parilla eléctrica. Una parte del suero (50 mL) se congeló a -20°C para posteriormente llevar a cabo la extracción de ADN. Adicionalmente se congelaron 150 mL de suero a -20°C adicionando glicerol estéril (15 %); transcurridas 24 h en congelación se descongelaron los 150 mL de suero en un baño termorregulador a 37°C y se inocularon nuevamente en leche UHT. Se repitió 25 veces el proceso

descrito previamente; las proporciones de suero y leche UHT empleadas en cada transferencia se especifican en el Cuadro 4.

A partir de la transferencia 5 se midió el pH y la acidez titulable del suero, y se guardó una porción en congelación (-20°C) para posteriormente llevar a cabo el análisis molecular (perfil RISA). Para la determinación de la acidez titulable se siguió la metodología establecida en el apartado 3.2.2.2 Análisis de la leche utilizada para la fabricación de queso tipo de Bola.

Cuadro 4. Proporción de suero y leche UHT empleados durante la estandarización del inóculo del queso tipo de Bola.

Día de transferencia	Cantidad de suero neto inoculado (mL)*	Cantidad de leche entera UHT adicionada (mL)	Día de transferencia	Cantidad de suero neto inoculado (mL*)	Cantidad de leche entera UHT adicionada (mL)
1	25	150	14	40	800
2	30	150	15	45	900
3	20	150	16	50	1000
4	20	150	17	50	1000
5	20	160	18	50	1000
6	20	200	19	50	1000
7	20	250	20	50	1000
8	20	300	21	50	1000
9	20	350	22	50	1000
10	20	400	23	50	1000
11	25	500	24	50	1000
12	30	600	25	50	1000
13	35	700			

\*suero neto: cantidad considerando la cantidad de glicerol presente

### 3.2.2 Elaboración de queso tipo de Bola

#### 3.2.2.1 Preparación del inóculo

Para tener la cantidad suficiente de suero como cultivo iniciador para la fabricación del queso tipo de Bola, se incubaron a 35°C por 48 h 4 L de leche entera UHT con 200 mL de suero neto del cultivo de la transferencia del día 25. Transcurrido el tiempo de incubación se filtró el suero de la cuajada con una coladera metálica, y se homogeneizó por 1 min usando el agitador de una parrilla eléctrica. Se guardaron en congelación a -20°C, 3 L de suero adicionado de glicerol (15%) y por separado otros 50 mL para la posterior extracción de ADN.

#### 3.2.2.2 Análisis de la leche utilizada para la fabricación de queso tipo de Bola

La leche utilizada es una mezcla proveniente de la raza Holstein y Jersey y fue proporcionada por el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal del Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. La leche se analizó dentro del laboratorio de Ciencia de la Leche dentro del CEIEPAA y se determinó su composición (concentración de grasa, lactosa, sólidos totales, agua, sólidos de leche no grasos y proteína) mediante el uso del equipo MilkoScan™ FT2. La determinación de la presencia de antibióticos en la leche se llevó a cabo mediante el equipo Allsheng MiniS.

Para la determinación de la densidad de la leche, se agitó perfectamente el recipiente que contenía la leche, y se colocó dentro de una probeta llenándola hasta el borde, se realizó la medición mediante el uso de un lactodensímetro y se realizó una corrección por temperatura mediante las formulas:

$$\text{Densidad (Ti)} = (\text{LD}+1000)/1000$$

$$\text{Corrección de temperatura: Densidad (15°C)} = \text{densidad (Ti)} + 0.0002 (\text{Ti}-15)$$

Donde LD es la lectura directa del lactodensímetro y Ti es la temperatura inicial (°C)

Para la determinación de la acidez titulable se agitó la leche y se tomó una muestra; el ensayo se llevó a cabo por triplicado. Se tomaron 9 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer y se le adicionaron 3 gotas de fenolftaleína, y se tituló con hidróxido de sodio (0.1 N) hasta que la coloración de la muestra viró a rosa pálido. Se tomó el promedio de los mililitros de NaOH gastados y el resultado se reportó en grados Dornic (°D):

$$^{\circ} D = (\text{mL gastados de NaOH}) (10)$$

### 3.2.2.3 Proceso tecnológico del queso tipo de Bola

Se midió un volumen de 80 L de leche, se coló con manta de cielo para eliminar materia extraña, se vertió en una tina enchaquetada de vapor, y se le adicionaron 4 kg de crema. Se realizó una pasteurización lenta, a 63 °C por 30 min, con agitación constante. La leche se enfrió mediante baño de agua fría hasta una temperatura de 35°C, una vez que se alcanzó esta temperatura, se adicionó el suero (3 L) que sirvió de inóculo, su obtención se describe en la sección 3.2.2.1 Preparación del inóculo. El suero se distribuyó de forma homogénea con la ayuda de un agitador, se dejó reposar por 40 min, se mantuvo la temperatura en 35°C; después de la fermentación se midió la acidez y el pH de la leche. Se añadieron 17.6 mL de cloruro de calcio granular, se agitó para lograr una distribución homogénea en la leche. Se adicionaron 5.33 mL de cuajo (fuerza 1:2000), se disolvió en agua (1:10) y se agitó la leche para una distribución homogénea. La tina se tapó y la leche se dejó reposar por 4 h, se usó la prueba empírica de la cuajada (perforación de la cuajada con un cuchillo, si el cuchillo sale limpio, la cuajada está lista para cortarse) para saber el momento en que está se puede cortar. Se realizaron 4 cortes verticales y 7 horizontales a la cuajada con una espada, y se midió la acidez del suero y la cuajada en este punto. La cuajada se dejó reposar en el suero por 12 h y se midió la acidez del suero después de este reposo.

La cuajada se dejó desuerar en canastos por 1 h, posteriormente se envolvió en costales de tela permeable y se colgó por 1.5 h para que siguiera desuerando. La

cuajada se amasó y se le adicionaron 800 g de sal (se adicionó en 4 porciones) con una distribución homogénea sobre la masa. La masa se dividió en 4 porciones del mismo tamaño aproximadamente y se colocó en un número igual de costales permeables y se colgaron por 5 días. Después de este reposo se cambiaron los costales y se compactó la masa con la ayuda de un mazo de madera, la masa se colgó por 45 días más.

Para la preparación del forro de los quesos se procedió de la siguiente manera: se descremaron 50 L de leche, se dejó reposar hasta tener una acidez de 35°D, luego se pasteurizó a 63°C por 30 min, se enfrió hasta 40°C con un baño de agua fría, se adicionaron 11 g de cloruro de calcio granular con agitación, luego se adicionaron 3.33 mL de cuajo líquido (con fuerza de 1:20000) se diluyó con agua (1:10) y se distribuyó de forma homogénea sobre la leche. La leche se dejó reposar por 40 min, se cortó con lira en cubos de 2 cm. La cuajada se dejó reposar por 5 min y se agitó el grano por 10 min. El grano se depositó sobre canastos de plástico y se dejó desuerar por 1 h, la cuajada se conservó en refrigeración para su uso como forro al siguiente día. La pasta hilada se formó colocando el queso en agua a 95°C por 1 min, posteriormente se extendió sobre una superficie rígida con la ayuda de un mazo de madera. La formación de la pasta hilada, se hizo en el momento en que se usaría como forro, ya que para que tome la consistencia necesaria debe estar caliente.

Después de los 45 días de maduración se eliminó la corteza de cada una de las masas. Una de las bolas tenía presencia de hongos, por lo que se desechó. Las bolas de queso restantes se desboronaron en una tina. El peso total de queso obtenido fue de 3.815 kg, se le adicionó mantequilla (1.908 kg) y se amasó la mezcla hasta obtener una masa con consistencia homogénea. Se formaron quesos en forma de bola con un peso de 250 g, y se forraron con dos capas de la pasta hilada. Los quesos se dejaron reposar en refrigeración por 12 h, para que el forro tomara rigidez. Los quesos se almacenaron durante 15 días en un lugar fresco y limpio a temperatura ambiente (25°C) y se voltearon cada 3 días.

### 3.2.3 Caracterización microbiológica del queso tipo de Bola

El análisis microbiológico se llevó a cabo en muestras del inóculo y del queso a los 0 y 50 días de preparación. Se realizó la cuantificación de microorganismos indicadores (BMA, BAL, coliformes totales, hongos y levaduras). Se pesaron asépticamente 10 g de cada muestra de queso y midieron 10 mL de inóculo, de cada muestra en bolsas de plástico estériles y se agregaron 90 mL del diluyente de peptona estéril (0.1% peptona de caseína) y se homogenizaron mecánicamente en un Stomacher<sup>®</sup>, durante 1 min. A partir de esta suspensión se prepararon series de diluciones decimales necesarias para realizar los recuentos. Después de la incubación correspondiente, se contó el número de colonias por placa, se sacó el promedio de las 3 muestras y se reportó como Log UFC/g para el queso y UFC/mL para el inóculo.

BMA. El recuento se realizó por el método de vaciado en placa en agar cuenta estándar y las placas se incubaron a 35°C por 24 h.

BAL. El recuento se realizó por el método de extensión en superficie en agar MRS; las placas se incubaron a 30°C por 48 h.

Organismos coliformes totales (OCT). El recuento se realizó por el método de vaciado en placa en agar bilis rojo violeta; las placas se incubaron a 35°C por 24 horas.

Hongos y levaduras. El recuento se realizó por el método de vaciado en placa en agar papa dextrosa, suplementado con rosa de bengala al 0.6% (0.5 mL/100 mL de agar) y ampicilina al 1% (1 mL/100 mL de agar). Las placas se incubaron a 22°C por 5 días.

### 3.2.4 Análisis molecular

Se realizaron análisis moleculares de diferentes muestras lácteas, la descripción de estas se detalla en el Cuadro 5. Estas muestras primero se sometieron a extracción de ADN y posteriormente a PCR-RISA.

Cuadro 5. Descripción de las muestras analizadas por PCR-RISA.

Muestra	Descripción
1	Suero proveniente de la transferencia 1
2	Suero proveniente de la transferencia 10
3	Suero proveniente de la transferencia 15
4	Suero proveniente de la transferencia 20
5	Suero proveniente de la transferencia 25
6	Inóculo utilizado en la elaboración del queso
7	Suero colectado a las 12 horas después de la incubación, en la elaboración del queso
8	Queso en el día 0 de maduración
9	Queso en el día 50 de maduración

#### 3.2.4.1 Extracción de ADN

El ADN se extrajo de las 9 muestras descritas en el Cuadro 5, empleando el kit comercial QIAamp® DNA stool.

Para la extracción de ADN de las muestras de suero se tomaron 9 mL de este y se colocaron en tubos cónicos estériles de 15 mL. De las muestras de queso se tomaron 5 g y se le adicionaron 45 mL de citrato de sodio al 2% para remover la grasa presente y se homogenizaron en *stomacher* por 5 min; una alícuota de 9 mL de esta suspensión se colocó en un tubo cónico estéril de 15 mL. La suspensión de queso se sometió a lavados sucesivos con citrato de sodio al 2% para eliminar la matriz alimentaria y concentrar las células. La muestra se centrifugó a 4500 rpm por 15 min, el sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con 10 mL de citrato de sodio al 2%. Se repitió el proceso de lavado en tres ocasiones. El concentrado celular se suspendió en 2 mL de buffer TE. Se colocaron 0.4 mL de cada una de las 9 muestras en un tubo Eppendorf para la extracción de ADN empleando el Kit QIAamp® DNA stool. Para ello se siguieron las instrucciones dadas por el proveedor. A cada tubo Eppendorf conteniendo cada una de las muestras se le

añadieron 1.2 mL de buffer ASL. Se homogeneizó en vortex por 60 s y se sometió a un tratamiento de sonicación a 80 V por 60 s. Se incubó por 5 min a 95°C, se homogeneizó en vortex por 30 s y centrifugó a 17319 g por 1 min. Se transfirió 1.2 mL del sobrenadante a un tubo nuevo y este se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó (17319 g/ 3 min). Se pipeteó el mayor volumen posible del sobrenadante y se volvió a centrifugar a 17319 g por 3 min. En un tubo nuevo, se añadieron 15 µL de proteinasa K, y se colocaron 200 µL de sobrenadante y 200 µL de buffer AL. Se mezcló en vortex por 5 s e incubó a 70°C por 10 min. Se añadieron 200 µL de etanol absoluto y homogeneizó nuevamente. Se pipeteó el lisado en una columna QIAamp® y se centrifugó 1 min por 17319 g. La columna se cambió a un tubo nuevo y se añadieron 500 µL de buffer AW1, se centrifugó 1 min por 17319 g; la columna se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 500 µL de buffer AW2, se centrifugó 3 min por 17319 g y se cambió a tubo nuevo. Se centrifugó de nuevo a 17319 g por 3 min. Se colocó la columna en tubo nuevo con tapa, añadiendo 200 µL de buffer AE, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min a 17319 g. El líquido centrifugado se empleó en análisis posteriores.

#### 3.2.4.2 Pureza del ADN

Se midió la pureza de ADN extraído mediante la medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, siendo el coeficiente de absorbancias 260/280 el que indica la pureza de la solución. Un coeficiente de 1.8 indica que la solución es ADN puro, valores inferiores indican una contaminación por proteínas o polifenoles mientras que si la relación es de 2.0 se trata de ARN puro.

Se usó buffer AE como blanco para la calibración del espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 (máxima absorbancia de ADN) y 280 nm (máxima absorbancia de proteínas).

La medida de la pureza del ADN se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pureza} = A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$$

### 3.2.4.3 PCR-RISA

Las muestras se sometieron a la amplificación por PCR-RISA del ADN extraído de las muestras de suero proveniente de las transferencias del inóculo al día 1, 10, 15, 20, 25 y del suero usado como cultivo iniciador, del suero del proceso de elaboración del queso a las 12 h de incubación y de queso a los 0 y 50 días de maduración.

La amplificación se llevó a cabo con 1  $\mu\text{L}$  de extracto de ADN en una mezcla de reacción conteniendo 1  $\mu\text{L}$  de buffer 10X, 2.5  $\mu\text{L}$  de BSA (0.1 mg/L), 0.8  $\mu\text{L}$  de desoxinucleótidos trifosfato 2.5 mM, 0.15  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa (0.75U) y el volumen necesario de cada uno de los primers ITSf 0.25  $\mu\text{M}$  (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA.3') e ITSReub 0.25  $\mu\text{M}$  (5'-GCCAAGGCATCCACC-3') para llegar a la concentración que se requiera hasta un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . El PCR se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC-512, Essex, Inglaterra) bajo las siguientes condiciones (Aldrete, 2013):

- 1) Desnaturalización inicial 94°C por 3 min.
- 2) 31 ciclos de amplificación:
  - Desnaturalización a 94°C por 60 s
  - Alineamiento de iniciadores, a 58 °C por 50 s
  - Extensión a 72°C por 90 s
- 3) Extensión final a 72°C por 3 min. (Aldrete, 2013).

Se verificó la extensión por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 2%, 100 V por 90 min en tampón TBE 1X. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 30 min y se capturó la imagen con un fotodocumentador Ninibis Pro (Bio Imaging Systems). Se analizó la intensidad de las bandas y se compararon las predominantes con las obtenidas en un trabajo paralelo a este (Aldrete, 2013).

### 3.2.5 Evaluación sensorial

Se realizó una evaluación sensorial al queso tipo de Bola que se elaboró en la UAQ mediante la técnica Dúo-Trío. La evaluación sensorial se llevó a cabo en el Laboratorio de Evaluación Sensorial del INIFAP ubicado en Ajuchitlán, Colón, Querétaro.

En la primera parte de la evaluación se realizó una selección de panelistas que fuesen consumidores habituales de quesos madurados y mayores de 23 años. Para ello a los aspirantes se les proporcionó una encuesta (Cuadro 6).

Cuadro 6. Formato de encuesta para la selección de panelistas.

Universidad Autónoma de Querétaro		
Faculta de Química		
Sexo: _____	Edad: _____	Ocupación: _____
_____		
Subraya la respuesta a las siguientes preguntas:		
1.- ¿Consume queso?		
a) Si	b) No	
2.- ¿Con que frecuencia consume queso?		
a) Diario	b) Una vez por semana	c) 2 a 3 veces por semana
3.- ¿Qué tipo de queso consume?		
a) Fresco	b) Madurado	c) Otro: _____

En la evaluación sensorial Dúo-Trío se usaron dos tipos de queso: el queso tipo de Bola elaborado en la UAQ y un queso de Bola producido en Ocosingo, Chiapas, este último utilizado como muestra de "Referencia". Las muestras provenientes de ambos quesos se cortaron en tamaño aproximado de 2 cm por 2 cm, después se

colocaron en vasos de plástico transparentes N° 0 y estos sobre una charola. Se le presentaron tres muestras a cada juez, una de ellas marcada como “R” (muestra de referencia) y las otras dos codificadas. Se le comentó al juez que una de las dos muestras codificadas era idéntica a “R” y la otra era diferente, y se le pidió que identificara a la muestra diferente y que asentara su respuesta en el formato proporcionado (Cuadro 7). La muestra idéntica a la referencia “R” fue la codificada con el número “793” y la diferente con el “359”.

Junto con las 3 muestras se les proporcionó a cada panelista un vaso transparente N° 8 con agua, un vaso rojo N° 12 para expectorar, servilletas blancas, un par de galletas de chile habanero como borrador de sabor y una boleta de respuestas, todo esto se colocó en cubículos individuales.

Cuadro 7. Formato de encuesta para la prueba Dúo-Trío aplicada.

<p>Universidad Autónoma de Querétaro</p> <p>Facultad de Química</p> <p>Evaluación Sensorial de Queso tipo de Bola</p> <p>Nombre: _____</p> <p>Fecha: _____</p> <p>Frente a usted hay una muestra de “referencia”, marcada con “R”, y dos muestras marcadas con claves.</p> <p>Una de las muestras es idéntica a R, y la otra es diferente.</p> <p>Pruebe las muestras de quesos de izquierda a derecha.</p> <p>¿Cuál de las muestras marcadas es diferente de R? Márquela con una X.</p> <p style="text-align: center;">359                      793</p> <p>Comentarios: _____</p> <p>_____</p>
---

Se consideró el número de aciertos arrojados en la prueba para en su caso establecer diferencia significativa a un valor de  $\alpha$  de 0.05, se utiliza el Cuadro A1 presente en el Anexo para ello.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Preparación de cultivo iniciador

El propósito de realizar 25 ciclos de fermentación al suero extraído originalmente de la cuajada colectada durante el proceso de producción de queso de Bola en Ocosingo, fue conocer la estabilidad que este tendría para su posterior uso en la estandarización del proceso de producción del queso de Bola. Para ello sería necesario emplear un inóculo estandarizado y leche pasteurizada, además de mantener prácticas de producción constantes. A partir de la transferencia 5 se decidió medir pH y acidez ya que, los valores de estos parámetros dependen de la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el suero y se relaciona con la carga microbiana presente. Por lo tanto el cambio mínimo de estos parámetros entre los diferentes días de transferencia representaría alcanzar la estabilidad deseada.

De la transferencia 5 a 15 se observa que el parámetro de pH muestra un promedio de 4.16 y una desviación estándar de 0.48, en cambio para el intervalo comprendido entre la transferencia 16 a 25 se observa un promedio de 4.96 y una desviación estándar de 0.10 (Figura 5). Esta diferencia en la variación de los resultados podría asociarse con el hecho de que de la transferencia 5 a 15 no se mantuvo constante la cantidad de suero ni la cantidad de leche adicionada a la mezcla. A partir de la transferencia 16 se decidió mantener constante tanto la cantidad de leche UHT como la de suero adicionado en la mezcla a fermentar (50 mL de suero y 1 L de leche UHT) para buscar que los parámetros de pH y acidez titulable tuvieran una menor variación. El mismo fenómeno se observó en la acidez, de la transferencia 5 al 15 el promedio fue de 62.10 °D y una desviación estándar de 5.47 °D, mientras que de la transferencia 16 al 25 el promedio fue de 44.8 °D y la desviación estándar únicamente de 0.95 °D (Figura 6). El inóculo mantuvo la estabilidad a partir de la transferencia 16, por lo cual ya se pudo utilizar como inóculo para la fabricación del queso tipo de Bola.

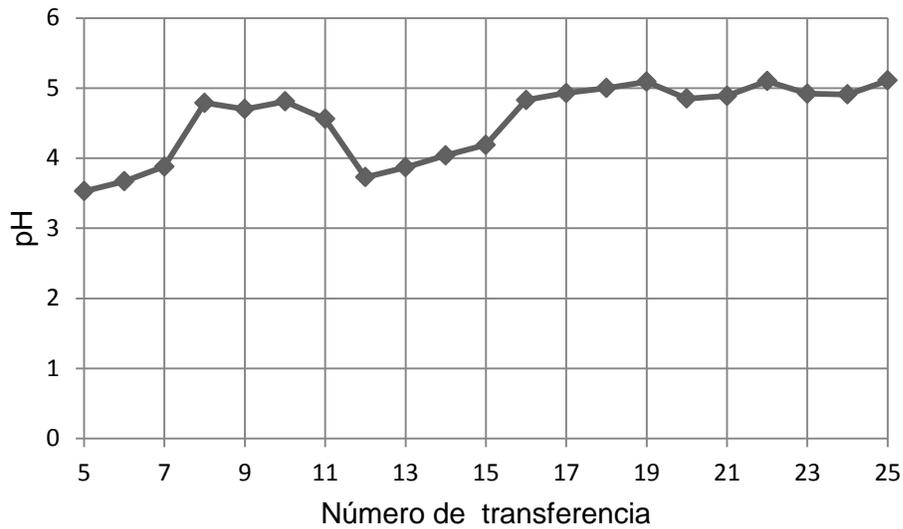


Figura 5. Evolución del pH del suero de leche obtenido durante varios ciclos de fermentación.

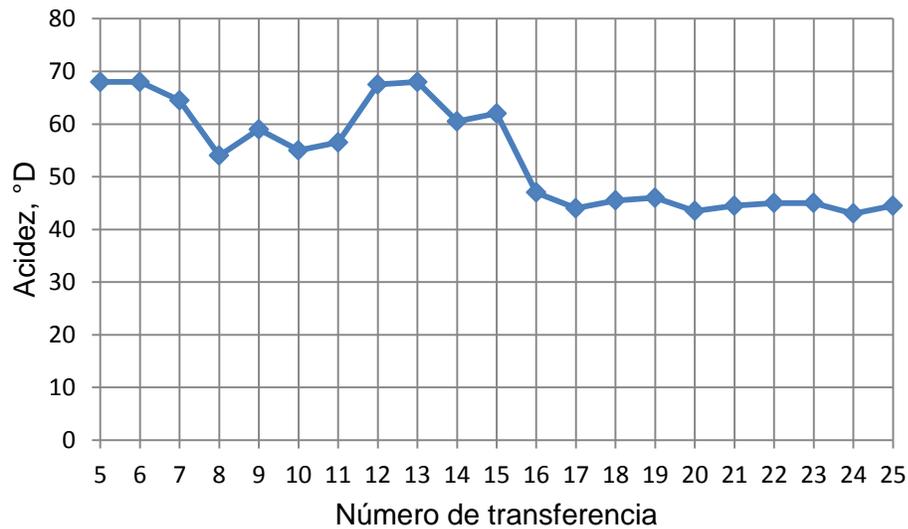


Figura 6. Evolución de la acidez del suero de leche obtenido durante varios ciclos de fermentación.

La acidez desarrollada por la fermentación láctica baja el pH entre 4 y 5. A este nivel todos los ácidos presentes intervienen en la valoración con NaOH 0.1 N, sobre todo el ácido láctico. Los valores de pH representan un estado y son más significativos que los valores de la acidez, especialmente en lo que a la estabilidad de la leche se refiere. Los valores de pH y de la acidez de valoración no están

estrechamente ligados. Hay variaciones sensiblemente paralelas en ciertos casos, pero puede haber una gran divergencia entre estos valores. Por ejemplo, en el caso del suero de quesería (suero fresco, al romper la cuajada) la acidez baja debido a la separación de la caseína y de los fosfatos, mientras que el pH difiere poco del de la leche de la cual procede. Como se sabe, la acidez representa una suma, en la que ninguno de los componentes se conoce con exactitud (García y col., 2014):

Acidez natural + reacciones secundarias + acidez desarrollada

## 4.2 Elaboración de queso tipo de Bola

### 4.2.1 Análisis de la leche utilizada para la fabricación de queso tipo de Bola

Se recomienda que la leche destinada a la elaboración de queso cuente con una concentración aceptable de los componentes más relevantes como son: proteína total, lípidos, lactosa, minerales totales y calcio. La leche utilizada para la fabricación del queso tipo de Bola fue elegida en base a su semejanza en composición con la leche utilizada por los productores de queso de Bola de Oconsingo previamente estudiada por otros autores y con ello obtener características organolépticas semejantes entre ambos quesos (Villegas y col. 2013). La composición de la leche repercute sobre la actividad metabólica de los microorganismos presentes y ello conlleva a la generación de diferentes metabolitos responsables de las características organolépticas del queso (Gatti y col. 2013).

Cabe destacar que la calidad fisicoquímica es un conjunto de propiedades de la leche y sus derivados que inciden en su conservación, composición y aceptación por los consumidores (Villegas y Santos, 2009). Por tal motivo, la composición fisicoquímica de la leche empleada para la elaboración del queso tipo Bola se comparó con la norma NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Todos los valores reportados en el Cuadro 8 estuvieron dentro de lo establecido por la normatividad.

Cuadro 8. Características fisicoquímicas de la leche utilizada en la elaboración de queso tipo de Bola

Parámetro	Valor
Densidad a 15° C, g/mL	1.0306
Acidez, ° D	15 ° D
Grasa, g/L	32.9
Sólidos no grasos, g/L	89.4
Lactosa, g/L	49.3
Proteína, g/L	30.8
Inhibidores	Negativo

#### 4.2.2 Proceso tecnológico del queso tipo de Bola

El propósito de este trabajo fue elaborar queso tipo de Bola con leche pasteurizada y la adición de un cultivo iniciador (suero fermentado) mediante un proceso efectuado bajo condiciones estandarizadas. La adición de microbiota natural a leche pasteurizada puede contribuir a la preservación de las características típicas del queso tradicional. En este trabajo se estudió el comportamiento de la población microbiana presente en el producto elaborado en la UAQ y la diferencia sensorial con respecto al queso de Bola realizado en Ocosingo.

La elaboración del queso tipo de Bola se llevó a cabo en la planta piloto de lácteos de la UAQ. Se siguieron las buenas prácticas de manufactura durante el procesamiento, para de esta forma asegurar la inocuidad del producto terminado. Se tuvo especial cuidado en la limpieza y desinfección de los utensilios y equipos, en la manipulación de las materias primas, así como en la calidad de estas.

El queso tipo de Bola se elaboró con leche pasteurizada (63 °C/30 min), debido a que la pasteurización de la leche reduce drásticamente la tasa de microorganismos. Elimina importantes grupos microbianos: bacterias patógenas, microbiota gram negativa, la mayor parte de las BAL, esporas de mohos, y levaduras (Robinson, 1987). El suero usado como cultivo iniciador tuvo una acidez de 80 °D, y un pH de 4.1. La acidez del suero iniciador es una variable fundamental ya que determina la

cantidad de suero y la cantidad de microorganismos adicionados a la leche (Gatti y col., 2013). Al considerar que el cultivo iniciador se trata de suero fermentado estandarizado mediante fermentaciones sucesivas, y proveniente en un inicio de la mezcla de cuajada de Queso Bola de Ocosingo con leche UHT, se podría considerar la preservación de la población microbiana responsable del desarrollo de las características organolépticas del queso de Bola preparado en Ocosingo, Chiapas.

Durante el proceso de producción del queso, después de los 40 minutos de fermentación, el suero presentó una acidez de 22 °D y un pH de 5.9 y después de 4 h de incubación no hubo mayor variación (25° D y pH 5.7). A las 12 h del corte de cuajada esta presentó 80 °D y un pH de 4.33. La alta concentración de BAL en la leche propicia la conversión de la lactosa a ácido láctico, esto sumado a otros procesos catabólicos, genera un aumento en la acidez y disminución del pH en la leche (Gatti y col., 2013).

Celik y Turkoglu (2007) en un estudio donde elaboraron Queso Örgü (Queso tradicional de Turquía) con leche cruda y pasteurizada, encontraron que el desarrollo de la acidez en leche cruda de vaca fue más rápido y estable, mientras que en la leche pasteurizada fue lenta y relativamente inestable.

Así mismo, el rápido desarrollo de las BAL y la reducción del pH por producción de ácido lleva a productos fermentados estables desde el punto de vista microbiológico (Salminen y Wring, 1993). También se sabe que la adición de cloruro de calcio en el proceso puede disminuir el pH (Aydemir y Dervisoglu, 2010). El catabolismo de aminoácidos libres resulta en un número de compuestos volátiles, que afectan el pH entre los que se incluyen el amoníaco, aminas, aldehídos, fenoles, indol, alcoholes; muchos de ellos contribuyen al sabor del queso. La formación de ácidos orgánicos libres acelera el aumento de la acidez y la disminución del pH, estos se producen por la hidrólisis de triglicéridos (Garde y col., 2002).

Por otra parte las 12 h de reposo post-corte ayudan a que la cuajada se contraiga, y libere la mayor cantidad de suero posible, adquiriendo la consistencia y textura características. La incorporación de sal a la cuajada le confiere cualidades de sabor, además inhibe o retarda el desarrollo de microorganismos indeseables.

La maduración del queso tipo de Bola consistió en colgar la cuajada en costales semipermeables durante 50 días, lo que provocó que la cuajada liberara el suero contenido gradualmente, redujera su peso y tomara mayor rigidez. La maduración de los quesos plantea uno de los problemas más complejos de la bioquímica de las sustancias alimenticias, y es que es el resultado global de una serie de variados fenómenos: proteólisis, desaminación y descarboxilación; lipólisis y degradación de los ácidos grasos; sacarólisis y fermentación de ácido láctico; conversión de aminoácidos, reacciones ácido-básicas, entre otras (Alais, 1998). Conforme el tiempo de maduración aumenta disminuye la concentración de materiales fermentables, lo que ayuda a la conservación del producto (Guizani y col., 2006). Se producen compuestos de bajo peso molecular, que contribuyen al sabor y textura desarrollados. Las reacciones de degradación resultan en una disminución en los contenidos en proteína y grasa, es decir en los sólidos totales. El nivel de sólidos totales es uno de los factores determinantes de la textura en los productos terminados (Celik y Turkoglu, 2007).

Finalmente la incorporación de cuajada hilada sobre las bolas de queso, sirve como protección ante las condiciones ambientales y el desarrollo microbiano, que pudiera provocar el deterioro del alimento.

#### 4.3 Caracterización microbiológica del queso tipo de Bola

La calidad microbiológica del queso es importante ya que está compuesto principalmente por proteína y grasa, lo que lo convierte en un sustrato nutritivo para el desarrollo de microorganismos; además, es un alimento que se consume sin cocimiento posterior, en donde el manejo tiene implicaciones importantes en la calidad sanitaria (Díaz-Rivero y González, 2001).

Existen condiciones bien establecidas durante un proceso de maduración del queso, como lo es la escasez de nutrientes, la baja actividad de agua, la concentración de sal y la presencia de metabólicos secundarios, entre otras. Bajo estas condiciones, la mayoría de los grupos microbianos tiende a disminuir o a mantenerse constantes (Calleja y col., 2001). El número de microorganismos presentes en queso madurado es el resultado de dos factores principales: la capacidad de los microorganismos para sobrevivir al calor y el estrés ácido durante las primeras etapas de la producción del queso y la capacidad para crecer usando fuentes de energía diferentes a los carbohidratos de la leche durante el tiempo de maduración (Gatti y col., 2013).

En el Cuadro 9 se presenta el contenido de microorganismos indicadores en el inóculo y el queso tipo de Bola a los 0 y 50 días de maduración. El cultivo iniciador mostró poblaciones de 8.31, 6.46, y 4.18 Log UFC/mL para BAL, BMA, Hongos y Levaduras, respectivamente. Lo cual es comparable con lo reportado por Gatti y colaboradores (2013) que reportaron que el contenido de BAL en suero usado como cultivo iniciador en queso Parmigiano Reggiano (Parmesano) y Grana Padano (ambos de larga maduración, 9 a 36 meses) estuvo en el rango de 7.7 a 9.9 Log UFC/mL.

La composición microbiana en el suero usado como cultivo iniciador se debe no sólo a las especies presentes sino también a los diferentes biotipos que pertenecen a la misma especie; esta diferencia es el aspecto crucial que distingue los cultivos naturales de los cultivos selectos. Diferentes interacciones microbianas involucran ya sea efectos estimulantes o inhibitorios (Gatti y col., 2013). Giraffa y colaboradores (1997a) observaron que *Lb. helveticus* cultivado en suero microfiltrado crece más eficientemente si lo adicionan junto con *Lb. delbrueckii* spp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, que cuando se adiciona como cepa única al suero. Una gran ventaja de la microbiota presente en suero usado como cultivo iniciador es su amplia resistencia a ataques de bacteriófagos (Giraffa y col., 1997b). Esto es debido a que esta microflora natural se desarrolla en presencia de

bacteriófagos, lo que conduce a la dominación de cepas resistentes o tolerantes (Marcó y col., 2012). La presencia de varias cepas de la misma especie permite que cepas infectadas por bacteriófagos, puedan ser remplazadas por cepas resistentes a bacteriófagos con similares características metabólicas (Carminati y col., 2010).

Las poblaciones de los microorganismos indicadores permanecieron constantes en los quesos analizados a los 0 y 50 días de maduración. Así mismo, durante el periodo de maduración el recuento de BAL aumentó 0.27 Log UFC/g, las BMA disminuyeron 0.33 Log UFC/g, y los hongos y levaduras mostraron un incremento de 0.48 Log UFC/g (Figura 7).

En México no existe una norma que indique el límite permisible para BMA en este tipo de alimento. Los recuentos de hongos y levaduras se encontraron por encima del límite establecido por la NOM-121-SSA1-1994, esto es debido a que el inóculo adicionado tenía 4.18 Log UFC/mL.

Cuadro 9. Contenido de microorganismos indicadores en el inóculo y en el queso tipo de Bola a los 0 y 50 días de maduración.

Muestra	BAL	BMA	H/L	OCT
Inóculo (Log UFC/mL)	8.31	6.46	4.18	< 1
Queso 0 días de maduración (Log UFC/g)	6.38	5.68	3.87	< 1
Queso 50 días de maduración, (Log UFC/g)	6.65	5.35	4.35	< 1

Sert y colaboradores (2007) realizaron un estudio para elaborar Queso Kasar (queso madurado tradicional de Turquía) bajo dos condiciones. En la primera se utilizó leche cruda para la elaboración del queso, mientras en la segunda se pasteurizó la leche y se adicionó un cultivo iniciador comercial. Los autores reportaron recuentos de BMA en el queso realizado con leche cruda en el día 1, 30 y 60 de 7.51, 5.40 y 4.54 Log UFC/g, respectivamente, mientras que en el queso elaborado con leche pasteurizada se reportó 7.36, 5.19 y 4.91 Log UFC/g para los

mismos días. El comportamiento de las poblaciones de BMA a través del tiempo de maduración en ambos casos es comparable a lo reportado para el queso tipo de Bola que se elaboró en este trabajo. En cuanto al contenido de hongos y levaduras los autores reportaron que el queso preparado con leche cruda presentó valores de 0.24, 0.54 y 0.35 Log UFC/g en los días 1, 30 y 60, respectivamente, mientras que en el queso elaborado con leche pasteurizada no se detectaron a lo largo de la maduración. Esto se contrapone a los recuentos obtenidos en hongos y levaduras en el queso tipo de Bola, donde fue mayor, debido a que el inóculo adicionado contenía una alta carga de estos microorganismos.

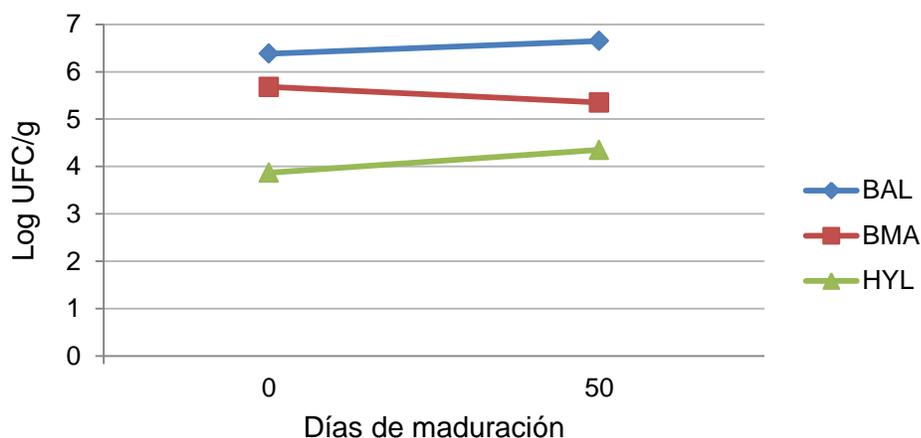


Figura 7. Contenido de microorganismos indicadores a los 0 y 50 días de maduración del queso tipo de Bola elaborado con leche pasteurizada y la adición de un cultivo iniciador estandarizado.

Santarelli y colaboradores (2013) reportan que los recuentos más altos de BAL en cuajada de queso Parmigiano Reggiano y Grana Pandano (ambos quesos madurados) después de 24 h de adición del suero estuvieron en el rango de 9 a 10 Log de UFC/g y dentro de 48 h el recuento empezó a decrecer, generalmente a niveles menores a 9 Log UFC/g. Estos recuentos están por encima de lo reportado para el día 0 de maduración en el queso tipo de Bola que se elaboró en este trabajo.

El comportamiento de BMA y BAL en el día 0 de maduración en el queso de Bola es un fenómeno normal durante la producción del queso, a causa de la retención

física de los microorganismos en el coágulo y la multiplicación microbiana durante la coagulación y el drenado del suero de leche. A lo largo del tiempo los nutrimentos en la matriz van disminuyendo lo que provoca una disminución o estabilización en las poblaciones. Lo cual es comparable con lo reportado por Guizani y colaboradores (2006), quienes incubaron leche de cabra entera pasteurizada con un cultivo iniciador comercial y estudiaron los cambios en la microbiota durante 30 días de maduración. El contenido de BMA disminuyó drásticamente hasta cerca de 1 Log UFC/g durante las dos primeras semanas de maduración y se mantuvo estable hasta el final de la maduración.

En un queso madurado es de esperarse altos contenidos de BAL. Las BAL son generalmente reconocidas como GRAS, por su siglas en inglés (Generally recognized as safe) y tienen un papel importante en la preservación y fermentación de alimentos por inhibir la flora competitiva la cual incluye patógenos (Cintas y col., 2001).

Las BAL del queso son generalmente diferenciadas como SLAB y NSLAB. Las primeras involucradas en la producción de ácido láctico durante la fabricación y contribuyen al proceso de maduración, mientras que las segundas no contribuyen a la producción del ácido pero juegan un papel muy significativo durante la maduración (Beresford y col., 2001; Neviani y Gatti, 2013). NSLAB tienden a dominar la microbiota en las etapas de la maduración del queso, en los que pueden llegar a una población de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (Porcellato y col., 2012). Además de la acción obvia de la quimosina en la degradación de la caseína durante la maduración, la cinética y naturaleza de proteólisis en el queso depende de la acción de proteasas secretadas por BAL (Guizani y col., 2006).

Las varias etapas de elaboración del queso induce a los microorganismos a la acidez y diferentes tipos de estrés como lo es el relacionado con el calor, el estrés osmótico y oxidativo, esto provoca alteraciones en el pH, actividad de agua, y potencial redox en la matriz. Como una consecuencia, la viabilidad de SLAB es reducida dentro de unas pocas horas o unos pocos días del inicio del proceso de

elaboración del queso, momento en el que una fracción considerable de células iniciadoras se somete a autólisis, liberando sus enzimas a la matriz. En contraste, las NSLAB son capaces de crecer usando otras fuentes de energía diferentes a la lactosa, y son más resistentes al estrés ambiental, crecen lentamente hasta convertirse en la microbiota dominante en el queso madurado. La relación entre SLAB y NSLAB es modulado por el tipo de cultivo adicionado a la leche, las condiciones de procesamiento y el tiempo de maduración (Beresford y col., 2001).

La aplicación de buenas prácticas de manufactura durante la elaboración del queso tipo de Bola permitió que el contenido de hongos y levaduras en el producto final no fuera mayor. Los hongos y levaduras se relacionan con el deterioro de los alimentos, aunque en quesos este grupo de microorganismos juega un papel bien conocido en el desarrollo de aroma y la modificación de la textura durante la maduración del queso, tienen gran importancia durante la maduración ya que usan el ácido láctico presente en el medio y por su actividad proteolítica y lipolítica (Guizani y col., 2006).

No se observó crecimiento de coliformes totales en las muestras de queso, lo que indica buenas prácticas de manufactura durante su elaboración, los cuidados seguidos se indican en el apartado 4.2.2 Proceso tecnológico del queso tipo de Bola. La familia *Enterobacteriaceae* agrupa microorganismos indicadores de seguridad y sanidad en los alimentos, como los coliformes. Este grupo es el más ampliamente utilizado como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas (Jay, 2000). Tienen valor como indicadores de operaciones sanitarias objetables y para seguir la eficiencia de un proceso de sanidad del equipo o de desinfección de algún producto. Esta postura se apoya en la susceptibilidad de los coliformes al calor y a los agentes germicidas de uso común en la industria alimentaria. En general, si en la preparación de un alimento se recurre a un tratamiento térmico tan severo como la pasteurización o mayor, el hallazgo de coliformes en el producto terminado constituye una evidencia de deficientes prácticas sanitarias posteriores a esa etapa, incluido el uso de un ingrediente de baja calidad bacteriológica (Fernández, 2008).

#### 4.4 Análisis molecular

Los métodos convencionales (aquellos basados en el aislamiento de microorganismos y su identificación por pruebas bioquímicas) son insatisfactorios para el estudio de un sistema ecológico dinámico de las poblaciones microbianas, como es el caso de la microbiota del queso. La aplicación de técnicas moleculares, tales como PCR, son útiles para la determinación de especies individuales o cepas. El uso de estos métodos tiene la ventaja de proporcionar la identificación y monitorear la microbiota a nivel especie sin la necesidad del aislamiento de microorganismos en medios de cultivo. En lugar de ello se extrae directamente el ADN de los microorganismos presentes en la matriz láctea original para conocer la diversidad de géneros bacterianos que integran esa comunidad (Coppola y col., 2008).

El lavado de las muestras con citrato de sodio al 2% previo a la extracción del ADN tuvo como propósito eliminar la mayor cantidad de matriz alimentaria en la muestra, sobre todo las grasas. Este reactivo al ser un emulsificante, permite desplazar los complejos de fosfato de calcio separando a los monómeros de caseína en la red de fosfato de paracaseína-calcio insoluble, facilitando la separación de proteínas y grasa, de las bacterias presentes en la matriz alimentaria (Kapoor y Metzger, 2008).

Uno de los factores que determinan el éxito de una técnica molecular es la pureza del material genético que se emplea. En las mediciones que se llevaron a cabo se obtuvieron valores menores de 1.8 en el coeficiente de absorbancias 260/280 nm, lo que indica que no se logró obtener ADN puro (Cuadro 10). Ello pudo deberse a que tanto el citrato de sodio como los reactivos del kit utilizado no eliminaron toda la matriz alimentaria de las muestras, quedando presente residuos de grasas, proteínas, carbohidratos y sales. También existen contaminantes provenientes de la ruptura de la pared celular bacteriana. El cociente 260/280 nm también puede ser afectado por algunas sales de los buffers como el Tris, EDTA e isocionato de guanidinio, pues absorben fuertemente desde 230 nm hasta 260 nm (Boesenberg-Smith y col., 2012).

Cuadro 10. Pureza del ADN extraído de muestras lácteas.

Código de la muestra	Descripción de la muestras	Pureza (260/280 nm)
1	Suero proveniente de la transferencia 1	1.62
2	Suero proveniente de la transferencia 10	1.53
3	Suero proveniente de la transferencia 15	1.48
4	Suero proveniente de la transferencia 20	1.65
5	Suero proveniente de la transferencia 25	1.68
6	Inóculo utilizado en la elaboración del queso	1.60
7	Suero colectado a las 12 horas después de la incubación, en la elaboración del queso	1.57
8	Queso en el día 0 de maduración	1.67
9	Queso en el día 50 de maduración	1.59

La calidad y rendimiento del ADN son cruciales para el éxito de los análisis de PCR. Se han reconocido como inhibidores de PCR a los componentes en materias biológicas tales como grasas, polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios. Además, generalmente es difícil amplificar una secuencia objetivo usando preparaciones de ADN de productos agrícolas y alimentos, ya que las concentraciones obtenidas incluyen ADN que no es el objetivo de amplificación, actuando también como inhibidores de la PCR (Ikeda y col., 2007).

A partir del ADN extraído de las muestras de suero colectadas durante la estabilización del inóculo (transferencias al día 1, 10, 15, 20 y 25), del inóculo utilizado en la elaboración del queso, del suero colectado a las 12 horas después de la incubación durante la elaboración del queso y de queso madurado a los 0 y 50 días, se procedió a realizar el PCR-RISA. Las condiciones con las que se realizó la técnica PCR-RISA fueron obtenidas de un trabajo paralelo a este, en donde se estandarizaron las condiciones modificando la temperatura de alineamiento y el número de ciclos. Se buscó identificar las mejores condiciones con el propósito de que se obtuviera el mayor perfil de bandeo que permitiera estudiar con certeza la

comunidad microbiana y obtener una mayor intensidad de los productos amplificados, estas condiciones fueron: temperatura de alineamiento de 58 °C y 31 ciclos de amplificación (Aldrete, 2013).

Las bandas obtenidas se compararon con los resultados reportados por Aldrete (2013) en donde se analizó la población microbiana del queso de Bola de los ranchos Santa Isabel, Bulush Bak y La Peña en temporada seca y de lluvias mediante PCR-RISA. Solo se presentaron perfiles iguales en las muestras de queso madurado a los 80 y 110 días de los productores de Santa Isabel en temporada seca y La Peña en ambas temporadas (Figura 9). Aldrete (2013) reporta que las bandas de 320 y 380 pb marcadas con “1” y “2” respectivamente en la Figura 9, se encontraron en la mayoría de las muestras y que estas dos bandas son *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* respectivamente, ya que al realizar la pirosecuenciación se confirmó la presencia de estas bacterias. Al preservarse las bandas a través del tiempo, estas bacterias son las principales responsables de aportar las características sensoriales típicas al queso de Bola.

Las materias primas usadas por parte de los productores en cada rancho es un factor que influye en las comunidades microbianas presentes y por ello, que cada lote de producción cambie, generando quesos con diferente calidad. Sobre todo debido a la leche fermentada que se utiliza, ya que como se mencionó previamente, durante la preparación del queso de Bola de forma tradicional no se añade cultivo iniciador alguno (Aldrete, 2013).

Recientes estudios han logrado demostrar que los quesos artesanales tienen diferentes y típicas dinámicas de la población microbiana relacionada a la producción tecnológica y al área geográfica de origen (Baruzzi y col., 2000; Cappa y col., 2002).

Cabe mencionar que las bandas de las muestras de inóculo (carril 6) y de suero colectado a las 12 horas después de la incubación durante la elaboración del queso

(carril 7) no se observaron en el gel. Una posible explicación ante este suceso, es que el ADN extraído sea de mala calidad o bien que tenga una baja concentración (Figura 8). En el inóculo se espera un perfil de bandeo igual al de las muestras colectadas en los distintos días de transferencia, ya que al lograr estabilizar el suero utilizado como inóculo la población microbiana se conserva a través del tiempo.

*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* son componente de los cultivos iniciadores termofílicos usados en la manufactura de productos lácteos, estas bacterias tienen una temperatura óptima de crecimiento de 42°C y son utilizadas para la producción de yogurt, y para las variedades de queso tipo suizo y tipo italiano (Zee, 2002).

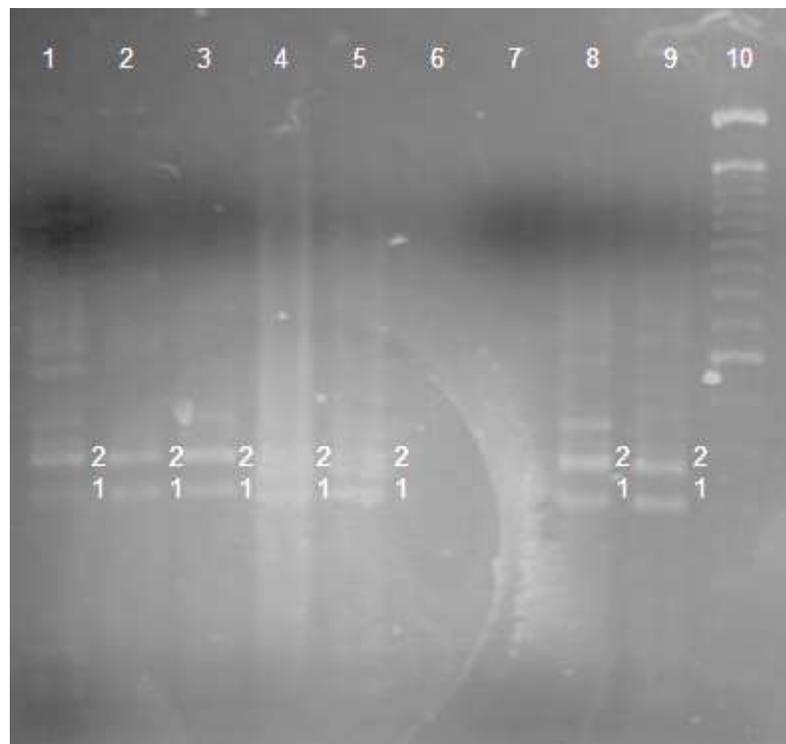


Figura 8. Perfil de RISA de muestras de suero, inóculo y queso provenientes del proceso de producción de Queso tipo de Bola. 1= Suero de la transferencia 1; 2= Suero de la transferencia 10; 3= Suero de la transferencia 15; 4= Suero de la transferencia 20; 5= Suero de la transferencia 25; 6= Inóculo usado como cultivo iniciador, 7= Suero colectado a las 12 horas después de la incubación en la elaboración del queso; 8= Queso en el día cero de maduración; 9= Queso en el día 50 de maduración; 10= MPM, 100 bp DNA ladder.

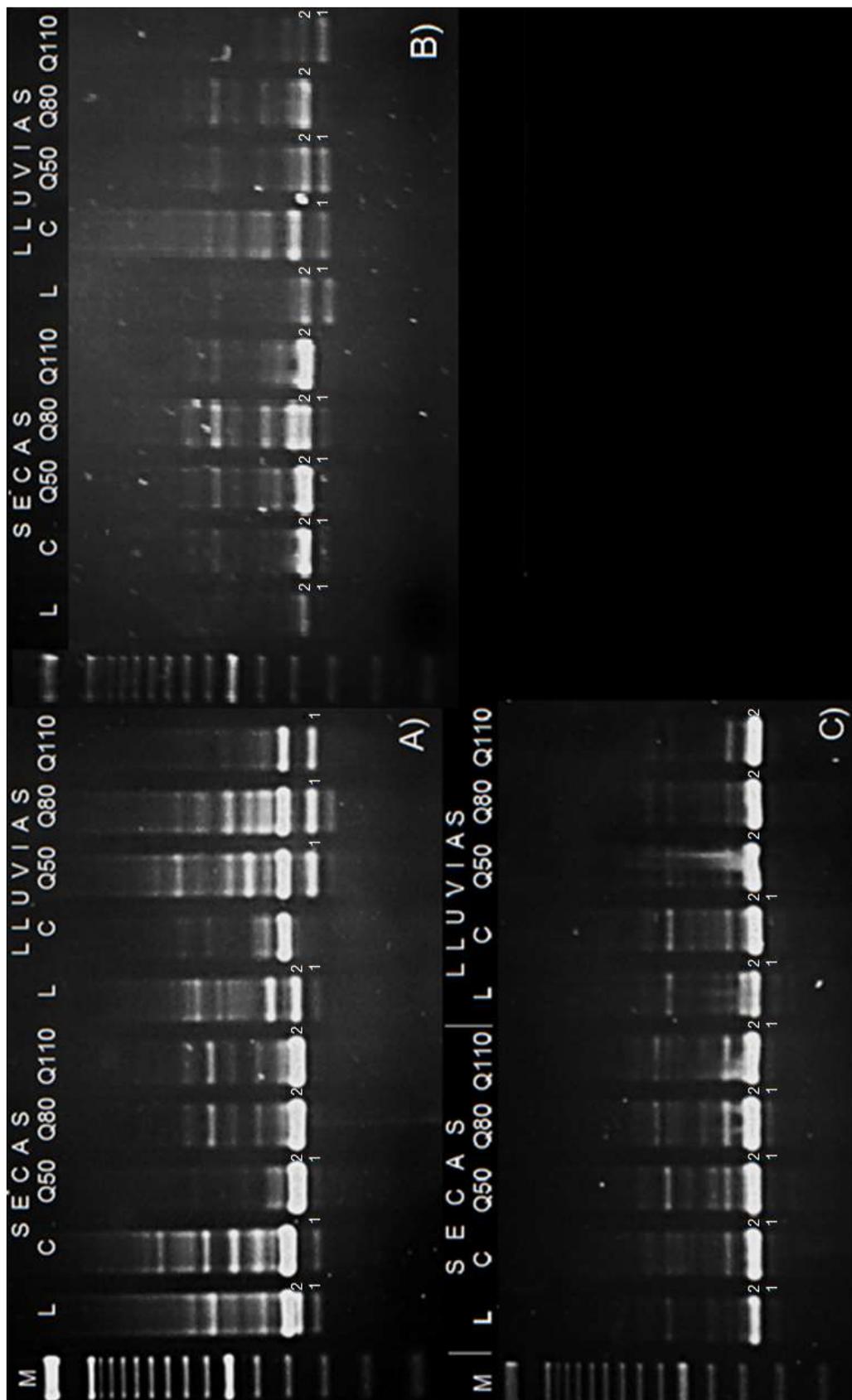


Figura 9. Perfiles RISA de comunidades bacterianas de muestras de queso de Bola por temporada. L: Leche, C: Cuajada, Q50, Q80 y Q110: Queso a los 50, 80 y 110 días de maduración. A: Santa Isabel, B: Bulush Bak, C: La Peña (Aldrete, 2013)

Finalmente, aunque en este trabajo no se logró obtener geles de buena calidad, se aprecian las bandas características en las muestras amplificadas, con lo cual se pudieron obtener resultados claros. Los resultados moleculares obtenidos en este trabajo pueden ser una herramienta para la estandarización de cultivos iniciadores, formulados con cepas aisladas del proceso de elaboración y maduración del queso de Bola de Ocosingo, además de la aplicación en otros quesos tradicionales.

#### 4.4 Evaluación sensorial

Se aplicó la encuesta de selección de panelistas a 43 personas de los cuales se seleccionaron a 26 personas según los criterios de edad y afinidad en el consumo de queso madurado. De los 26 panelistas, 20 identificaron correctamente la muestra “359” como la diferente a la “Referencia”. A un valor de  $\alpha$  de 0.05, y n de 26 se tiene que es necesario que 18 panelistas respondan correctamente para poder establecer una diferencia significativa (Cuadro A1, Anexo). Por tanto con 21 aciertos se concluye que existe diferencia significativa en el sabor, a un nivel de significancia del 95% entre el queso tipo de Bola elaborado con leche pasteurizada en la ciudad de Querétaro y el queso de Bola de Ocosingo elaborado con leche cruda. Sin embargo a los panelistas no les fue desagradable el queso tipo de Bola elaborado en la UAQ, haciendo saber sus comentarios en la boleta de respuestas, dichos comentarios se centraron en que este estaba menos salado y tenía sabores menos fuertes que el otro.

La proteólisis es la más importante reacción durante la maduración, lo cual determina la textura y sabor desarrollado en el queso. Las proteínas son parcialmente hidrolizadas por la renina, y otras enzimas microbianas nativas, que producen compuestos de bajo peso molecular, que son responsables del sabor del producto final (Celik y Turkoglu, 2007).

Celik y Turkoglu (2007) midieron los valores de Nitrógeno Soluble en Agua (NSA) y de Nitrógeno Soluble en Ácido Tricloroacético (NS-ATA) para determinar el nivel de proteólisis en queso elaborado con leche cruda y con leche pasteurizada. Los

valores reportados de NSA y NS-ATA fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en el queso elaborado con leche cruda en relación al queso elaborado con leche pasteurizada, indicando que la carga y actividad microbiana fueron mayores con la leche cruda. El contenido de NSA y NS-ATA en ambos quesos incrementaron significativamente a lo largo de la maduración.

La lipólisis es otra importante reacción bioquímica que ocurre en el queso durante la maduración, a lo largo de este proceso existe un mayor contenido de compuestos generados por esta reacción bioquímica en un queso elaborado con leche bronca que en aquel elaborado con leche pasteurizada (Celik y Turkoglu, 2007). Esto puede atribuirse al hecho de que las lipasas en la leche cruda son inactivadas durante la pasteurización (Vlaemynck, 1992). Existe una correlación positiva entre la concentración de compuestos de bajo peso molecular (péptidos, aminoácidos y ácidos grasos, responsables del sabor del queso) y NSLAB en leche (McSweeney y col., 1993). La pasteurización destruye la mayoría de estos microorganismos y por lo tanto retrasa en los procesos bioquímicos (Beuier y col., 1997). También la diferencia en el comportamiento de la acidez, pH,  $A_w$ , potencial oxido-reducción, etc. durante la maduración de ambos tipos de queso son aspectos a considerar. Es bien reconocido que los quesos elaborados con leche cruda tienen sabores más intensos que los elaborados con leche pasteurizada (Albenzio y col., 2001).

Los argumentos mencionados en los párrafos anteriores sustentan la presencia de diferencias organolépticas en el queso tipo de Bola elaborado con leche pasteurizada y el queso de Bola elaborado con leche cruda. Además las condiciones ambientales del lugar geográfico donde se elabora el queso, las pequeñas variaciones en el proceso de elaboración, los utensilios utilizados, la calidad y composición de la leche, nutrición del ganado que produce la leche y la microbiota presente, repercuten en las diferencias sensoriales de ambos quesos.

## 5. CONCLUSIONES

Este estudio aportó información para asegurar la inocuidad del queso tipo de Bola, esto se logro utilizando leche pasteurizada y un cultivo iniciador natural estabilizado (como lo es el suero) en su elaboración, con el fin de conservar las características organolépticas del queso tradicional lo más semejantes posibles.

Se logro estabilizar el suero para poder utilizarlo como cultivo iniciador, esto en base al comportamiento de los parámetros de pH y acidez en los diferentes días de transferencia de la fermentación. Esta es una herramienta que pude ser utilizada por los productores de queso de Bola de Oconsingo para obtener productos de mayor calidad sanitaria y homegeneidad entre lotes.

Las poblaciones de los microorganismos indicadores (BMA, BAL, OCT, Hongos y Levaduras) permanecieron constantes durante la maduración del queso, esto debido a la escasez de nutrientes y al estrés sufrido por los microorganismos durante el proceso de maduración, además que se siguieron buenas prácticas de manufactura durante la elaboración del queso.

Mediante las prueba PCR-RISA efectuada a las muestras del suero, inóculo y queso (0 y 50 días de maduración) fue posible observar la conservación de dos bandas que coinciden con las reportadas en un trabajo paralelo realizado por Aldrete (2013). Estas bandas corresponden a *Streptococcus thermophilus* (380 pb) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (320 pb). La presencia de las dos bandas sugiere que al conservarse estas bacterias en las muestras colectadas durante la estabilización del inóculo y durante el proceso de elaboración del queso, se les puede señalar como las responsables de generar las principales características organolépticas al queso.

La técnica PCR-RISA resultó ser un método económico, fácil y rápido para el estudio de las poblaciones microbianas en muestras lácteas del proceso de elaboración del queso tipo de Bola.

Al efectuar el análisis sensorial los panelistas detectaron diferencia de sabor entre el queso tipo de Bola elaborado en la UAQ y el queso de Bola de Ocosingo. La diferencia puede atribuirse a las características de la leche utilizada (pasteurizada o cruda, composición, características fisicoquímicas, etc.), a la microbiota presente tanto en la leche como en los utensilios de fabricación, a las diferencias en el proceso de elaboración y las condiciones ambientales del lugar donde se elaboró. Si bien los panelistas detectaron diferencias entre el queso tipo de Bola elaborado en la UAQ y el queso de Bola de Ocosingo, ninguno lo consideró desagradable.

En trabajos posteriores donde se trabaje en la estabilidad de cultivos iniciadores, se recomienda realizar el monitoreo de los grupos microbianos indicadores (BMA, BAL, OCT, hongos y levaduras) durante los días de transferencia para tener más información que sustente dicha estabilidad. Además de asegurar una concentración de BAL suficiente para desarrollar las características organolépticas deseadas en el queso.

Por otra parte, es deseable aislar bacterias, hongos y levaduras en diferentes etapas de la elaboración tradicional del queso de Bola para estandarizar un cultivo iniciador. Estos microorganismos deberán ser seleccionadas en base a sus características tecnológicas como: capacidad acidificante, producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas, capacidad de generar componentes de sabor y aroma, capacidad antagónica contra patógenos, inhibición contra deterioradores, entre otras.

## 6. REFERENCIAS

- Alaís**, Ch. Ciencia de la leche, principios de técnica lechera. México, D.F.: Compañía Editorial Continental, **1998**: 232, 233, 492.
- Alaoui**, A., Baird, A. C., Baird. Ecología microbiana de los alimentos 2. Madrid: Acribia, **1985**: 504-511.
- Albenzio**, M., Corbo, M., Rehman, S., Fox, P. De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobetti, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk, or by heating the curd in hot whey. International Journal of Food Microbiology. **2001**; 67: 35–48.
- Aldrete**, J. Caracterización de las comunidades microbianas presentes en quesos mexicanos de corta maduración elaborados artesanalmente. Tesis maestría. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro, **2013**: 58, 64-69, 82-85.
- Amann**, R., Kühn, M. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. Current Opinion in Microbiology. **1998**; 1: 352-358.
- Aydemir**, O., Dervisoglu, M. The effect of heat treatment and starter culture on colour intensity and sensory properties of Kulek cheese. International Journal of Dairy Technology. **2010**; 63: 569-574.
- Baruzzi**, F., Morea, M., Maturante, A., Cocconcelli, P.S. Changes in the Lactobacillus community during Ricotta forte cheese natural fermentation. Journal of Applied Microbiology. **2000**; 89, 807– 814.
- Baylis**, C. Review: Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. International Journal of Dairy Technology. **2009**; 62 (3): 293-307.
- Beresford**, T., Fitzsimons, N., Brennan, N., Cogan, T. Recent advances in cheese microbiology. Internacional Dairy Journal. **2001**; 11: 260-264.
- Boesenberg-Smith**, K., Pessarakli, M., Wolk, D. Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting. Clinical microbiology newsletter. **2012**; 34 (1): 3-6.
- Borneman**, J., Triplett, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts

associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**; 63: 2647- 2653.

**Briggiler**, M., Capra, M. L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J. A., Hynes, E. Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: *in vitro* characterization and performance in two model cheese. *Journal of Dairy Science*. **2007**; 90: 4532-4542.

**Buyser**, M., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *International Journal of Food Microbiology*. **2001**; 67: 1–17.

**Bylund**, G., López, A. *Manual de Industrias Lácteas*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, Madrid: **2007**: 18, 24.

**Calleja**, C. Capita, R., Bernardo, R., García, M. Changes in the Microflora of Valdeteja Raw Goat's Milk. Cheese throughout Manufacturing and Ripening. *Lebensm. Wiss. Technol*. **2002**; 35: 22-232

**Canul**, J., De Necochea, R. *Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos*. Cuernavaca: Instituto de Biotecnología-UNAM, **2004**: 13-34.

**Cappa**, F., Cattivelli, D., Cocconcelli, P. S. Study of microbial community in Fromadzo cheese produced in alpine pastures. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*. **2002**; 53: 127–138.

**Carbonell**, M., Garde, S., Fernández, E., Medina, M., Nuñez, M. Volatile Compounds in Hispanico Cheese Manufactured Using a Mesophilic Starter, a Thermophilic Starter, and Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* INIA 415. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2002**; 50: 6752-6757.

**Carminati**, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suarez, V., Reinheimer, J. Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. En *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Philadelphia, **2010**: 177-192.

**Celik**, S., Turkoglu, H. Ripening of traditional Örgü cheese manufactured with raw or pasteurized milk: Composition and biochemical properties. *International Journal of Dairy Technology*. **2007**; 60 (4): 253-258.

**Cervantes**, F., Villegas, A., Cesín, A., Espinoza, A. Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar. México, D.F.: Universidad Autónoma de Chapingo, **2006**: 4-6, 9, 10, 18.

**Chandan**, R., Kilara, A. Dairy ingredients for food processing. USA: Wiley-Blackwell, **2011**: 1-10.

**Cintas**, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I. Hernández, P. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Science Technology International. **2001**; 7(4): 281-305.

**Cogan**, T., Beresford, T., Steele, J., Broadben, J., Shah, N. P., Ustunol, Z. Invited review: advances in starter cultures and cultured foods. Journal of Dairy Science. **2007**; 90: 4005-4021.

**Coppola**, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Dairy products. En: Molecular techniques in microbial ecology of fermented food. Italy: Springer, **2008**: 47.

**Delbes**, C., Ali-Mandjee, L., Montel, M. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and independent 16S RNAr gene-based analyses. Applied and Environmental Microbiology. **2007**; 73: 1882.

**Dervisoglu**, M., Yazici, F., Aydemir, O. Effect of heat treatment and starter culture on proteolysis and lipolysis of Kulek cheese during ripening. Italian Journal of Food Science. **2006**; 18: 139-149.

**Díaz**, G., Wachter, C. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología. **2003**; 45: 30-40.

**Díaz-Rivero** C., González B. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Caracas: Revista Salud Pública y Nutrición, **2001**: 2-3.

**FAO**, **2000**. Comisión del Codex Alimentarius: Norma general del Codex para el queso (CODEX STAN 283-1979). 2° ed., Noviembre 19 de 2012.

**Fernández**, E. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro, **2008**: 576-578, 604-607.

**Fitzsimons**, N., Cogan, T., Condon, S., Beresford, T. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology. **1999**; 65 (8): 3418-3426.

**Fox, P.,** McSweeney, P., Cogan, T., Guinne, T. Cheese: chemistry, physics and microbiology. Tercera edición. Reino Unido: Elsevier, **2004**: 7, 479.

**François, T. M.** De la retórica a la práctica del patrimonio: procesos de calificación de los quesos tradicionales mexicanos. Tesis como requisito para obtener el grado de doctor en problemas económico-agroindustriales. Chapingo, México: Universidad Autónoma de Chapingo, **2011**: 82-87.

**Garcia, M.,** Quintero, R., López-Munguía, A. **2014.** Biotecnología Alimentaria. LIMUSA, D.F., México: 171-174.

**Garde, S.,** Tomillo, J., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. Proteolysis in Hispanico Cheese Manufactured using a Mesophilic Starter, a Thermophilic Starter, and Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* INIA 415 Adjunct Culture. Journal of agricultural and food chemistry. **2002**; 50: 3479-3485.

**Gatti, M.,** Benedetta, B., Lazzi, C., Neviani, E., Mucchetti, G. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. Journal Dairy Science. **2013**; 97: 537-591.

**Gatti, M.,** Bottari, B., Santarelli, M., Neviani, E. Comparison of natural whey starters for Grana Padano cheese using sunray plots. Ann. Microbiol. **2011**; 61: 475–481.

**Giraffa, G.** Studying the dynamics of Microbial populations during food fermentation. FEMS Microbiology Reviews. **2006**; 28: 254-256.

**Giraffa, G.,** De Vecchi, P., Reinheimer, J. Population dynamics of thermophilic lactobacilli in mixed starter whey cultures. Food Res. Int. **1997a**; 37: 137–140.

**Giraffa, G.,** Mucchetti, G., Addeo, F., Neviani, E. Evolution of lactic acid microflora during Grana cheese-making and ripening. International Journal of Food Microbiology. **1997b**; 15: 115–122.

**Guizani, N.,** Al-Attabi, Z., Kasapis, S., Gaafar, O. Ripening profile of semi-hard standard Goat cheese made from pasteurized milk. International Journal of Food Properties. **2006**; 9: 523-532.

**Hernández, A.** Microbiología Industrial. Costa Rica: EUNED, **2003**: 74, 75.

**Hoier, E.,** Janzen, T., Rattray, F., Sorensen, K., Borsting, M. W., Brockmann, E. Technology of Cheese making. Chichester: Wiley- Blackwell, **2010**: 166-192.

**Ikeda**, S., Fuji, S., Sato, T., Furuya, H., Naito, H., Ytow, N., Ezura, H., Minamisawa, K., Fujimura, T. Microbial diversity in milled rice as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis. *Microbes. Environ.* **2007**; 22(2): 165.

**Jay**, J. J. *Modern Food Microbiology*. 6ta ed. USA: Aspen, **2000**: 390-391.

**Jokovic**, N., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Tolinacki, M., Topisirovic, L. Characterization of non-starter lactic acid bacteria in traditionally produced home-made Radan cheese during ripening. *Arch. Biol. Sci., Belgrade.* **2011**; 63: 1-10.

**Kapoor**, R., Metzger, L. Process cheese: scientific and technological aspects-a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* **2008**; 7: 198.

**Kieronczyk**, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology.* **2003**; 69: 734–739.

**Kolakowski**, P., Podolak, R., Kowalska, M. **2012**. Microbial Profile of Gouda Cheese During Ripening in Two Independent Chambers. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. Vol. 62 (3): 179-184.

**Korbel**, J., Urban, A., Affourtit, J., Godwin, B. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science.* **2007**; 318: 420–426.

**Langer**, A., Ayers, T., Grass, J., Lynch, M., Angulo, F., Mahon, B. Nonpasteurized Dairy Products, Disease Outbreaks, and State Laws-United States, 1993-2006. *Emerging Infectious Diseases.* **2012**; 18 (3): 385-391.

**Lortal**, S., Chapot-Chartier, M. Role mechanisms, and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Internacional Dairy Journal.* **2005**; 15: 857-871.

**McSweeney**, P., Fox, P., Lucey, J., Jordan, K., Cogan, T. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of cheddar cheese. *International Dairy Journal.* **1993**; 3: 613–634.

**Marco**, M. B., Moineau, S., Quiberoni, A. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage.* **2012**; 2: 149–158.

**Marth**, E., Steele, J. *Applied dairy microbiology*. Segunda edición. EUA: Marcel dekker, **2001**: 59, 152-157.

- Martín**, A. Estudio polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Tesis para obtener grado de Doctor. Granada: Universidad de Granada, **2008**: 70.
- Neviani**, E., Gatti, M. Microbial evolution in raw-milk, long ripened cheeses: Grana Padano and Parmigiano Reggiano case. En Cheese Ripening: Quality, Safety and Health Aspects. New York: Ed. Nova Science Publishers Inc. New York, **2013**: 133–148.
- Norma Mexicana** NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Sistema producto leche-alimento-lácteo-leche cruda de vaca-especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. COFOCALEP, México, **2012**.
- Norma Oficial Mexicana** NOM-121-SSA1-1994. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud, México, **1994**.
- Norma Oficial Mexicana** NOM-243-SSA1-2010. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaría de Salud, México, **2010**.
- Planzer**, S., Da Cruz, A., Santana, A., Silva, R., Moura, M., De Carvalho, L. Food Safety Knowledge of Cheese Consumers. *Journal of Food Science*. **2009**; 74 (1): 28-30.
- Pogacic**, T., Kelava, N., Zamberlin, S., Dolencic-Spehar, I., Samarzija, D. Methods for culture-independent identification of lactic acid bacteria in dairy products. *Food Technology Biotechnology*. **2010**; 48 (1): 3-7.
- Porcellato**, D., Liland, K. H., Rudi, K., Laksson, T., Skeie, S. B. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in norvegia cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of American Dairy Science Association*. **2012**; 95 (9): 4804–4812.
- Pouch**, F., Ito, K., Compendium of methods for microbiological examination of foods. Cuarta edición. Miramar: American Health Association, **2001**: 482, 483.
- Robinson**, R. Microbiología lactológica, Vol. 2. Microbiología de los productos lácteos. Zaragoza: ACRIBIA, S.A., **1987**: 147-157.

**Rossetti**, L., Carminati, D., Zago, M., Giraffa, F. A qualified presumption of safety approach for the safety assessment of Grana Padano whey starters. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**; 130: 70–73.

**Sachse**, K., Frey, J. PCR detection of microbial pathogens. EUA: Human Press, **2003**: 2, 4, 8.

**Salminen**, S., Wring, A. Lactic acid bacteria. EUA: Marcel Dekker, **1993**: 65-69.

**Santarelli**, M., Bottari, B., Malacarne, M., Lazzi, C., Sforza, S., Summer, A., Neviani, E., Gatti, M. Variability of lactic acid production, chemical and microbiological characteristics in 24-hour Parmigiano Reggiano cheese. *Dairy Sci. Technol.* **2013**; 93: 605–621.

**Santarelli**, M., Gatti, M., Lazzi, C. Bernini, V., Zapparoli, G., Neviani, E. Whey starter for Grana Padano cheese: Effect of technological parameters on viability and microbial community. *J. Dairy Sci.* **2008**; 91: 883–891.

**Santos**, A. **2007**. Leches y sus derivados. Segunda ed. Trillas, México: 33, 103.

**Sert**, D., Ayar, A., Akin, N., The effects of starter culture on chemical composition, microbiological and sensory characteristics of Turkish Kasar Cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology.* **1997**; 60 (4): 245-252.

**Torres**, M., Castillo, A. *Microbiología de los alimentos*. Guadalajara: Universidad de Guadalajara, **2006**: 16, 42, 48.

**Torres**, M., Vallejo, B., Díaz, M. E., Mazorra, M. A., González, A. F. Characterization of natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. Elsevier, *Food Control.* **2005**; 17: 683-690.

**Van-Hekken**, D., Tunick, M., Tomasula, P., Molina, F., Gardea, A. Mexican Queso Chihuahua: rheology of fresh cheese. *Society of Dairy Technology.* **2007**; 60 (1): 5-12.

**Vázquez**, R., Vázquez, R. D., Castellanos, A. Denominación de origen del Queso de Bola de Ocosingo. Chiapas: Universidad Tecnológica de la Selva, **2009**: 3-5.

**Villegas**, A. *Tecnología Quesera*. México, D.F.: Trillas, **2004**: 27, 31, 53, 57, 76-120.

**Villegas**, A., Cervantes, F. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. **2011**; 19: 145,164.

**Villegas**, A., Santos, A. Manual básico para elaborar productos lácteos. México, D.F.: Trillas, **2009**: 9-19.

**Vlaemynck**, G. Study of lipolytic activity of the lipoprotein lipase in lunch cheese of the gouda type. *Milchwissenschaft*. **1992**; 47 (3): 164-166.

**Zee**, E. Lactic Acid Bacteria: Genetics, metabolism and applications. Aldrech: FEMS, **2002**: 42.

## 7. ANEXOS

Cuadro A-1. Número de jueces requerido, en una prueba dúo-trío, para emitir juicios correctos.

n	α					n	α				
	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001		0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
<b>6</b>	5	6	6	----	----	<b>26</b>	16	17	18	20	22
<b>7</b>	6	6	7	7	----	<b>27</b>	17	18	19	20	22
<b>8</b>	6	7	7	8	----	<b>28</b>	17	18	19	21	23
<b>9</b>	7	7	8	9	----	<b>29</b>	18	19	20	22	24
<b>10</b>	7	8	9	10	10	<b>30</b>	18	20	20	22	24
<b>11</b>	8	9	9	10	11	<b>32</b>	19	21	22	24	26
<b>12</b>	8	9	10	11	12	<b>36</b>	22	23	24	26	28
<b>13</b>	9	10	10	12	13	<b>40</b>	24	25	26	28	31
<b>14</b>	10	10	11	12	13	<b>44</b>	26	27	28	31	33
<b>15</b>	10	11	12	13	14	<b>48</b>	28	29	31	33	36
<b>16</b>	11	12	12	14	15	<b>52</b>	30	32	33	35	38
<b>17</b>	11	12	13	14	16	<b>56</b>	32	34	35	38	40
<b>18</b>	12	13	14	15	16	<b>60</b>	34	36	37	40	43
<b>19</b>	12	13	14	15	17	<b>64</b>	36	38	40	42	45
<b>20</b>	13	14	15	16	18	<b>20</b>	38	40	42	45	48
<b>21</b>	13	14	15	17	18	<b>21</b>	41	42	44	47	50
<b>22</b>	13	14	15	17	19	<b>22</b>	43	45	46	49	52
<b>23</b>	15	16	16	18	20	<b>23</b>	45	47	48	51	55
<b>24</b>	15	16	17	19	20	<b>24</b>	47	49	51	54	57
<b>25</b>	16	17	18	19	21	<b>25</b>	49	51	53	56	59

Nota 1: Los valores de la tabla son exactos porque están basados en la distribución binomial. Para valores de n no incluidos en la tabla, se calculan los valores utilizando la aproximación normal a la binomial como sigue: mínimo de respuestas (x)= número entero más cercano mayor que  $x=(n/2) + z \sqrt{n/4}$  donde z varía con el nivel de significación como sigue 0,84 para α= 0,20; 1,28 para α=0,10; 1,64 para α= 0,05; 2,33 para α =0,01; 3,09 para α= 0,001.