

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA
ASOCIADA A LA PRODUCCIÓN DE
QUESO ADOBERA ARTESANAL
Y SUS PERSPECTIVAS
BIOTECNOLÓGICAS**

JOSÉ MARTÍN RUVALCABA GÓMEZ





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A LA PRODUCCIÓN DE QUESO ADOBERA ARTESANAL Y SUS PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS

M.C. JOSÉ MARTÍN RUVALCABA GÓMEZ

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Febrero 2020

Directores Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil
Instituto Politécnico Nacional
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada

Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
Centro Nacional de Recursos Genéticos

Comité de tesis Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas
Instituto Politécnico Nacional
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada

Dr. Marlon Rojas López
Instituto Politécnico Nacional
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada

Dr. Víctor Eric López y López
Instituto Politécnico Nacional
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada

Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo
Programa de Cátedras CONACYT
Instituto Politécnico Nacional
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-13-BIS

**ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS**

México, D.F. a 11 de Mayo del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA en su sesión ordinaria No. 5 celebrada el día 11 del mes de Mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Ruvalcaba
Apellido paterno

Gómez
Apellido materno

José Martín
Nombre (s)

Con registro:

B	1	6	1	3	5	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Estudio de la microbiota asociada a la producción de queso Adobera artesanal y sus perspectivas biotecnológicas

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Determinar la estructura de la comunidad microbiana presente en el queso Adobera mediante métodos dependientes e independientes de cultivo
Determinar la diversidad metabólica funcional de las comunidades microbianas presentes en queso Adobera
Seleccionar, evaluar y caracterizar bacterias ácido-lácticas con potencial biotecnológico

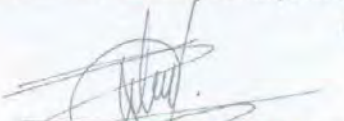
2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil y Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay


3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada y en el Centro Nacional de Recursos Genéticos


que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.


4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis


Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay
Aspirante


Dr. Raúl J. Delgado Macuil
Presidente del Colegio


M. en C. José Martín Ruvalcaba Gómez


Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada



SIP-14-BIS

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de lardizabal siendo las 14:00 horas del día 5 del mes de febrero del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA Tlaxcala para examinar la tesis titulada:
Estudio de la microbiota asociada a la producción de queso Adobera artesanal y sus perspectivas biotecnológicas

Presentada por el alumno:

<u>Ruvalcaba</u>	<u>Gómez</u>	<u>José Martín</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro:		
B	1	6
1	3	5
2		

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil



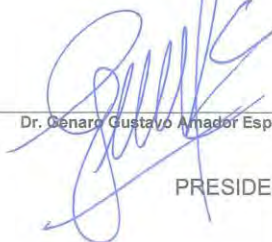
Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay



Dr. Marlon Rojas López



Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas



Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo



Dr. Víctor Eric López y López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES NACIONAL
Unidad Tlaxcala
DIRECCIÓN



Dra. Diana Verónica Cortes Espinosa



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala el día 04 del mes febrero del año 2020, el que suscribe José Martín Ruvalcaba Gómez alumno del Programa de Doctorado en ciencias en Biotecnología con número de registro B161352, adscrito al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Raúl Jacobo Delgado Macuil y Ramón Ignacio Arteaga Garibay y cede los derechos del trabajo intitulado Estudio de la Microbiota Asociada a la producción de queso Adobera Artesanal y sus perspectivas Biotecnológicas, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ruvalcaba.josemartin@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



José Martín Ruvalcaba Gómez

Contenido

RESUMEN	xiv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	xviii
ESTADO DEL ARTE	1
La cadena de producción de leche en México.	1
La agroindustria quesera mexicana.....	2
<i>Los Quesos Genuinos Mexicanos</i>	2
Microbiota de quesos artesanales: un eslabón para su entendimiento y revalorización.	4
<i>Microbiología cultivo-dependiente, Inocuidad microbiológica y quesos artesanales</i>	4
<i>Las ciencias –ómicas y su aporte al entendimiento de la microbiota</i>	8
<i>Fuentes de enriquecimiento de la microbiota en quesos artesanales</i>	11
<i>Beneficios asociados a la microbiota de quesos artesanales</i>	13
Microbiota de Quesos Mexicanos Genuinos como objeto de estudio	18
Bacterias ácido-lácticas: protagonistas en la microbiota de quesos artesanales	23
Referencias.....	26
DIRECTRICES DEL ESTUDIO	35
Argumento de estudio.....	35
Hipótesis	36
Objetivos	36
Objetivo General.....	36
Objetivos específicos.....	36
Descripción general del proyecto	37
Estrategia metodológica general	38
Diseño Experimental y análisis estadístico.....	39
ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO	41
Resumen	42
Introducción	43
Estrategia metodológica	49
<i>Toma de muestras</i>	49
<i>Extracción de DNA metagenómico</i>	49
<i>Generación de amplicones del gen 16S rDNA y secuenciación masiva de siguiente generación.</i>	50
<i>Análisis bioinformático de las secuencias</i>	50

Resultados y discusión	51
Conclusiones.....	68
Referencias	69
DESCRIPCIÓN DE TEXTURA Y COMPOSICIÓN DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO	73
Resumen	74
Introducción	75
Estrategia metodológica	79
<i>Toma de muestras</i>	79
<i>Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier</i>	79
<i>Procesamiento de los datos</i>	80
Resultados y discusión	81
<i>Diferenciación de muestras de queso adobera artesanal mediante FTIR</i>	81
<i>Generación y validación de modelos de predicción para evaluar perfil de textura en queso Adobera artesanal.</i>	83
<i>Generación y validación de modelos de predicción para evaluar la composición fisicoquímica de queso Adobera artesanal</i>	89
Conclusiones	94
Referencias.....	95
PERFIL DE INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO.....	97
Resumen	98
Introducción	99
Estrategia metodológica	102
<i>Toma de muestras</i>	102
<i>Análisis microbiológico de queso Adobera</i>	102
<i>Análisis estadístico</i>	102
Resultados y discusión	103
<i>Indicadores microbiológicos en queso Adobera</i>	103
<i>Aislamiento de bacterias ácido-lácticas</i>	105
Conclusiones	107
Referencias.....	108
INTEGRACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO-LÁCTICAS AUTÓCTONAS DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO	110
Resumen	111
Introducción	112

Estrategia metodológica	115
<i>Toma de muestras</i>	115
Aislamiento y selección	115
<i>Consevación</i>	116
<i>Extracción de DNA genómico</i>	116
<i>Amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA</i>	116
<i>Identificación especie específico para cepas de Lactobacillus de los grupos Plantarum y casei</i>	117
<i>Secuenciación multi-locus para L. plantarum</i>	117
Resultados y discusión	119
<i>Aislamiento, recuperación y conservación de BAL</i>	119
<i>Identificación especie-especifico de cepas de Lactobacillus</i>	122
<i>Secuenciación multi-locus para Lactobacillus plantarum</i>	123
Conclusiones	126
Referencias	127
EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS AUTÓCTONAS DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO.....	131
Resumen	132
Introducción	133
Estrategia metodológica	137
<i>Selección de cepas</i>	137
<i>Evaluación in vitro del potencial tecnológico y probiótico de BAL</i>	137
Resultados y discusión	139
Conclusiones	147
Referencias	148
BIOTECNOLOGÍA Y BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS: APROVECHAMIENTO DE BAL AUTÓCTONAS DE QUESO ADOBERA ARTESANAL.....	152
Resumen	153
Abstract	154
Introducción	155
MATERIALES Y MÉTODOS	157
Microsilos experimentales	157
<i>Toma de muestras</i>	158
<i>Cambios en el pH de la excreta</i>	158
<i>Evaluación microbiológica</i>	158

<i>Análisis estadístico</i>	159
Resultados y Discusión	160
<i>Disminución del pH</i>	160
<i>Evaluación microbiológica</i>	161
Conclusiones	170
Referencias	171
PUBLICACIONES ASOCIADAS	177

Índice de tablas

Tabla 1.1 Principales géneros bacterianos encontrados en muestras de queso Adobera artesanal en diferentes etapas de elaboración y dos temporadas del año	60
Tabla 2.1 Análisis PLS para perfil de Textura y FTIR de queso adobera comercial	84
Tabla 2.2 Principales regiones espectrales de importancia para la predicción de atributos de textura en queso adobera	88
Tabla 2.3 Perfil de Textura de muestras de queso adobera artesanal de los Altos de Jalisco en dos temporadas del año	89
Tabla 2.4 Análisis PLS para perfil de composición y FTIR de queso adobera comercial.....	90
Tabla 2.5 Composición fisicoquímica de muestras de queso adobera artesanal de los altos de Jalisco estimada a partir de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	92
Tabla 4.1 Primers utilizados para el análisis multi locus para evaluar diversidad intraespecie en <i>L. plantarum</i>	118
Tabla 4.2 Variaciones en las secuencias de los 6 locus utilizados para la tipificación de <i>L. plantarum</i>	124
Tabla 4.3 Asignación del número de alelo por cada locus evaluado para la tipificación de cepas de <i>L. plantarum</i>	125
Tabla 6.1 Formulación de los silos experimentales	157
Tabla 6.2. Determinación de diferentes grupos indicadores de microorganismos durante el ensilaje de excretas porcinas.	163
Tabla 6.3 efecto de la fuente de carbohidratos (FC) y la fuente de bal (FI) sobre la reducción del pH Y bacterias durante el ensilaje de estiércol porcino	167

Índice de figuras

Figura 1.1 Ejemplificación de asignación de identidades a diferentes niveles taxonómicos de acuerdo a las diferentes regiones hipervariables del gen 16S rDNA	52
Figura 1.2 Curvas de rarefacción para los diferentes estimadores de diversidad alfa de la comunidad bacteriana de muestras de queso Adobera artesanal en diferentes etapas de elaboración	53
Figura 1.3 Tabla de abundancia a nivel Phyla para las muestras de queso Adobera	54
Figura 1.4 Tabla de abundancia a nivel Clase para las muestras de queso Adobera	55
Figura 1.5 Tabla de abundancia a nivel de Orden para las muestras de queso Adobera	57
Figura 1.6 Tabla de abundancia a nivel de Familia para las muestras de queso adobera	58
Figura 1.8 Tabla de abundancia a nivel de género para las muestras de queso adobera	59
Figura 1.9 Gráfico de componentes principales para muestras de queso adobera	62
Figura 1.10 Árbol de abundancia de los principales géneros bacterianos en queso Adobera ..	63
Figura 1.11 Gráfico de coordenadas principales (PCoA) para muestras de queso adobera en dos temporadas del año.....	64
Figura 1.12 Gráfico de coordenadas principales (PCoA) para muestras de queso adobera en dos temporadas del año	65
Figura 1.13 Esquematación de la interacción entre los géneros bacterianos de mayor abundancia en queso Adobera artesanal	66
Figura 2.1 Espectro FTIR de (a) concentrado de proteína de suero y (b) Queso suizo.	77
Figura 2.2 Espectro de Infrarrojo característico para queso Adobera	81
Figura 2.3 Análisis de componentes principales de espectros FTIR de muestras de queso adobera artesanal	82
Figura 2.4 Gráficas de respuesta de PLS para la predicción de atributos de textura en queso adobera	86
Figura 2.5 Gráficas de respuesta de PLS para la predicción de la composición de queso Adobera	91
Figura 2.6 Representación esquemática de las correlaciones de Pearson ($p < 0.05$) entre la composición del queso Adobera artesanal, sus atributos de textura y los principales géneros bacterianos de su microbiota.	93
Figura 3.1 Perfil de inocuidad microbiológica de queso Adobera elaborado artesanalmente en diferentes queserías	104
Figura 3.2 Aislamiento y selección de BAL de queso adobera artesanal	106
Figura 4.1 Descripción esquemática de la filogenia de las bacterias ácido-lácticas	113
Figura 4.2 Producto de la amplificación por PCR del gen 16S ribosomal	119
Figura 4.3 Filograma de 98 cepas de BAL de queso Adobera.....	121

Figura 4.4 Diferenciación de cepas del grupo de <i>L. plantarum</i> a través del uso de iniciadores especie-específico para el gen recA	122
Figura 4.5 Diferenciación de cepas del grupo de <i>Lactobacillus casei</i> a través de amplificación por PCR de la región V1 del gen 16S rDNA	123
Figura 5.1 Crecimiento de BAL autóctonas de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco bajo diferentes condiciones de estrés	140
Figura 5.2 Adhesión a mucina porcina exhibida por bacterias ácido lácticas aisladas a partir de queso Adobera de los Altos de Jalisco	141
Figura 5.3 Capacidad proteolítica de cepas de BAL aisladas a partir de queso Adobera de los Altos de Jalisco	142
Figura 5.4 Inhibición de microorganismos patógenos mediante su crecimiento en presencia del sobrenadante libre de células de cultivo de BAL autóctonas de queso Adobera de los Altos de Jalisco	143
Figura 6.1 Valores de pH durante el proceso de ensilaje de cerdaza	160
Figura 6.2 Comportamiento microbiológico del ensilado de estiércol porcino con diferentes formulaciones	162

RESUMEN

El presente estudio está centrado en el estudio minucioso de la comunidad bacteriana de un producto lácteo artesanal cuya complejidad se puede vislumbrar desde la peculiaridad del propio producto hasta el amplio potencial de sus integrantes. Para una mayor comprensión de esta comunidad, se ha recurrido a diferentes perspectivas, desde una general en la que se puede identificar como está compuesta y estructurada la comunidad en su totalidad como responsable principal de las características composicionales y sensoriales del queso, seguida de la búsqueda de microorganismos de relevancia biotecnológica, su perfil genotípico, fenotípico, tecnológico y probiótico; hasta llegar a su manipulación para favorecer procesos biotecnológicos de naturaleza diversa en los que también pueden fungir como elementos principales, como es la biorremediación.

En el **capítulo 1** se incluye información relacionada con la composición y estructura de la comunidad bacteriana del queso adobera artesanal. Para ello se hizo uso de una plataforma de secuenciación masiva mediante el análisis parcial del marcador molecular 16S rDNA. Se observó que la comunidad bacteriana del queso es megadiversa, aunque fuertemente representada por pocos géneros bacterianos, principalmente pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas, y su estructura está determinada por las diferentes etapas de elaboración, así como influenciada por un efecto de estacionalidad.

En el **capítulo 2** se hace uso de la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) para generar el perfil de composición y textura del queso, basado en la generación, validación y aplicación de modelos de predicción a través de análisis de regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS). El perfil del queso se complementó además mediante análisis sensorial con una prueba de aceptabilidad de producto. Los resultados muestran que el queso adobera es un queso semiduro de elevado grado de aceptabilidad sensorial.



Basado en el hecho que de la microbiología dependiente de cultivo sigue siendo el estándar para la evaluación de productos lácteos y alimentos en general, en el **capítulo 3** se hace referencia al perfil de inocuidad microbiológica del queso adobera artesanal de acuerdo a los procedimientos sugeridos por la normatividad aplicable vigente. Por su origen artesanal, el queso mostró un contenido elevado de bacterias, incluido *Staphylococcus aureus*.

El **capítulo 4** describe la conformación de una colección de bacterias ácido lácticas autóctonas de queso Adobera artesanal que incluye los criterios de su aislamiento y selección, así como la información relacionada con su identificación genética. Los principales géneros bacterianos aislados fueron *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Mientras que para *Lactobacillus*, el género más abundante en los aislamientos, la especie predominante fue *L. plantarum*; por lo que, el estudio se complementa mediante la inclusión de un esquema de identificación basado en multi locus (MLST) específicamente para la tipificación intra-especie.

El **capítulo 5** detalla el perfil fenotípico y probiótico de cepas de bacterias ácido lácticas representativas de la colección conformada en el capítulo 4. Muchas de las cepas evaluadas mostraron capacidad positiva ante diferentes condiciones de estrés (pH, osmótico, temperatura), así como buen potencial probiótico (tolerancia a sales biliares, proteólisis, inhibición de patógenos, agregación).

Finalmente, con el objetivo de diversificar y demostrar el potencial biotecnológico de las bacterias ácido lácticas, en el **capítulo 6** se detalla como es el desempeño de este tipo de bacterias aplicado a un proceso de descontaminación de estiércol porcino, mediante lo que se demostró la capacidad de un grupo de BAL para la reducción significativa de diferentes grupos indicadores de microorganismos y patógenos de interés en este tipo de residuos.

SUMMARY

This study was focused on the thorough study of the bacterial community of an artisanal dairy product, whose complexity can be glimpsed from the peculiarity of the product itself to the wide potential of the bacteria that comprise it. For a better understanding of this community, different perspectives have been applied, from a general one, in which composition and structure of the community was elucidated, as well as a first approach to knowing the role that this community plays in the development of compositional and sensory characteristics of cheese, followed by the search of microorganisms of biotechnological relevance, their genotype, phenotype, technological and probiotic profile; until reaching its manipulation to favor biotechnological processes of diverse nature in which they can also function as main elements, such as bioremediation.

Chapter 1 includes information related to the composition and structure of the bacterial community of artisan adobera cheese. For this, a massive sequencing approach was used by partial analysis of the 16S rDNA molecular marker. It was observed that Adobera cheese's bacterial community is mega-diverse, although strongly represented by few bacterial genera, mainly belonging to the group of lactic acid bacteria, and its structure is determined by the different processing stages as well as influenced by a seasonality effect.

Chapter 2 explore the use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to determine the composition and texture profile of cheese, based on the generation, validation and, application of prediction models through partial least square regression analysis (PLS). Cheese profile was complemented by sensory analysis with a product acceptability test. The results showed that Adobera cheese corresponded to a semi-hard cheese with a high degree of sensory acceptability.

Based on the fact that culture-dependent microbiology remains standard for the evaluation of dairy products and food in general, **Chapter 3** refers to the microbiological safety profile



of artisanal Adobera cheese according to the procedures suggested by the applicable regulations. By its artisanal origin, cheese showed a high content of bacteria, including *Staphylococcus aureus*.

Chapter 4 describes the conformation process of an active lactic-acid bacteria collection isolated from artisanal Adobera cheese samples, describing the criteria for its isolation and selection as well as information related to its genetic identification. The main bacterial genera isolated were *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* and *Streptococcus*. While for *Lactobacillus*, the most abundant genus found was *L. plantarum*; Therefore, the study was complemented by the inclusion of a multilocus-based identification scheme (MLST) specifically for intra-species typing.

Chapter 5 details the phenotypic and probiotic profile of lactic-acid bacteria strains representative of the collection formed in chapter 4. Many of the assessed strains showed positive capacity under different stress conditions (pH, osmotic, temperature), as well as good potential probiotic (bile salt tolerance, proteolysis, pathogen inhibition, aggregation).

Finally, aimed to diversify and demonstrate the biotechnological potential of lactic acid bacteria, **Chapter 6** details how was the performance of this type of bacteria applied to a process of decontamination of pig manure, through which, the ability of a lactic acid bacteria group was demonstrated, in terms of significant reduction of different indicator groups of microorganisms and pathogens of interest in this type of waste.

INTRODUCCIÓN

Los quesos tradicionales artesanales se producen alrededor de todo el mundo y, por la relación que tiene su producción con el ambiente y la naturaleza, se han catalogado como un ejemplo de agricultura sustentable por lo que en ciertas regiones se ha tenido especial cuidado hacia las comunidades rurales en donde la fabricación, uso y distribución de este tipo de productos juega un papel importante. La particularidad en este tipo de quesos es que su elaboración y consumo es tradicional e incluso puede estar relacionado a festividades o a una región geográfica específica, y su elaboración se lleva a cabo a través de procesos transmitidos de generación en generación (saber-hacer), principalmente con poca tecnificación y poco o nulo procesamiento previo de la leche utilizada.

El consumo de productos artesanales ha sido creciente en la última década, al igual que la tendencia en los consumidores de dar mucho mayor importancia a la calidad de los productos que adquieren, además de que al existir en el mercado una amplia gama de productos, la información que se entrega al consumidor debe ser clara e incluir datos como el origen del mismo, beneficios asociados a su consumo, composición, etc.; de manera que el consumidor tenga los elementos suficientes para hacer la mejor elección. Esto genera que cada vez el mercado cuente con nichos especializados, donde la demanda de algún producto (artesanal) sea mayor, o que el producto demandado sea endémico de alguna región geográfica específica; lo que a su vez ha llevado a ciertas comunidades o estados a generar esquemas de protección como la “denominación de origen”.

En México se ha conformado un catálogo de quesos artesanales originales que incluye alrededor de 40 variedades, de las cuales al menos 17 se ha reportado se elaboran a través de procesos artesanales. La producción de cada queso se encuentra asociada a nichos agroecológicos específicos, aunque en algunos casos, su popularidad y creciente



demanda ha permitido que la producción salga de sus regiones de origen y se difunda a lo largo y ancho del territorio nacional.

Particularmente, en los quesos artesanales, cuya elaboración se distingue por el uso de leche cruda (sin pasteurizar); los sabores y propiedades organolépticas distintivas se asocian principalmente con atributos específicos de la leche cruda utilizada como son la nutrición de la vaca lechera, el proceso (original y peculiar) y la microbiota “natural”, que es la responsable directa del proceso de fermentación y maduración (en función del tipo de queso). En ese contexto, se ha descrito que la microbiota de la leche cruda que se utiliza para la elaboración de quesos artesanales puede poseer una riqueza muy elevada, la cual se asocia al contacto de la leche con los diferentes ambientes a los que es expuesta antes y durante su procesamiento. Esta microbiota principalmente se ha reportado que está constituida principalmente por bacterias de los phylum *Firmicutes* (mayormente representado por el grupo de bacterias ácido lácticas) como *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconotocaceae* y *Streptococcaceae*; Actinobacteria (asociadas a quesos madurados) Bacteroidetes y Proteobacteria. Se ha reportado además la incidencia de levaduras (por ejemplo, de los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia* y *Saccharomyces*, entre otras); lo que hace que la microbiota de estos quesos sea compleja y de interés biotecnológico; además de que cambios en la composición y estructura de esta microbiota podría resultar en modificaciones del perfil composicional y sensorial del queso.

Por otra parte, el aislamiento y aprovechamiento de cepas específicas asociadas con la producción de quesos artesanales con fines biotecnológicos, genera la necesidad de contar con reservorios suficientes de cada microorganismo; razón primordial para el establecimiento de colecciones de microorganismos, las cuales constituyen una estrategia esencial para la conservación de la biodiversidad, con las funciones principales de mantenimiento y suministro de cultivos microbianos, para su disponibilidad y aplicación a desarrollos biotecnológicos. Además, la conformación de colecciones de bacterias autóctonas de quesos artesanales ha permitido elucidar características fenotípicas cepa- y producto-dependiente, y principalmente para bacterias ácido-lácticas



se ha establecido que algunas de estas pueden presentar potencial para ser aprovechadas como microorganismos probióticos o para ser incluidos en desarrollos tecnológicos diferentes a los de su origen.

El presente trabajo de tesis estuvo dirigido hacia el estudio integral de la microbiota del queso Adobera artesanal, un queso genuino mexicano elaborado principalmente en la región Altos Sur del estado de Jalisco. El estudio parte de una descripción del queso en términos de microbiota, composición, aspectos sensoriales e inocuidad microbiológica; seguido del aislamiento, selección, identificación, caracterización y conservación de cepas de bacterias ácido lácticas autóctonas del mismo queso que permitió establecer una colección activa de microorganismos y su potencial biotecnológico y probiótico. Finalmente se describe la capacidad de bacterias ácido-lácticas para la descontaminación de excretas porcinas, como una propuesta para la diversificación en su aprovechamiento.

ESTADO DEL ARTE

La cadena de producción de leche en México.

En 2013 México ocupó el 15º lugar como país productor de leche con una producción de 10,966,000 toneladas del producto. Esto significa que México produce 2 de cada 100 litros de leche que se producen en el mundo. Además, la producción de este alimento ha mantenido un crecimiento anual en los últimos cinco años de entre 0.5 y 2%, con lo que en 2018 la producción cerró con 12,009,000 ton ([Agricultura, 2019](#)).

Los principales estados productores de leche en el país son Jalisco (20.25%), Coahuila (11.27%), Durango (10.21%), Chihuahua (9.40%), Guanajuato (7.08%), Veracruz (6.03%), Puebla (3.71%), México (3.58%) e Hidalgo (3.43%) ([Agricultura, 2019](#)). La leche se produce bajo tres esquemas, diferenciados por el tipo y número de cabezas de ganado que concentran por explotación, el nivel de adopción de tecnología y las condiciones de producción. Esos tres esquemas o sistemas de producción son el sistema intensivo, el sistema doble propósito y el sistema familiar ([Camacho et al. 2017](#)).

El principal destino de la leche que se produce en el territorio nacional es para la elaboración de productos lácteos, y se estima que al menos el 35 % de la leche producida en el país se destina a la elaboración de queso ([Agricultura, 2019](#)), lo que resulta en una producción de alrededor de 419,000 toneladas anuales de este derivado.

La agroindustria láctea en México, se encuentra comprendida por grandes firmas transnacionales que abarcan gran parte de la leche que se produce en el territorio nacional, y por miles de empresas micro, pequeñas y medianas que se especializan en la transformación de leche en derivados, incluida una amplia variedad de quesos. En 2009 se reportó que la agroindustria lechera mexicana contaba con 1,961 unidades manufactureras oficiales y un sinnúmero de pequeñas y medianas que operan de manera

informal. Se considera una importante fuente de empleo (más de 46,103 empleos directos y más de 400,000 indirectos). Hacia el año 2000 la industria formal captaba el 80% de la leche a nivel nacional, mientras que el 20% restante era procesado, como queso principalmente, por la industria informal. La agroindustria láctea también se concentra regionalmente, y se reporta que más del 40% del PIB que genera se resume a tres estados: Jalisco, México y Distrito Federal; de los cuales, Jalisco destaca como el principal productor de leche en el país (18% al valor de la producción nacional de leche) (Pomeón y Cervantes 2010).

La agroindustria quesera mexicana

Como ya se mencionó, se estima que alrededor del 35% de la leche que se produce en el país se destina a la producción de queso; con un incremento anual promedio de 6% en la producción de este derivado. Los principales quesos elaborados en el territorio nacional incluyen queso Amarillo, Chihuahua, crema, doble crema, fresco, Manchego, Oaxaca y Panela (Agricultura, 2019); no obstante, gran parte del queso que se produce en el país es procesado en pequeñas y medianas industrias, además de un número importante de empresas que operan de manera informal. En ese sentido, un eslabón importante de la industria quesera en el país son los quesos genuinos mexicanos y la quesería artesanal.

Los Quesos Genuinos Mexicanos

En México se comercializa una gran cantidad de quesos tanto genuinos como de imitación; extranjeros y mexicanos de origen extranjero. Un hecho a destacar es que, se tienen identificados cerca de 40 tipos de quesos catalogados como genuinos, de los cuales, al menos 17 se elaboran de manera artesanal incluidos los quesos Adobera, Oaxaca, asadero, de poro, Cotija, entre otros; cuya producción generalmente se asocia y se mantiene en pequeñas cuencas o regiones especializadas en la producción de cada uno de estos quesos (Pomeón y Cervantes 2010, Villegas de Gante y Cervantes 2011).

Los quesos artesanales genuinos mexicanos son elaborados por micro, pequeña y medianas industrias, en muchas ocasiones localizadas en rancherías y pequeños pueblos, a través de procesos rústicos y con deficiente control de calidad, pero con una importante participación de la gastronomía regional y, en algunos casos, nacional (Cervantes et al. 2008). Estos quesos principalmente se elaboran con leche proveniente de sistemas de producción familiar y tropical.

En el caso del sistema de lechería familiar, su importancia radica en la cantidad de explotaciones que operan bajo este esquema, lo que representa cerca del 35% de las unidades de producción de leche a nivel nacional que aportan cerca del 12% de la leche que se produce en el país, lo que posiciona a este sistema en un importante proveedor de la industria quesera artesanal. Lamentablemente, una de las principales adversidades que enfrenta este sistema de producción es la poca implementación de prácticas adecuadas de obtención de leche que garanticen la inocuidad del producto y cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos por la normatividad vigente, lo que como consecuencia, limita su rentabilidad y compromete la calidad de los derivados que se elaboran a partir de ella, principalmente los artesanales (Cervantes et al. 2008, Ruvalcaba-Gómez et al. 2011, Cervantes y Villegas de Gante 2012).

Aunado a lo anterior, se señala que las principales problemáticas que enfrentan los quesos mexicanos genuinos, es la calidad variable en cuanto a composición, inocuidad microbiológica y características sensoriales, altos costos de producción por falta de tecnología que eficiente los procesos, problemas de comercialización por no garantizar suficiente volumen de producción, falta de estrategia de mercado, e incumplimiento de normatividad vigente aplicable, sobre todo la que tiene que ver con aspectos higiénico-sanitarios (Cervantes y Villegas de Gante 2012).

Por otra parte, los productores que transforman leche en derivados lácteos y la quesería artesanal, tienen como fortaleza, en términos de competitividad, fuertes vínculos con la cultura gastronómica local, por lo que un aspecto fundamental que se debe considerar



en estos sistemas es que, los derivados lácteos que producen conserven sus características organolépticas y garanticen su inocuidad (Cesín et al. 2007).

Microbiota de quesos artesanales: un eslabón para su entendimiento y revalorización.

En el mundo existe una gran diversidad de productos artesanales o tradicionales que se encuentran bien ubicados y posicionados en el gusto de los consumidores. Este tipo de productos ha sido definido como “productos frecuentemente consumidos o asociados a una celebración específica o temporada del año, elaborados de una manera específica de acuerdo a la herencia gastronómica, con poco procesamiento/manipulación, distinguidos y conocidos por sus propiedades sensoriales y asociados a cierta localidad, región o país” (Guerrero et al. 2009, Montel et al. 2014). Dentro de esta definición se incluyen los quesos artesanales, o de leche cruda (sin pasteurizar). Muchos de estos quesos, por su originalidad y autenticidad, han sido reconocidos y protegidos a través de esquemas de denominación de origen y en algunos países comprenden una gran proporción del queso producido. En Francia, por ejemplo, se estima que del total de quesos artesanales que se producen, alrededor del 70% ya cuentan con dicha protección, y su elaboración se acota a una determinada región geográfica a través del saber-hacer y experiencia adquirida que involucra un procesamiento mínimo de la leche (Montel et al. 2014).

Microbiología cultivo-dependiente, Inocuidad microbiológica y quesos artesanales

Por su origen, los quesos artesanales frecuentemente son considerados como “no seguros” desde el punto de vista microbiológico, debido a la posibilidad de contaminación con microorganismos patógenos que puede ocurrir durante la obtención, manipulación y transporte de la leche, y prevalecer en el producto hasta después de la fabricación del queso (Rudol y Scherer, 2001, Masoud et al., 2012, Yoon et al. 2016). Algunos microorganismos potencialmente patógenos como *Brucella melitensis*, *Campylobacter* spp., *Coxiella burnetti*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp, han sido aislados a partir de leche cruda, mientras que otros (*B. melitensis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*

spp. y *S. aureus*) han sido catalogados como los principales microorganismos contaminantes encontrados en quesos elaborados con leche cruda (Food Standards Australia New Zealand 2009, Yoon et al. 2016).

En el sentido de abordar los riesgos sanitarios asociados a los quesos artesanales y de mejorar su calidad, hasta hace algunos años, la investigación se había centrado principalmente en evaluar los efectos de la implementación de prácticas adecuadas de fabricación, evaluar la calidad y composición de la leche cruda, controlar la tasa y el desarrollo de acidez en las diferentes etapas de producción para producir queso con atributos deseados y evitar la contaminación con microorganismos indeseables, así como en la búsqueda de microorganismos patógenos y evaluación de la calidad microbiológica de los quesos a través del uso de métodos dependientes de cultivo, los cuales siguen siendo considerados como la estrategia de mayor aceptación para monitorizar la calidad sanitaria y microbiológica de los quesos (William y Whitters 2010, Metz et al. 2020).

Más recientemente, algunos estudios se han centrado en caracterizar, fenotípica y molecularmente, la microbiota presente en leche cruda y productos elaborados a partir de la misma, con lo que se ha logrado desarrollar estrategias metodológicas apropiadas para estos fines y ha resultado en una mayor comprensión de las reacciones bioquímicas involucradas en la producción de queso, principales responsables de las características sensoriales del producto (Dasen et al. 2003, Adamberg et al. 2005, Aquilanti et al. 2007, Karahan et al. 2010, Rahimi et al. 2014, Terzic et al. 2015), por lo que ha sido necesaria la incorporación de técnicas que permitan comprender a los quesos de manera integral y establecer relaciones entre su composición, sus atributos organolépticos, la microbiota involucrada en su producción y los beneficios adicionales que puede representar su consumo.

Particularmente, en el contexto internacional, algunos quesos han sido abordados por diferentes grupos de investigación con lo que han logrado avanzar en su caracterización y aprovechar su potencial para aumentar su valor agregado, además de que en algunos casos ha servido para darles protección de origen. Ejemplo de ello es el queso *Serra da*



Estrella, un queso tradicional de Portugal elaborado a partir de leche cruda de cabra que cuenta con designación de origen. De este queso se ha documentado que puede contener bacterias ácido lácticas como *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, y *Lactobacillus plantarum*. Otras bacterias que se han reportado como autóctonas del queso *Serra da Estrella* incluye *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Escherichia freundii*, *Streptococcus faecalis ssp. Liquefaciens*, *Streptococcus durans*, *Pseudomonas convexa*, *Micrococcus epidermidis*, *Micrococcus candidus*, *Micrococcus cremoris ssp. Viscosi*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus mesentericus*. Se ha reportado también que la fermentación ácido láctica (además del típico aroma y sabor) de este queso, está asociada principalmente a la acción de un grupo de bacterias homofermentativas, que incluye *Streptococcus*, *L. plantarum* y *L. casei* (Macedo et al. 1993). Investigaciones complementarias que ayudan a la protección de la autenticidad de este queso también han sido llevados a cabo. Ejemplo de ello es la aplicación exitosa de las herramientas moleculares RAPD (amplificación aleatoria de DNA polimórfico) y SCAR (secuencia amplificada caracterizada por región) para la detección de adulteraciones con leche diferente a la establecida para la elaboración de este queso, lo que resultó en la base para el diseño de un método de cribado de bajo costo, confiable, rápido y sensible que brinda información del origen de la leche usada para la elaboración del queso *Serra da Estrella* (Cunha et al. 2016). Más recientemente algunos reportes han complementado la información disponible de este queso, como, por ejemplo, que al finalizar su proceso de maduración (45 días) hay acumulación de aminoácidos libres, tanto esenciales como no-esenciales, asociados a los procesos de proteólisis que la maduración involucra, lo cual, a través de su consumo, puede contribuir a satisfacer la demanda de aminoácidos en adultos, además de que el perfil de aminoácidos libres en este queso presenta tal variabilidad entre fabricante, que tiene potencial para ser utilizado como un identificador del productor de origen del queso y verificar su autenticidad (Reis et al. 2019)

Otro ejemplo de abordaje multidisciplinario para el estudio de quesos artesanales es la investigación reportadas sobre el queso *Beyaz peynir*. Se trata de la variedad de queso más popular en Turquía, con una producción de más de 360,000 toneladas anuales



(Hayaloglu 2017) y se caracteriza por ser un queso salado y madurado de 1 a 3 meses en salmuera (12-14 % NaCl). El resultado es un queso sin corteza, color blanco, de textura lisa (sin formación de ojos), sabor ácido y salado, ligeramente picante y textura suave a semi-dura en función del grado de maduración (Hayaloglu et al. 2002, 2017). En 2002 se reportaba que, pese a que este queso se elabora a gran escala, no había suficiente entendimiento de aspectos primordiales del mismo, incluidos el tipo de microorganismos iniciadores involucrados en su elaboración y sus proporciones, lo relacionado con su maduración con salmuera (concentración de sal óptima, temperatura, cinética de absorción y difusión de sal, etc.), la microbiota involucrada en su elaboración (incluidas bacterias ácido lácticas no iniciadoras y levaduras) y aspectos relacionados con la proteólisis, como la identificación de péptidos y aminoácidos producto de la maduración (Hayaloglu et al. 2002), lo que direccionó la investigación que en años más recientes se desarrollaría sobre este queso. En ese sentido, con el objeto de aprovechar parte de la porción de microorganismos cultivables de la microbiota, aumentar el valor agregado y mejorar la calidad del queso *Beyaz*, Karahan *et al* en 2010, seleccionaron cepas de bacterias ácido lácticas (previamente aisladas, identificadas y caracterizadas) de las cuales probaron ocho como cultivo iniciador en queso *Beyaz*, en el que llegaron a la conclusión de que, las dos combinaciones de BAL propuestas afectaron las propiedades químicas y microbiológicas del queso durante la maduración, y favorecieron el desarrollo de algunas propiedades importantes del queso como características de la maduración, pH y conteos de lactobacilos y *Lactococcus*; además de que en términos de atributos de calidad los quesos evaluados fueron comparables con su contraparte, un queso elaborado mediante el uso de un cultivo comercial.

Más recientemente, la introducción de herramientas genómicas ha jugado un papel importante en la comprensión de la dinámica de las reacciones químicas y microbiológicas involucradas en la elaboración del queso, lo que ha contribuido a un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares e interacciones que determinan la funcionalidad, textura y características propias de cada queso (Lucey et al. 2003, Montel et al. 2014).

Las ciencias –ómicas y su aporte al entendimiento de la microbiota

Los métodos de evaluación de microbiota y microorganismos presentes en queso, basados en microbiología clásica cultivo-dependiente, han sido complementados mediante la aplicación de las denominadas ciencias “ómicas”; esto ha permitido atender el interés relacionado con conocer la composición y el papel que juegan los microorganismos que contiene la leche cruda destinada a la producción de queso y que al final conforman la comunidad microbiana del mismo además de una conceptualización holística de las biomoléculas responsables de la estructura, función y dinámica de consorcios de microorganismos que co-habitan en el mismo nicho ecológico. Las disciplinas involucradas en la cuantificación e identificación de estas biomoléculas relacionadas a la microbiota incluyen la metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica, basadas en el estudio de DNA, RNA, proteínas y metabolitos respectivamente, producidos por la comunidad microbiana en conjunto (Tilocca et al. 2019).

La aplicación de las herramientas –ómicas para el estudio de microbiota en queso ha permitido elucidar la composición y estructura de la comunidad microbiana de diversos quesos, modificaciones en la misma en respuesta a diversos factores, e hipotetizar funciones atribuidas a los genes secuenciados que potencialmente contribuyen al desarrollo de las características del producto (metagenómica). Por ejemplo, un estudio publicado recientemente sobre el perfil metagenómico de diversos tipos de queso Mozzarella de elevada humedad, mediante el uso de secuenciación masiva de siguiente generación, determinó que, tanto en los quesos elaborados con leche de vaca o leche de búfala, acidificados mediante la adición de cultivos comerciales, *Streptococcus thermophilus* fue el microorganismo dominante, mientras que en queso elaborado con leche de búfala y la adición de cultivos naturales de suero la prevalencia fue similar para *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus* y *S. thermophilus*; además de que se reportó la incidencia de un gran número de especies de bacterias ácido-lácticas no iniciadoras. También descubrieron que la microbiota es mucho más diversa en quesos elaborados con leche de vaca en relación a aquellos elaborados con leche de búfala, favorecido por mayor prevalencia de taxones psicofílicos en los primeros (posiblemente

por exposición prolongada a bajas temperaturas y más tiempo entre producción y consumo) y bacteria de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* en los segundos (Marino et al. 2019)

Conocer la composición y estructura de la microbiota representa un avance hacia la comprensión del impacto que esta tiene sobre el desarrollo de las características del queso, no obstante, resulta de suma importancia contar con evidencia de la expresión génica activa, de modo que genere evidencia de las actividades metabólicas involucradas o necesarias para el desarrollo de las características organolépticas. En ese contexto, la transcriptómica representa una herramienta útil para evaluar el perfil de expresión génica de una comunidad microbiana, desde un enfoque descriptivo hasta estudios orientados a ciertos grupos de genes involucrados en determinadas etapas o fases de elaboración del queso. Por ejemplo, en un estudio sobre el transcriptoma asociado a la proteólisis ejercida por bacterias ácido-lácticas durante la maduración del queso bryndza, elaborado a partir de leche de oveja, mediante transcriptómica-dirigida hacia un grupo de genes del sistema proteolítico de este grupo de bacterias, en combinación con metagenómica, se reveló información importante acerca de la actividad transcripcional de cuatro genes (*prtP*, *pepN*, *pepX* y *bcaT*) alojados en especies individuales de bacterias ácido-lácticas. La información obtenida permite sugerir que los lactococos, estreptococos y lactobacilos son los principales protagonistas en el proceso proteolítico en el queso bryndza; además de que la estrategia utilizada puede ser aprovechada para estudios del transcriptoma de otros tipos de queso (Pangallo et al. 2019).

Si bien a través de transcriptómica se aprovechan los transcritos de RNA (generalmente mRNA), se ha establecido una discrepancia entre la cantidad de transcritos y la abundancia de proteínas alcanzada, esto debido a la variabilidad en el tiempo de degradación de los transcritos, cambios alostéricos en el mRNA, variabilidad en la tasa de traducción a proteína y posibles modificaciones post-traduccionales, por lo que contar con evidencia de la expresión proteica es fundamental para evaluar la actividad metabólica de la microbiota (Roncada et al. 2012, Afshari et al. 2018, Tilocca et al. 2020). Diversas aplicaciones de la proteómica han sido aplicadas al estudio del queso bajo

diferentes perspectivas. Por ejemplo, con el objetivo de conocer el origen y calidad de la materia prima utilizada para la elaboración de queso Mozzarella Campana y regular el uso de productos semi-elaborados o leche almacenada por periodos superiores al recomendado; un aprovechamiento proteómico y electroforesis (SDS-PAGE y urea-PAGE) fue aplicado, con lo que se observaron patrones proteolíticos inusuales, además de que, mediante análisis de espectrometría de masas, se confirmó que la proteólisis en queso Mozzarella de búfala generó fragmentos característicos derivados de caseínas β y α -s₁, debido a la presencia de enzimas tanto endógenas como exógenas. El enfoque proteómico utilizado en el estudio, permitió identificar además fragmentos de caseína con potencial para ser usados como marcadores moleculares, y reveló fragmentos distintivos de la actividad de plasmina y su tasa de proteólisis (SDS-PAGE), así como fragmentos asociados a la acción de la quimosina (alkaline urea-PAGE) (Petrella et al. 2015).

Finalmente, en la aplicación de las ciencias –ómicas en la investigación en quesos, se encuentra el uso de la metabolómica, orientada hacia definir el conjunto de metabolitos producidos por los consorcios microbianos asociados con la producción del queso, así como su asociación a procesos fisiológicos. El metaboloma suele ser muy dinámico y puede brindar valiosa información sobre la causa de un fenotipo dado o efectos sistémicos de sustancias específicas y/o tratamientos experimentales en la microbiota asociada (Jordan et al. 2009, Tilocca et al. 2018, 2020). La metabolómica aplicada en alimentos ha sido de gran utilidad en los últimos años para diferentes aplicaciones, una de ellas ha sido discriminar entre variedades fraudulentas de algunos alimentos de aquellas genuinas mediante la generación de “huellas genómicas” que representan al alimento o matriz de interés (Castro-Puyana et al. 2017, Rochetti et al. 2018). Esta aplicación ha sido aprovechada en el estudio de quesos, tal es el caso de la aplicación de un enfoque metabolómico no-dirigido para discriminar, a través de huellas genómicas, quesos Grana Padano denominación de origen, de quesos Tipo-Grana sin denominación; lo cual fue posible mediante el uso de cromatografía líquida de ultra alta presión acoplada a espectrometría de masas y análisis jerárquico de conglomerados y proyecciones ortogonales para análisis discriminante de estructuras latentes. Principalmente lípidos (ácidos grasos y sus derivados, fosfolípidos y monoacilgliceroles), aminoácidos y

oligopéptidos, junto con compuestos derivados de plantas fueron los marcadores que soportaron el poder discriminatorio de la aplicación (Rochetti et al. 2018).

Fuentes de enriquecimiento de la microbiota en quesos artesanales

Se ha establecido que la microbiota de los quesos artesanales puede ser influenciada por diversos factores y tener diversas fuentes de origen. La primera de ellas se ha considerado que puede ser la microbiota que la leche cruda adquiere durante su obtención, manipulación y almacenamiento previo a su entrega al procesador. En función del tipo de leche (vaca, oveja o cabra), se estima que puede haber cuentas viables de bacterias de entre 10^2 y 10^4 UFC/ml de los principales grupos indicadores de bacterias de interés en leche (*Staphylococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Enterococcus* sp., bacterias productoras de ácido propiónico, *Enterobacteriaceae*, y *Pseudomonas* sp.). (Gaya et al. 1987, Muehlherr et al. 2003, Sevi et al. 2004, Casalta et al. 2009, Mallet et al. 2012, Masoud et al. 2011, Michel et al. 2001, Tormo et al. 2011, Montel et al. 2014), con variaciones entre granja y granja (de acuerdo al nivel de tecnificación y prácticas de obtención), así como en función de la época del año. La diversidad de microorganismos en leche es tan amplia, que se ha detectado presencia de más de 100 géneros y al menos 400 especies diferentes; principalmente bacterias Gram-negativas, Gram-positivas catalasa-positivas, bacterias ácido-lácticas, levaduras y hongos (Montel et al. 2014).

La microbiota de la leche puede enriquecerse por diversas fuentes de tipo ambiental, como son la ubre y piel del animal al ser secretada, los equipos y utensilios utilizados durante la ordeña, las manos de los operadores, la línea de transporte de leche y el tanque o contenedores para su almacenamiento y/o transporte previo a su transformación. Algunas otras fuentes que indirectamente pueden influenciar la composición de la microbiota de la leche cruda son los alimentos suplementados al ganado, el piso de los corrales donde permanece el animal, agua de lavado, y el aire de la sala de ordeño y el establo; por lo que, sobre todo en vacas, para mantener control sobre el tipo y cantidad de microorganismos que lleguen a la leche, es primordial asegurar

al máximo las condiciones de higiene durante el ordeño (Michel et al. 2001, Julien et al. 2008, Verdier-Metz et al. 2009, Tormo et al. 2011, Mallet et al. 2012, Montel et al. 2014).

La fuente primaria de transferencia de microorganismos hacia la leche es el canal del pezón, donde predomina la presencia de bacterias de los Phyla Actinobacteria y Firmicutes (*Clostridiaceae*, *Staphylococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Enterococcaceae*), así como, en menor proporción, Proteobacteria (Gill et al., 2006). La segunda fuente potencial de enriquecimiento de la microbiota en leche es la piel de la ubre, en donde se ha reportado que prevalecen principalmente estafilococos coagulasa negativos, cocos y bacterias corineformes, *Enterobacteriaceae*, bacterias asociadas a descomposición, bacterias ácido-lácticas, y bacterias Gram-negativas no-fermentadoras (como *Pseudomonas*). Finalmente, los biofilms formados en equipos de ordeña y los utensilios de plástico u otros materiales, pueden incrementar la carga microbiana en leche entre 3500-5000 UFC/ml (McKinnon et al., 1990, Montel et al. 2014).

La microbiota propia de la leche que se destina a la elaboración de queso (sobre todo artesanal) es primordial, ya que, eventualmente su composición jugará un papel muy importante en definir la microbiota núcleo del queso y la dinámica microbiana del mismo. En ese contexto, ciertas especies/cepas presentes en leche pueden sobrevivir y proliferar en queso, e incluso convertirse en parte de la microbiota dominante del mismo. Esto estará en función del potencial metabólico del microorganismo y su expresión génica (regulada en gran medida por las condiciones ambientales durante el procesamiento) (Montel et al. 2014, Gobbetti et al. 2018). En ese contexto, el proceso de elaboración de queso (sobre todo en quesos madurados), puede ser determinante para definir la microbiota de un queso (tanto de la corteza como del núcleo). Modificaciones en tiempos y temperaturas de maduración, o humedad relativa para el almacenamiento del queso, por ejemplo, pueden ser un factor indirecto para alterar el balance en la microbiota del queso; ya que estos factores (por sí solos o en conjunto) pueden estimular el crecimiento o aumento en la población de algún grupo de microorganismos y limitar a otros. Esto puede ser aprovechado como estrategia para el control de microorganismos no-deseados en queso e incluso para realzar características sensoriales de interés en el mismo; no

obstante, es importante conocer el tipo y proporción de microorganismos para evitar cambios drásticos o indeseados en el queso, así como efectos negativos sobre sus propiedades organolépticas (Callon et al. 2011)

Beneficios asociados a la microbiota de quesos artesanales

Se ha establecido que parte de la microbiota responsable de la producción de alimentos artesanales fermentados, incluido el queso, puede representar beneficios para los consumidores, como por ejemplo un efecto probiótico. En ese contexto, se considera a un microorganismo como probiótico cuando al ser ingerido vivo en concentraciones apropiadas exhibe un efecto benéfico sobre la salud del consumidor (humanos o animales). Muchos de estos efectos benéficos atribuidos a los probióticos son cepa-específicos y se relacionan, entre otros, al tracto gastro-intestinal, por lo que se atribuye en gran medida a la capacidad del microorganismo para sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal superior, supervivencia y proliferación en el intestino, tolerancia a ácido y sales biliares, capacidad de producir sustancias como bacteriocinas y adherencia a líneas celulares de intestino (Anadón et al. 2016).

Los principales microorganismos reportados y utilizados como probióticos están representados por bacterias ácido-lácticas y levaduras del género *Saccharomyces*. Específicamente, dentro de los microorganismos mayormente aprovechados como probióticos se incluyen *Streptococcus thermophilus* y diversas especies de *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*; en ese contexto grandes poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias en el tracto intestinal generalmente son indicador de un tracto gastrointestinal saludable, es por ello que muchos de los estudios orientados a evaluar el potencial probiótico se han centrado en bacterias de estos géneros e incluso, por sus propiedades tecnológicas, este tipo de microorganismos cada vez es más usado como adjuntos funcionales en productos lácteos y algunos productos nuevos como leche de soya, jugos de frutas, derivados cárnicos y alimentos elaborados a partir de cereales con beneficios fisiológicos documentados (Fung et al. 2011). Productos fermentados



como el queso pueden representar una fuente abundante de este tipo de microorganismos, especialmente aquellos del grupo de las bacterias ácido-lácticas.

Los mecanismos y efectos de microorganismos probióticos aún son objeto de investigación, con el principal objetivo de generar mayor entendimiento y aprovechar al máximo su potencial. No obstante, se sabe que estos microorganismos son capaces de sintetizar un gran número de metabolitos, principales responsables de sus propiedades benéficas. Particularmente, las bacterias ácido-lácticas y las bifidobacterias han mostrado capacidad de producir muchas sustancias de alto valor agregado, como son bacteriocinas, vitaminas, exopolisacáridos, entre otras. Además, se ha demostrado que el aislamiento y purificación de estos metabolitos permite elucidar importantes aplicaciones potenciales de los mismos, tanto en el sentido de ofrecer un efecto benéfico a la salud del humano como en mejorar procesos y calidad de productos fermentados. Su uso directo y su enriquecimiento en la microbiota humana ha permitido que, además de funcionar como probióticos, sirvan potencialmente como biomarcadores en algunos trabajos de investigación, sobre todo con fines de diagnóstico y predicción de enfermedades. Específicamente se ha reportado que la relación de *Bifidobacterium*/Enterobacteriaceae es considerada como un indicador de la resistencia del intestino a la colonización bacteriana, lo que a su vez esta relación se considera un indicador de la salud del microbioma humano; la cual, en personas con microbiomas saludables es mayor a 1, mientras que en pacientes con cirrosis o con infección por influenza aviar H7N9 se encuentra por debajo de 1 (Lu et al. 2011 y 2014, Wang et al. 2017)

En productos lácteos particularmente, estas bacterias pueden estar presentes desde la misma leche que se destina a la producción, hecho que no es exclusivo de algún tipo de leche. Por ejemplo, Edalati en 2018, a partir de muestras de leche cruda de camello realizó el aislamiento e identificación genética de cepas de BAL a partir de las cuales seleccionó al azar ocho, en las que incluyó *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides* y *Weissella confusa* para evaluar su actividad antagónica contra *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* PTCC 1431 y *E. coli* ATCC



25922, considerados como patógenos; a través de lo cual evidenció que las cepas evaluadas muestran actividad antagónica, siendo mayor esta contra la cepa de *S. aureus*.

Incluso la leche materna también puede ser vehículo de BAL probióticas, por lo que podría ser el primer contacto del humano con este tipo de microorganismos y contribuir a definir la microbiota intestinal del recién nacido. En una investigación conducida por [Gunyakti y Asan-Ozusaglam](#) en 2019 evaluaron el potencial probiótico de una cepa de *Lactobacillus gasei* MA-4 aislada a partir de leche materna. Los resultados reportados evidenciaron la alta tolerancia a parámetros esenciales como bajo pH, sales biliares y condiciones artificiales de fluidos estomacales y de intestino delgado; gran capacidad de autoagregación y co-agregación (95 y 45 % respectivamente), poca sensibilidad a la nisina, alta resistencia a benzoato de sodio y elevada capacidad de asimilación del colesterol, por lo que los autores concluyen que la cepa es un buen candidato para desarrollo de cultivos probióticos así como agente bioterapéutico y bioprotector.

Particularmente en quesos, los estudios reportados se basan en el aislamiento cultivo-dependiente de cepas potencialmente probióticas y su evaluación *in-vitro*. En ese contexto, la FAO/WHO establece los lineamientos para establecer un posible potencial probiótico de microorganismos y los criterios de selección para su inclusión en alimentos ([FAO/WHO 2002](#)). De manera general, el documento establece que uno de los primeros pasos es conocer el género y especie de la cepa microbiana, evidenciar su potencial probiótico *in vitro* (evaluar la resistencia a acidez gástrica, resistencia a acidez biliar, capacidad de adherencia a mucosa y/o células epiteliales humanas y otras líneas celulares, actividad antimicrobiana contra microorganismos potencialmente patógenos, capacidad para reducir la adhesión de patógenos a superficies, actividad hidrolítica de sales biliares y resistencia a espermicidas (aplicable para probióticos de uso vaginal). Finalmente deben asegurarse algunos aspectos relacionados con la seguridad en el uso como probióticos, como son determinación de resistencia a antibióticos, evaluación de ciertas actividades metabólicas, efectos secundarios durante estudios en humanos, vigilancia epidemiológica de incidentes adversos en consumidores, producción de toxinas y potencial hemolítico cuando se sospeche que la cepa pueda tener dicha capacidad.

Más recientemente, con el objetivo de homogeneizar criterios para la selección y caracterización de nuevas especies y cepas más específicas de probióticos [Pereira et al. \(2018\)](#) publicaron una actualización a los métodos y criterios de selección. En el documento se establece que la selección de los microorganismos deberá ser bajo un enfoque sistemático y menciona los requisitos mínimos que establecen la FAO/WHO (mencionados con anterioridad) apoyado en la experiencia científica reportada en diversas publicaciones internacionales. Además, en el enfoque sistemático propuesto se incluyen algunos requisitos alternativos que apoyen al investigador a que progresivamente reduzca el número de candidatos a probióticos bajo un criterio más estricto, de manera que al final solamente se seleccionen aquellas cepas que cumplan con un mayor número de propiedades funcionales y ausencia de rasgos considerados como negativos. Estos criterios adicionales incluyen la evaluación de propiedades funcionales asociadas al hospedero (actividad anticancerígena, anti-colesterémica, antidepresiva, ansiolítica, anti-obesidad, anti-diabética, inmunoestimulante y secreción de moléculas funcionales); requerimientos industriales (calidad sensorial, ensayos de viabilidad celular, estrés relacionado al procesamiento en alimentos y al almacenamiento) y caracterización basada en la aplicación de las ciencias “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica).

Este tipo de ensayos de caracterización se han llevado a cabo en BAL aisladas a partir de diversos quesos artesanales. Por ejemplo, a partir de queso artesanal Serpa, uno de los quesos portugueses con protección de origen más populares y relevantes, caracterizado por utilizar leche cruda de oveja en su fabricación (principalmente de la raza Merino) y extractos de *Cynara cardunculus* L. como coagulante para desarrollar sabor y aromas únicos ([Araújo-Rodrigues et al. 2020](#)), se aislaron y seleccionaron 116 bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* ([Gonçalves et al., 2017](#)). A través de ensayos *in vitro* se estableció el potencial probiótico de las cepas bacterianas (tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas, agregación, hidrofobicidad de la superficie celular, susceptibilidad a antibióticos, producción de aminas biógenas, crecimiento sobre prebióticos y producción

de ácidos grasos de cadena corta). Los resultados indicaron que 20 de las cepas evaluadas presentaron buena tolerancia a condiciones de estrés simuladas a las encontradas en tracto gastrointestinal, principalmente una cepa de *Lactobacillus brevis* con mayor capacidad de auto-agregación y elevado grado de hidrofobicidad; por otra parte, se descartaron ocho de las cepas debido a que presentaron resistencia a antibióticos y producción de aminas biógenas. El uso de lactulosa como prebiótico favoreció el crecimiento de lactobacilos y la producción de ácidos grasos de cadena corta, en lo que resaltan una cepa de *L. pentosus* como la mejor productora de este tipo de ácidos grasos y *L. plantarum* como mejor productor de ácido láctico (Ruiz-Moyano et al. 2019).

En otro estudio similar reportado por Caggia et al en 2015, referente a la actividad probiótica de cepas de *Lactobacillus* aisladas de dos quesos tradicionales italianos; concluyen que los quesos objeto de estudio son una fuente excelente de una amplia diversidad de bacterias ácido-lácticas que podrían ser seleccionadas de acuerdo a sus propiedades funcionales. Adicionalmente reportan que dos cepas seleccionadas a partir de los aislados, mostraron propiedades probióticas superiores en comparación con dos cepas de referencia.

Algunos otros estudios se han enfocado específicamente a la búsqueda de cepas que tengan la capacidad de inhibir microorganismos patógenos. En ese contexto y, para un aprovechamiento más aplicado de las propiedades antibacteriales de los probióticos, Ferrari et al. (2016) reportaron la selección y potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas autóctonas de leche cruda de cabra, con especial interés en la búsqueda de cepas con la capacidad de inhibir el crecimiento de *Salmonella typhi* en queso artesanal. De acuerdo a sus propiedades probióticas, los autores seleccionaron cuatro cepas candidatas a partir de un total de 60 aislados bacterianos. Las cuatro cepas seleccionadas exhibieron buena capacidad de producción de ácido láctico y poco ácido cítrico, capacidad de hidrolizar sales biliares, actividad β -galactosidasa y nula actividad decarboxilasa. Al incluir una mezcla de estas cepas en quesos artesanales de cabra inoculados con *Salmonella typhi* observaron una disminución de hasta 0.38 log₁₀ UFC/g,

con lo que concluyen que la mezcla utilizada de cepas de *Lactobacillus* mostró capacidad antibacteriana contra *S. typhi* tanto *in vitro* como en queso de cabra artesanal, lo que podría contribuir a la seguridad y valor funcional del producto.

Es importante resaltar que estudios recientes demuestran que las condiciones de procesamiento de acuerdo al tipo de queso, es un factor determinante que favorece o limita el potencial probiótico de las bacterias. Por ejemplo, durante la elaboración de queso Mozzarella (un queso de tipo *pasta filata*) el estiramiento de la cuajada tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de microorganismos probióticos, aunque la maduración de por lo menos 30 días favorece la recuperación de entre 10 y 100 veces la población del mismo. En ese mismo estudio, tras probar la efectividad de inoculación directa en la tina de un cultivo probiótico adjunto en la elaboración de queso Scamorza, concluyen que la inoculación del cultivo liofilizado a una concentración de 10^6 UFC/ml parece ser un método adecuado para la producción de un queso funcional que garantiza que el consumo de 100 g de producto proveerá de al menos 10^9 UFC/g del probiótico, sin representar cambios en las características sensoriales del queso (Reale et al. 2019).

Finalmente se ha demostrado la viabilidad del uso de algunos quesos como vehículos para contener bacterias probióticas y asegurar que lleguen integras al consumidor (Gomes de O. et al. 2014, Ricciardi et al. 2015). Ejemplo de ello es lo reportado por Lollo et al. en 2015, quienes, a partir de un estudio con ratas suplementados con un queso fresco popular en Brasil, adicionado con bacterias probióticas, concluyen que el consumo del producto resulta en un efecto profiláctico contra hipertensión y dislipidemia sanguínea.

Microbiota de Quesos Mexicanos Genuinos como objeto de estudio

Tal como ocurre en el contexto internacional, diversos grupos de investigación, productores, académicos y organismos regulatorios han hecho esfuerzos para documentar, caracterizar, salvaguardar y asegurar la calidad de los quesos que se producen en México, apoyados en diversas estrategias y herramientas de estudio. Es por ello que los quesos mexicanos genuinos se han convertido en parte de la identidad regional de cada uno de los lugares de origen, y por sus peculiaridades, las actividades

de investigación y desarrollo en este tema han sido orientadas hacia su rescate, caracterización y revalorización (Cervantes et al. 2008, Grass et al. 2013, Grass y Cesín 2013, Aldrete et al. 2014, Solís et al. 2013, Ruvalcaba et al. 2014,).

No obstante, a pesar de los avances en documentar lo relacionado con estos quesos; la información que existe de la mayoría de ellos aún es limitada. En algunos casos los avances han sido importantes y se han concretado resultados que favorecen el reposicionamiento y protección del producto. Ejemplo de ello es el queso Cotija que actualmente cuenta con una marca colectiva (Yescas 2013) y el cual sigue siendo objeto de estudio, sobre todo para evidenciar su inocuidad microbiológica (Flores-Magallon 2011, Morales 2011, Cervantes et al. 2012). El Cotija es un queso madurado artesanal, duro y prensado, de forma cilíndrica y peso de hasta 22 kg. Su nombre se relaciona con el pueblo Cotija, aunque su producción se origina y concentra en una pequeña región localizada a lo largo de la cordillera oriental de la sierra de Jalmich, entre los estados de Jalisco y Michoacán; no obstante, algunas otras versiones de este queso se producen en los estados de Jalisco, Michoacán, Veracruz y Chiapas, consideradas como queso de imitación. Recientemente, gracias a la contribución de grupos de académicos, la producción de queso Cotija fue regulada y estandarizada mediante la creación de una norma específica (NMX-F735-COFOCALEC-2011) (González-Córdova et al. 2016).

En términos de microbiota, a partir del análisis de secuencias del gen 16S rDNA por metagenómica, se reporta que la comunidad bacteriana del queso Cotija está principalmente representada por tres géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weisella*, y por más de 500 géneros no-dominantes pertenecientes a 31 phyla (bacterias y arqueas). Los resultados se corroboraron mediante el análisis de genes marcadores de copia única, con lo que se logró una resolución mayor en la asignación taxonómica y pudo llevar a nivel de especie. Interesantemente, bacterias consideradas como patógenas, tales como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella* o *Mycobacterium* no fueron encontradas. Según la composición del microbioma de queso Cotija (considerado uno de los metagenomas más diversos dentro de las comunidades microbianas asociadas a productos fermentados), se infiere que la tiene la capacidad metabólica para la síntesis de un gran

número de compuestos de aroma y sabor, asociados principalmente al metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y ácidos grasos libres. También fue posible encontrar genes asociados a la producción de bacteriocinas e inmuno-estimulantes (Escobar-Zepeda et al. 2016).

Otros quesos han sido estudiados desde el punto de vista higiénico-sanitario y, en su mayoría, aquellos que mantienen procesos artesanales de elaboración han presentado problemas con cuentas elevadas de diferentes grupos de microorganismos indicadores de contaminación y microorganismos potencialmente patógenos (sobre todo en quesos sin madurar) (Palacios 2006, Romero et al. 2009, Torres-Vitela et al. 2012).

La mayoría los quesos artesanales en México se mantienen en nichos de mercados locales y regionales. Solo algunos, como el Oaxaca, se encuentran más ampliamente difundidos en México. Por ello este último ha sido más estudiado y caracterizado, e incluso se han realizado estudios enfocados en mejorar su vida de anaquel y descripción de su microbiota. Este queso en particular, también conocido como queso de Hebra, de Bola o Quesillo, es un queso estirado de *pasta filata* muy popular en México y uno de los productos lácteos más consumidos. Su nombre se asocia a su estado de origen, Oaxaca (De Oca-Flores et al. 2009, Domínguez-López et al. 2011, González-Córdova et al. 2016). Es considerado un queso fresco (hasta 50% de humedad), cuya elaboración involucra la acidificación de la cuajada (pH 5.3), amasado en agua caliente y estiramiento, mediante lo que se forman hebras que se trenzan para darle su forma característica (Cervantes-Escoto et al. 2008; Villegas de Gante et al. 2014). Sobre la microbiota de este queso, mediante un estudio basado en el uso de secuenciación de alto rendimiento (high-throughput sequencing) de librerías de 16S/18S rDNA, se ha descrito la microbiota núcleo. A nivel de género se reporta que las bacterias encontradas en mayor proporción en queso Oaxaca corresponden a *Streptococcus* (70.8%), *Lactococcus* (12.5%), *Escherichia-Shigella* (6.8%) y *Lactobacillus* (1.8%). Mientras que, en el caso de hongos, los géneros dominantes son *Scheffersomyces* (67.3%), *Saccharomyces* (18.8%), *Galactomyces* (4.6) y *Candida* (2.9%) (Murugesan et al. 2018).



Previamente, en otro estudio, basado en el aislamiento cultivo-dependiente, secuenciación del gen 16S rDNA y ribotipificación, con particular interés en bacterias del género *Lactobacillus*, se sabe que este género está especialmente representado por cepas de *L. plantarum*, seguidas de *L. brevis*, *L. sakei* y *L. paracasei*. Además de que algunas de estas cepas exhiben resistencia a antibióticos y capacidad antimicrobiana contra algunos patógenos, actividad decarboxilasa amina-negativa y resistencia a NaCl y sales biliares (Caro et al. 2013).

Otros quesos, por el contrario, sufren procesos de extinción asociados, principalmente, a la pérdida de genuinidad, poca documentación, limitada capacidad de producción y venta, y falta de estrategias que promuevan su comercialización y consumo (Grass et al. 2013, Grass y Cesín 2014). A pesar de esto, algunos muestran la ventaja de conservar sus procesos originales de elaboración y, en ciertos casos, se ha evidenciado su inocuidad microbiológica, como es el caso del queso de Poro originario de Balancán Tabasco (Cervantes et al. 2008, Aldrete et al. 2014, Grass et al. 2014).

Específicamente, el Queso Adobera de los Altos de Jalisco, del cual poco se ha reportado, se ha descrito como un queso tipo *pata Filata*, fresco a ligeramente maduro, elaborado con leche de vaca cruda de la raza Holstein principalmente, acidificado por su microbiota autóctona, de pH bajo y elevado contenido de humedad, que ha logrado mantenerse en el mercado, con crecimiento en sus volúmenes de producción y área de distribución (Cervantes et al. 2008, Villegas de Gante et al. 2014). El protocolo de producción de este queso comprende las siguientes operaciones: recepción de leche cruda, estandarización al 3% de grasa (aunque no en todos los casos), coagulación enzimática (1:10,000 cuajo:leche), corte de coágulo (anteriormente realizado con pala de madera y recientemente reemplazada por liras de acero inoxidable), agitación (para romper el coágulo y promover la sinéresis) y eliminación de suero. Un paso crucial para producir queso Adobera es la chedarización o acidificación en masa de la cuajada (18 a 24 h a temperatura ambiente o bajo refrigeración a 4-7 ° C), lo que provoca una disminución drástica del pH. Finalmente, la cuajada acidificada es salada (1-2% de NaCl), molida, moldeada (utilizando moldes de acero inoxidable, plástico o, en menor medida,

madera) y prensada (prensa de tornillo) durante 1-7 h. Después del proceso de elaboración, el queso se madura ligeramente hasta por 96 h, y luego se empaca en una película de plástico de polietileno, se etiqueta y se mantiene a 4 ° C hasta su distribución o venta (Cervantes et al. 2008; Villegas de Gante et al. 2014). El producto final exhibe un color blanco a amarillento, pasta granulada que se vuelve más firme cuando está ligeramente añeja y, debido a su bajo pH, funde al calentarse (Cervantes et al. 2008; Cervantes y Villegas de Gante 2012).

Asociado a su origen artesanal, se ha señalado que uno de los principales problemas que enfrenta el queso Adobera es que, al elaborarse con leche cruda, se podría favorecer la incidencia de microorganismos potencialmente patógenos (Torres-Vitela 2012, Méndez et al. 2007); aunque también se reporta que el pH podría ser un factor determinante para el control de este tipo de microorganismos, por haber menor presencia de éstos en quesos con pH cercanos a 5 (Torres-Vitela et al. 2012, Ruvalcaba-Gómez et al. 2016).

Algunos productores han realizado esfuerzos por producir queso Adobera bajo un esquema que incluye un proceso de pasteurización de la leche utilizada, no obstante, debido a las implicaciones que la pasteurización involucra (Grappin y Beuvier 1998, Considine et al. 2007), y la carencia de un cultivo iniciador específico para este tipo de queso, los quesos producidos bajo dicho esquema muestran perfiles de textura y fisicoquímicos distantes del queso elaborado artesanalmente (Ruvalcaba-Gómez et al. 2014, Ruvalcaba-Gómez 2015); lo que confirma la necesidad de investigación enfocada a caracterizar este queso a lo largo de todo su proceso de elaboración así como orientada a la generación de desarrollos biotecnológicos que permitan contribuir a asegurar su inocuidad microbiológica sin perder las características del producto artesanal.

Respecto a la microbiota que compone al queso Adobera artesanal, a través de un estudio basado en secuenciación de alto rendimiento (high-throughput sequencing) de librerías de 16S/18S rDNA, recientemente se ha reportado que los géneros bacterianos dominantes en este queso son *Streptococcus* (68-77%), *Lactococcus* (13-21%) y *Lactobacillus* (5.7%). Mientras que en el caso de hongos se reporta que la microbiota

está fuertemente representada por los géneros *Galactomyces*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Scheffersomyces*, *Candida* y *Dikarya* (Murugesan et al. 2018). Estos resultados son un primer acercamiento hacia la descripción de la microbiota de este queso, no obstante, por lo complejo y peculiar proceso de elaboración, resulta importante conocer la dinámica poblacional de la comunidad bacteriana, a razón de poder elucidar los cambios inducidos por el proceso o por su estacionalidad. Esto último porque se sabe que, asociado al manejo semi-estabulado del ganado en el sistema de lechería familiar, el cual funge como proveedor de la leche para la elaboración de este queso; se ha establecido un efecto de estacionalidad en la calidad de la leche, que se ve reflejado a su vez en las características del queso que se produce (Datos propios, publicación en curso).

En un primer intento para evaluar el efecto de aplicar tratamiento térmico (pasteurización) y el uso de BAL autóctonas aisladas a partir de queso Adobera; se ha evaluado la factibilidad del uso de leche pasteurizada adicionada con un cultivo definido de BAL propias del queso adobera artesanal (Ruvalcaba-Gómez et al. 2017) y se comparó con su contraparte, queso elaborado artesanalmente a partir de leche cruda y acidificado con la microbiota propia. Los resultados mostraron diferencias tanto en términos de composición como de puntuaciones para atributos de textura evaluada mediante instrumentación. Resalta una mayor retención de humedad en los quesos elaborados con leche pasteurizada, así como menor contenido de grasa y proteína. Por su parte, el perfil de textura de los quesos mostró que los quesos artesanales registraron valores de dureza, cohesividad, masticabilidad y gomosidad, superiores a los elaborados con leche pasteurizada, los cuales fueron quesos con valores superiores para resiliencia. Esto hace evidente la necesidad de investigación enfocada a la selección de una combinación ideal de bacterias que permita obtener quesos más parecidos al obtenido mediante el proceso artesanal y mucho más homogéneos entre lotes y temporadas del año.

Bacterias ácido-lácticas: protagonistas en la microbiota de quesos artesanales

Como se ha señalado hasta ahora, los estudios relacionados con la microbiota de quesos artesanales (frescos y madurados), está fuertemente influenciada por la presencia de



BAL. Este grupo de bacterias está comprendido por microorganismos metabólica y fisiológicamente relacionados por una serie de características. Se trata de bacterias Gram (+) positivas, negativas a actividades catalasa y oxidasa, carentes de citocromos, con forma de cocos y bacilos. Una excepción en cuanto a morfología ha sido reportada en esta clasificación y se trata de *Weissella*, que es el primer género de este grupo de bacterias que puede incluir ambas, bacilos y cocos (Collins et al. 1993). Regularmente son bacterias no esporuladas, aero- y ácido-tolerantes, y considerados microorganismos fastidiosos, es decir, que son difíciles de mantener, por lo que en algunos casos es complicado cultivarlos, al requerir para el crecimiento una fuente de nitrógeno exógena, (como aminoácidos o péptidos), la cual obtienen regularmente a través de la hidrólisis de caseína (en leche) o de algunas otras proteínas de acuerdo al medio en que se encuentren. Tienen la capacidad de fermentar hexosas mediante las rutas metabólicas Embden–Meyerhof–Parnas y 6-fosfogluconato mediante la cual producen ácido láctico como producto final principal. Hay algunas excepciones a esta definición general ya que, por ejemplo, miembros del género *Sporolactobacillus* forman esporas, mientras que algunas otras BAL poseen citocromos y pueden respirar en presencia de heme. La composición del DNA de este grupo de bacterias es de menos del 50 %mol de G+C (guanina+citosina) y está comprendido por seis familias y cerca de 40 géneros, entre los que destacan *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*. Las bifidobacterias, muchas veces consideradas dentro de este grupo, también producen lactato y acetato como productos finales del metabolismo de carbohidratos y tienen un contenido de G+C de más del 50% en moles, sin embargo, no están relacionadas con las BAL sino con las Actinobacterias (Salam 2016, Björkroth y Koort J. 2016).

Desde el punto de vista metabólico y de uso de sustratos, una de las principales características utilizadas para la diferenciación de los diferentes géneros de BAL es la forma en que fermentan la glucosa bajo condiciones estándar, a través de la que se pueden diferenciar dos grupos: homofermentativas, que convierten la glucosa prácticamente solo en ácido láctico; y heterofermentativas, que fermentan la glucosa en



ácido láctico, etanol/ácido acético, y CO₂. La evaluación de la producción de gas es útil y suficiente para distinguir entre ambos grupos (Sharpe 1979, Carr 2002, Axelsson 2004).

Si bien, el lactato es el único o el principal producto del metabolismo de las homofermentativas, algunas excepciones han sido reportadas, como es el caso de fermentaciones de soya con *Tetragenococcus halophilus* y *Carnobacterium* spp. en carne y pescado empacado al vacío, donde las condiciones (baja concentración de hexosas) favorecen el metabolismo de piruvato por la enzima piruvato fomato liasa; la cual, es una enzima esencial en el metabolismo de bacterias anaerobias y que es la responsable de convertir el piruvato y la coenzima A (CoA) para formar acetil-CoA (Broderick 2003, Holzapfel W. H. y Wood 2014, Gänzle 2015).

Dentro del grupo de homofermentativas se incluyen los géneros leuconostocs, oenococos, weisellas y un sub-grupo de lactobacilos (Axelsson 2004); y se encuentran como microbiota de fermentación única en una gran variedad de fermentaciones lácteas y cárnicas, así como fermentaciones de condimentos con elevada concentración de sal; mientras que, en fermentaciones de vegetales y cereales, este tipo de bacterias se encuentra en asociación con BAL heterofermentativas.

Por otra parte, el resto de los géneros incluidos en el grupo de BAL entran en la clasificación de heterofermentativas. A nivel de especie resulta complejo hablar de todas las especies incluidas en este grupo de bacterias ya que, solo para el género *Lactobacillus*, se han reportado más de 80 especies. Sin embargo, las especies más interesantes, desde el punto de vista tecnológico incluyen a *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Weissella*, todas diferenciadas entre sí por sus características fisiológicas y morfológicas (Axelsson 2004, Parra 2010).

Referencias

- Adamberg K., Antonsson M., Vogensen F. K., Nielsen E. W., Kask S., Moller P. L. y Ardo Y. (2005) Fermentation of carbohydrates from cheese sources by non-starter lactic acid bacteria isolated from semi-hard Danish cheese. *Int Dairy J* 15:873-882. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.07.017
- Afshari R., Pillidge C. J., Dias D. A., Osborn A. M. y Gill H. (2018) Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 4:1-15. DOI: 10.1080/10408398.2018.1512471.
- Agricultura. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019) Boletín de Leche. Enero-Marzo 2019. Sistema de información agroalimentaria y Pesquera.
- Aldrete T. A., Escobar R. M. C., Tamplin M. L. y Hernández I. M. (2014) High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiol* 44:136-141. DOI: [10.1016/j.fm.2014.05.022](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.022)
- Aquilanti L., Silvestri G., Zannini E., Osimani A., Santarelli S. y Clementi F. (2007) Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *J Appl Microbiol* 103(4):948-960. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03513.x
- Araújo-Rodrigues H., Tavaría F. K., dos Santos M. T. P.G., Alvarenga N. y Pintado M. M. (2020) A review on microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: An ovine raw milk cheese. *Int Dairy J* 100:104561. DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104561.
- Axelsson L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. 3 ed. E. (Salminen, A. von wright, and A. Ouwehand, eds). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Björkroth, J. y Koort J. (2016) Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. Reference Module in Food Science. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.00864-7.
- Caggia C., De Angelis M., Pitino I., Pino A. y Randazzo C. L. (2015) Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food Microbiol* 50:109-117. DOI:[10.1016/j.fm.2015.03.010](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.010).
- Callon c., Picque D., Corrieu G y Montel M. C. (2011) Ripening conditions: A tool for the control of *Listeria monocytogenes* in uncooked pressed type cheese. *Food Control* 22(12):1911-1919. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.05.003.
- Camacho V. J. H., Cervantes E. F., Palacios R. M. I., Cesín V. A. y Ocampo L. J. (2017) Especialización de los sistemas productivos lecheros en México: la difusión del modelo tecnológico Holstein. *Rev Mex Cienc Pecu* 8(3):259-268. DOI: 10.22319/rmcp.v8i3.4191.
- Caro I., Mateo J., Sandoval M. H., Soto S., García-Armesto M. R. y Castro J. M. (2013) Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. *J Dairy Sci* 96(6):3461-70. DOI: [10.3168/jds.2012-6103](https://doi.org/10.3168/jds.2012-6103).
- Carr F. J., Chill D. y Maida N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*. 28(4):281-370. DOI: 10.1080/1040-840291046759.

- Casalta E., Sorba J. M., Aigle M. y Ogier J. C. (2009) Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int J Food Microbiol* 133:243–251. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.022).
- Castro-Puyana M., Pérez-Míguez R., Montero L. y Herrero M. (2017) Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. *Trends Anal Chem* 93, 102–118. DOI: [10.1016/j.trac.2017.05.004](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.004).
- Cervantes E. F. y Villegas de Gante A. (2012) La leche y los quesos artesanales en México: Universidad Autónoma Chapingo. CIEESTAM. CONACYT.
- Cervantes E. F., Villegas de Gante A. y Cesín V. A. (2008) Los quesos mexicanos genuinos/ Genuine Mexican Cheeses: Patrimonio cultural que debe rescatarse. Mundi Prensa, Mexico.
- Cesín V. A., Aliphath F. M., Ramírez V. B., Herrera H. J. G. y Martínez C. D. (2007) Ganadería lechera familiar y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuca en el estado de Tlaxcala, México. *Rev Téc Pec Mex* 45(1):61-76.
- Collins M. D., Samelis J., Metaxopoulos J. y Wallbanks S. (1993) Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *The Journal Appl Bacteriol* 75(6):595-603. DOI: [10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x).
- Considine T., Patel H. A., Anema S. G., Singh H. y Creamer L. K. (2007) Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8:1-23.
- Cunha J. T., Ribeiro T. I.B., Rocha J. B., Nunes J., Teixeira J. A. y Domingues L. (2016) RAPD and SCAR markers as potential tools for detection of milk origin in dairy products: Adulterant sheep breeds in Serra da Estrela cheese production. *Food Chem* 211:631-636. DOI: [10.1016/j.foodchem.2016.05.109](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.109).
- Dasen A., Berthier F., Grappin R., Williams A. G. y Banks J. (2003) Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurised milk. *J Appl Microbiol* 94(4):595-607. DOI: [10.1046/j.1365-2672.2003.01878.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01878.x)
- De Melo P. G. V., de Oliveira C. B., Magalhães J. A. I., Thomaz-Soccol V. y Soccol C. R. (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv* 36(8):2060-2076. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2018.09.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003).
- De Oca-Flores E. M., Castelan-Ortega O. A., Estrada-Flores J. G. y Espinoza-Ortega A. (2009) Oaxaca cheese: Manufacture process and physicochemical characteristics. *Int. J. Dairy Technol.* 62:535–540. DOI: [10.1111/j.1471-0307.2009.00533.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00533.x).

- Dominguez-Lopez, A., Villanueva-Carvajal A., Arriaga-Jordan C. M. y Espinoza-Ortega A. (2011) Alimentos artesanales y tradicionales: El queso Oaxaca como un caso de estudio del centro de Mexico. *Estud Soc* 19:166–193.
- Edalati E., Saneei B., Alizadeh M., Hosseini S. S., Zahedi B. A. y Taheri K. (2018) Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. *New Microbe and New Infect.* 27: 64–68. DOI: [10.1016/j.nmni.2018.11.008](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.11.008).
- Edalati E., Saneei B., Alizadeh M., Hosseini S. S., Zahedi B. A. y Taheri K. (2018) Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. *New Microbe and New Infect.* 27: 64–68. DOI: [10.1016/j.nmni.2018.11.008](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.11.008)
- Escobar-Zepeda A., Sanchez-Flores A. y Quirasco B. M. (2016) Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol* 57:116-27. DOI: [10.1016/j.fm.2016.02.004](https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004).
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Ferrari I. da S., de Souza J. V., Ramos C. L., da Costa M. M., Schwan R. F y Dias F. S. (2016) Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. *Food Microbiol* 60:29-38. DOI: [10.1016/j.fm.2016.06.014](https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.014).
- Food Standards Australia New Zealand. (2009). Microbiological risk assessment of raw milk cheese: Risk assessment microbiology section.
- Gänzle M. G., Vermeulen N. y Vogel R. F. (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* 24:128-138. DOI: [10.1016/j.fm.2006.07.006](https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.006).
- Gaya P., Medina M., y Nuntez M. (1987) Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes'milk. *J Appl Microbiol* 62:321–326. DOI: [10.1111/j.1365-2672.1987.tb04927.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04927.x)
- Gobbetti M., Di Cagno R., Calasso M., Neviani E., Fox P. F. y De Angelis M. (2018) Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends Food Sci Technol* 78:244-254. DOI: [10.1016/j.tifs.2018.06.010](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010).
- Gomes de O. M. E., Fernandes G. E., Vasconcelos de O. C. E., Pereira G. A. M., Esteves P. M. M., Mendes F. M. A. R., da Conceicao M. L., Ramos de E. R. C y Leite de S. E. (2014) Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Res Int* 64:241-247. DOI: [10.1016/j.foodres.2014.06.032](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.032).
- Gonçalves Dos Santos, M. T. P., Benito, M. J., Córdoba, M. G., Alvarenga, N., & de Herrera, S. R. M. S. (2017) Yeast community in traditional Portuguese Serpa

- cheese by culture-dependent and independent DNA approaches. *Int J Food Microbiol* 262:63–70. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013)
- González-Córdova A. F., Yescas C., Ortiz-Estrada A. M., De la Rosa-Alcaráz M. A., Hernández-Mendoza A. y Vallejo-Cordoba B. (2016) Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *J Dairy Sci* 99(5):3250-3262. DOI: 10.3168/jds.2015-10103.
- Grappin R. y Beuvier E. (1998) Possible Implications of Milk Pasteurization on the Manufacture and Sensory Quality of Ripened Cheese. *Review. Int Dairy J* 7:751-761.
- Grass R. J. F. y Cesín V. A. (2014) Situación actual y retrospectiva de los quesos genuinos de Chiautla de Tapia, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 11(2):201-221
- Grass R. J. F., Cervantes E. F y Altamirano C. J. R. (2013) Estrategias para el rescate y valorización del queso tenate de Tlaxco. *Culturales, época II* 1(2):9-54
- Guerrero L., Guardia M. D., Xicola J., Verbeke W., Vanhonacker F., Zakowska-Biemans S., Sajdakowska M., Sulmont-Rosse C., Issanchou S., Contel M., Scalvedi M. L., Granli B. S. y Hersleth M. 2009. Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite* 52:345–354. DOI: [10.1016/j.appet.2008.11.008](https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.11.008).
- Gunyaktia A. y Asan-Ozusaglamlama M. (2019) *Lactobacillus gasseri* from human milk with probiotic potential and some technological properties. *LWT-Food Sci Technol.* 109:261-269. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.04.043.
- Hayaloglu A. A (2017) Chapter 39 - Cheese Varieties Ripened Under Brine. En: *Cheese (Fourth Edition)*, (McSweeney P.L.H., Fox P. F., Cotter P. D. y Everett D. W., eds.) Academic Press. Pp. 997-1040. DOI: [10.1016/B978-0-12-417012-4.00039-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00039-9).
- Hayaloglu A. A., Guven M. y Fox P.F. (2002) Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese “Beyaz Peynir”. *Int Dairy J* (12)635–648. DOI: [10.1016/S0958-6946\(02\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00055-9).
- Holzappel W. H. y Wood B. J. B. (2014) *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Jhon Wiley and Sons, Chichester, UK. DOI:10.1002/9781118655252.
- Jordan K. W., Nordenstam J., Lauwers G. Y., Rothenberger D. A., Alavi K., Garwood M. y Cheng L. L. (2009) Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis Colon Rectum* 52(3):520-525. DOI: [10.1007/DCR.0b013e31819c9a2c](https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e31819c9a2c).
- Julien M.C., Dion P., Lafrenère C., Antoun H. y Drouin P. (2008) Sources of Clostridia in raw milk on farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6348–6357. DOI: [10.1128/AEM.00913-08](https://doi.org/10.1128/AEM.00913-08).
- Karahan A. G., Basyigit K. G., Kart A., Sanlidere A. H., Oner Z., Aydemir S., Erkus O. y Harsa S. (2010) Genotypic identification of some lactic acid bacteria by amplified fragment length polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in Beyaz cheese manufacture. *J Dairy Sci* 93(1):1-11. DOI: 10.3168/jds.2008-1801

Karahan A. G., Basyigit K. G., Kart A., Sanlidere A. H., Oner Z., Aydemir S., Erkus O. y Harsa S (2010) Genotypic identification of some lactic acid bacteria by amplified fragment length polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in Beyaz cheese manufacture. *J Dairy Sci* 93(1):1-11. DOI: [10.3168/jds.2008-1801](https://doi.org/10.3168/jds.2008-1801).

Literatura antecedentes tesis

Lollo P. C. B., Morato P. N., Moura C. S., Almada C. N., Felicio T. L., Esmerino E. A., Barros M. E., Amaya F. J., Sant'Ana A. S., Raices R., Silva M. C. y Cruz A. G. (2015) Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Res Int* 76:611-617. DOI: [10.1016/j.foodres.2015.07.015](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.015).

Lu H., Wu Z., Xu W., Yang J., Chen Y. y Li L. (2011) Intestinal microbiota was assessed in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. Intestinal microbiota of HBV cirrhotic patients. *Microb Ecol* 61(3):693–703. DOI: [10.1007/s00248-010-9801-8](https://doi.org/10.1007/s00248-010-9801-8).

Lu H., Zhang C., Qian G., Hu X., Zhang H., Chen C, Liang W., Gao H., Yang Y. y Li L. (2014) An analysis of microbiota targeted therapies in patients with avian influenza virus subtype H7N9 infection. *BMC Infect Dis* 14:359. DOI: [10.1186/1471-2334-14-359](https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-359).

Lucey J. A., Johnson M. E. y Horne D. S. (2003) Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J Dairy Sci* 86(9):2725-43. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73869-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7).

Macedo A., Xavier M. X. y Oliveira J. (1993) The technology, chemistry and Microbiology of Serra Cheese: A review. *J Dairy Sci* 76:1725-1739. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77505-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77505-0)

Mallet A., Guéguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboué A. y Desmasures N. (2012) Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *Int Dairy J* 27:13–21. DOI: [10.1016/j.idairyj.2012.07.009](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.07.009).

Marino M., Dubsky de Wittenau G., Saccà E., Cattonaro F., Spadotto A., Innocente N., Radovic S., Piasentier E. y Marroni F. (2019) Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiol* 79:123-131. DOI: [10.1016/j.fm.2018.12.007](https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.007).

Masoud W., Takamiya M., Vogensen F.K., Lillevang S., Abu Al-Soud W., Sorensen S.J. y Jakobsen M. (2011) Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *Int Dairy J* 21:142–148. DOI: [10.1016/j.idairyj.2010.10.007](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.10.007).

Masoud W., Vogensen F. K., Lillevang S., Abu Al-Soud W., Sørensen S. J. y Jakobsen M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int J Food Microbiol* 153:192-202. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.014](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.014).

- McKinnon C.H., Rowlands G.J. y Bramley A.J. (1990) The effect of udder preparation before milking and contamination from the milking plant on the bacterial numbers in bulk milk of eight dairy herds. *J. Dairy Res.* 57, 307–318. DOI: [10.1017/s0022029900026959](https://doi.org/10.1017/s0022029900026959).
- Méndez R. M. D., Gutiérrez R. N. E., León C. A. O. y Hernández J. A. L. (2007) Evaluación de la Calidad Microbiológica de Quesos Tipo Adobera Elaborados en Tepatitlán de Morelos, Jalisco. In: 9º Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos: 2007; Puerto Vallarta, Jalisco. México. Universidad de Guadalajara: 39.
- Metz M., Sheehan J. y Feng P. C. H. (2020). Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses - A literature review. *Food Microbiol* 85:103283. DOI: [10.1016/j.fm.2019.103283](https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103283).
- Michel V., Hauwuy A. y Chamba J. F. (2001) La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81:575–592. DOI: [10.1051/lait:2001151](https://doi.org/10.1051/lait:2001151).
- Montel M. C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D. A., Desmasure N. y Berthier F. (2014) Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol* 2(177):136-54. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019)
- Muehlherr J.E., Zweifel C., Corti S., Blanco J. E. y Stephan R. (2003) Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J Dairy Sci* 86:3849–3856. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73992-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73992-7).
- Murugesan S., Reyes-Mata M. P., Nirmalkar K., Chavez-Carbajal A., Juárez-Hernández J. I., Torres-Gómez R. E., Piña-Escobedo A., Maya O., Hoyo-Vadillo C., Ramos-Ramírez E. G., Salazar-Montoya J. A. y García-Mena J. (2018) Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Res Int* 113:371-381. DOI: [10.1016/j.foodres.2018.07.023](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.023).
- Palacios V.S. (2006) Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo, Hidalgo. México. Tesis. Universidad autónoma del estado de Hidalgo.
- Pangallo D., Kraková L., Puškárová A., Šoltys K., Bučková M., Koreňová J., Budiš J., Kuchta T. (2019) Transcription activity of lactic acid bacterial proteolysis-related genes during cheese maturation. *Food microbiol* 82:416-425. DOI: [10.1016/j.fm.2019.03.015](https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.015).
- Petrella G., Pati S., Gagliardi R., Rizzuti A., Mastrorilli P., la Gatta B. y Di Luccia A. (2015) Study of proteolysis in river buffalo mozzarella cheese using a proteomics approach. *J Dairy Sci* 98(11):7560-7572. DOI: [10.3168/jds.2015-9732](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9732).
- Pomeón T. y Cervantes E. F (2010) El sector lechero y quesero en México de 1990 a 2009: entre lo global y local. Universidad Autónoma Chapingo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial.
- Rahimi E., Momtaz H., Behzadnia A. y Torki B. Z. (2014) Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the

- PCR assay. *Asian Pac J Trop Dis* 4(1):50-53. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60313-3.
- Reale A., Di Renzo T. y Coppola R. (2019) Factors affecting viability of selected probiotics during cheese-making of pasta filata dairy products obtained by direct-to-vat inoculation system. *LWT Food Sci Technol* 116:108476. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108476.
- Reis L. M. J., Santos A. O., Falcão S., Fontes L., Teixeira-Lemos E., Vilas-Boas M., Veloso A. C. A. y Peres A. M. (2019) Serra da Estrela cheese's free amino acids profiles by UPLC-DAD-MS/MS and their application for cheese origin assessment. *Food Res Int* In Press, Corrected Proof. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108729
- Ricciardi A., Guidone A., Lanniello R. G., Cioffi S., Aponte M., Pavlidis D., Tsakalidou E., Zotta T., y Parente E. (2015) A survey of non-starter lactic acid bacteria in traditional cheeses: Culture dependent identification and survival to simulated gastrointestinal transit. *Int Dairy J* 43:42-50. DOI: [10.1016/j.idairyj.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.11.006).
- Rocchetti G., Lucini L., Gallo A., Masoero F., Trevisan M. y Giubert G. (2018) Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses. *Food Res Int* 113:407-413. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.029.
- Romero C. P. A., Leyva R. G., Cruz C. J. G., Santos M. A. (2009) Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8(1):111-119.
- Roncada P., Piras C., Soggiu A., Turk R., Urbani A. y Bonizzi L. (2012) Farm animal milk proteomics, *J Proteome* 75(14):4259-4274. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.05.028.
- Rudol M. y Scherer S. (2001) High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol* 63:91-98. DOI: [10.1016/s0168-1605\(00\)00413-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00413-x).
- Ruiz-Moyano S., Gonçalves dos Santos M. T. P., Galván A., Merchán A. V., González E., Córdoba M. G., Benito M. J. (2019) Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. *LWT Food Sci Technol* 114:108388. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108388.
- Ruvalcaba G. J. M, Delgado M. R. J., Ruiz E. H., López G. V. y Méndez R. M. D. (2014) Characterization of Adobera cheese by Texture Profile Analysis and Mid-Infrared Spectroscopy. *J Chem Biol Phy Sci* 4(5):90-94.
- Ruvalcaba G. J. M., Estrada C. E., Peña C. A. L., Méndez R. M. D., Romero J. J. H. y Ruiz A. C. R. (2011) Caracterización de las prácticas de ordeño y calidad higiénico-sanitaria de leche en dos municipios de los Altos de Jalisco. En XIII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. Puerto Vallarta, Jalisco. México. Universidad de Guadalajara. Pp. 117-120.
- Ruvalcaba-Gómez J. M. (2015) Determinación del Efecto de la Formación de Agregados de β -Lactoglobulina sobre las Características Físico-químicas del queso Adobera. Tesis Maestría. Instituto Politecnico Nacional. Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, México.

- Ruvalcaba-Gómez J. M., Delgado M. R. J., Ruiz E. H. y Méndez R. M. D. (2016) Conteo de bacterias ácido-lácticas en queso adobera de los Altos de Jalisco y su relación con aspectos de calidad del producto. En Estudios en Inocuidad y Microbiología Alimentaria, pp 218-221. Orozco H. L. O., Garay M. L. E. y Torres V. M. R., eds. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.
- Ruvalcaba-Gómez J. M., Delgado M. R. J., Ruiz E. H., Arteaga G. R. I., Zaca M. O. y Díaz R. J. (2017) Composición fisicoquímica y textura de queso adobera elaborado con leche pasteurizada y una combinación de bacterias ácido lácticas. Memoria XVII Congreso Nacional de Biotecnología e Ingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Salam A. I. (2016) Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. Reference Module in Food Science. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00857-X.
- Sevi A., Albenzio M., Marino A. y Muscio, A. (2004) Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. Small Rumin Res 51:251–259. DOI: [0.1016/S0921-4488\(03\)00196-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00196-2).
- Sharpe M. E. (1979) Identification of lactic acid bacteria. En Identification methods for microbiologists. 2da edición. (Skinner F.A. y L. D.W., eds.) Pp. 246-255 Academic Press, London.
- Solís M. A. D., Martínez L. R., Solorio S. J., Estrada F. J. G, Avilés N. F., Gutiérrez I. A. T. y Castelán O. O. A. (2013) Characteristics of the Tepeque cheese from “la tierra caliente” of the state of michoacán: a cheese produced in an intensive silvopastoral system. Tropical and Subtropical Agroecosystems 16(2013):201-214.
- Terzic V. A., Tonkovic K., Lebos P. A., Beganovic J., Strahinic I., Kojic M., Veljovic K., Golic N., Kos B, Cadez N., Gregurek L., Šušković J., Raspor P. y Topisirovića L. (2015) Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. LWT - Food Sci Technol 63:298-306. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.050.
- Tilocca B. (2018) Effects of Diets with Different Phosphorus Availability on the Intestinal Microbiota of Chickens and Pigs. University of Hohenheim. <http://opus.unihohenheim.de/volltexte/2019/1591/>.
- Tilocca B., Costanzo N., Morittu V. M., Spina A. A., Soggiu A., Britti D., Roncada P. y Piras C. (2019) Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. J Proteomics 210: 103534. DOI: [10.1016/j.jprot.2019.103534](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534).
- Tormo H., Agabriel C., Lopez C., Lekhal D.A.H. y Roques C. (2011) Relationship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles of milk. Int. J Dairy Sci 6:13–28. DOI: 10.3923/ijds.2011.13.28.
- Torres-Vitela M. R., Mendoza-Bernardo M., Castro-Rosas J., Gomez-Aldapa C. A., Garay-Martinez L. E., Navarro-Hidalgo V. y Villarruel-Lopez A. (2012) Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. J Food Prot 75(1):79-84. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-11-258](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-258).



- Verdier-Metz I., Michel V., Delbès C. y Montel M. C. (2009) Domilking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol* 26, 305–310. DOI: [10.1016/j.fm.2008.12.005](https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.005).
- Villegas de Gante A. y Cervantes E. F. (2011) La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo* 19(38).
- Villegas de Gante A., Cervantes E. F., Cesin V. A., Espinoza O. A., Hernández M. A., Santos M. A. y Martínez C. A. R. (2014) *Atlas de los Quesos Mexicanos Genuinos*. Montecillo, Texcoco, México: Colegio de Postgraduados.
- Wang B., Yao M., Lv L., Ling Z. y Li L. (2017) The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* 3(1):71-82. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.01.008.
- Williams A. G. y Withers S. (2010). Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. *Int J Dairy Technol* 63(3):356-369. DOI: [10.1111/j.1471-0307.2010.00596.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00596.x).
- Yescas C. (2013) *Quesos Mexicanos*. 1ra edición. Ed. Larousse. México.
- Yoon Y., Lee S. y Choi K. H. (2016) Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food control* 63:201-2015. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.11.013.

DIRECTRICES DEL ESTUDIO

Argumento de estudio

Los alimentos fermentados artesanales, incluida la amplia gama de quesos que existe, son productos cuya producción se mantiene acotada a regiones geográficas bien delimitadas, usualmente de poca extensión territorial y bajo condiciones específicas, sin embargo, asociado a la búsqueda del consumidor por consumir productos originales, ricos en sabores, aromas y texturas, estos quesos llegan a ser productos de gran importancia. Más allá de los riesgos sanitarios potenciales asociados al consumo de quesos artesanales, estudios basados en el uso tanto de metodologías tanto dependientes como independientes de cultivo, han demostrado que la microbiota relacionada con este tipo de productos puede llegar a ser sumamente diversa y funcional.

Especial interés se ha dado a las bacterias ácido-lácticas por ser una pieza fundamental en la microbiota de los quesos artesanales, sus características fenotípicas y su versatilidad metabólica. Estas bacterias son determinantes no solo para el desarrollo de las características organolépticas y composicionales del queso, sino que además pueden limitar la sobrevivencia de microorganismos indeseables (potencialmente patógenos y asociados al deterioro del producto) y exhibir potencial probiótico. Es por ello que su aislamiento, identificación y caracterización ha sido fundamental para la generación de desarrollos biotecnológicos orientados a la producción sustentable, tecnificada y segura de los quesos artesanales, bajo la premisa de conservar su originalidad y aumentar su valor agregado. Además, estas bacterias pueden ser incorporadas a otro tipo de aplicaciones biotecnológicas en las que se involucre la fermentación de sustratos.

El presente documento presenta una descripción del queso Adobera de los Altos de Jalisco y la microbiota que lo compone, basado en el uso de metodologías independientes del uso de medios cultivo complementadas con técnicas dependientes de cultivo para establecer el núcleo cultivable del queso, su fenotipificación, conservación, potencial probiótico y perfil biotecnológico.

Hipótesis

La microbiota del queso Adobera artesanal corresponde a una comunidad bacteriana diversa y abundante en bacterias ácido-lácticas, las cuales pueden ser conservadas y aprovechadas para la generación de desarrollos biotecnológicos además de que exhiben potencial para ser utilizadas como microorganismos probióticos.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la estructura y composición de la microbiota del queso Adobera artesanal bajo diferentes condiciones para su uso en aplicaciones biotecnológicas.

Objetivos específicos

- i. Determinar la composición y estructura de la comunidad bacteriana asociada al queso adobera artesanal de los Altos de Jalisco.
- ii. Describir la textura y composición del queso adobera artesanal de los Altos de Jalisco.
- iii. Determinar el perfil de inocuidad microbiológica de queso adobera de los Altos de Jalisco.
- iv. Seleccionar, identificar, caracterizar y conservar bacterias ácido-lácticas de queso Adobera artesanal.
- v. Evaluar el potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas autóctonas de queso Adobera.
- vi. Evaluar el desempeño de bacterias ácido-lácticas incorporadas a procesos biotecnológicos.

Descripción general del proyecto

El estudio inició con la obtención de muestras de queso Adobera artesanal en los Altos de Jalisco en dos temporadas del año (secas y lluvias) y en cuatro diferentes etapas de elaboración. Mediante un enfoque de secuenciación de amplicones se describe la composición y estructura de la comunidad bacteriana del queso. A través del uso de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se generó el perfil de composición y textura y los resultados se asociaron con la microbiota núcleo del queso y se complementó con un análisis sensorial del producto. De manera complementaria, mediante metodologías dependientes de cultivo se determina el perfil de inocuidad del queso y se obtiene el núcleo cultivable de bacterias ácido-lácticas. Estas últimas se caracterizaron mediante métodos fenotípicos y genotípicos con el uso tanto de métodos de microbiología convencional, y métodos automatizados de identificación genética por secuenciación del gen 16S rDNA, marcadores especie-específico y tipificación de secuencias multi-locus. Las cepas obtenidas se integraron en una colección activa de microorganismos y se estudiaron para conocer su potencial tecnológico y probiótico para ser incorporadas a procesos biotecnológicos. Finalmente, se evaluó la capacidad de un consorcio de BAL para la descontaminación de estiércol porcino, con el objetivo de probar su capacidad de adaptación a ambientes hostiles, diferentes al de su origen.

Estrategia metodológica general.

La estrategia metodológica del estudio comprende dos fases experimentales; la primera orientada a la caracterización de la comunidad bacteriana, composición y textura del queso basado en la aplicación de metodologías independientes del uso de medios de cultivo (secuenciación masiva y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier); mientras que la segunda se basa en el uso de metodologías cultivo-dependientes para determinar el perfil de inocuidad microbiológica del queso y la búsqueda, caracterización, conservación y evaluación de bacterias ácido lácticas con potencial para ser incluidas en desarrollos biotecnológicos. Se incluyen tres empresas elaboradoras de queso en el estudio. El criterio de selección fue principalmente que elaboren los quesos bajo el procedimiento artesanal, sin el uso de aditivos o modificaciones en el proceso que comprometan la originalidad al producto. La obtención de muestras se llevó a cabo directamente en la planta productora, en cuatro etapas de elaboración considerada como críticas en términos de definir la microbiota del queso. Se consideraron además dos temporadas del año para evaluar efectos de estacionalidad sobre la microbiota y características del queso.

Diseño Experimental y análisis estadístico

El estudio se sustentó en un diseño de bloques al azar, en el cual los tratamientos consistieron en cada una de las queseras incluidas en el estudio, mientras que los factores de bloqueo correspondieron a cada una de las fechas de muestreo y etapa del proceso. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo en paquete estadístico SAS ver. 9.0 ® a través del uso de pruebas de distribución, estadística descriptiva, comparación de medias por la prueba de Tukey y análisis de correlación.

Los datos relacionados con la caracterización microbiológica se procesaron como un modelo de bloques al azar, a través de un análisis de la varianza bilateral, ya que las observaciones se clasificarán en base a dos criterios: el bloque al que pertenece (fecha de muestreo) y el grupo del tratamiento del que forma parte (quesera). El modelo se explica a través de la siguiente ecuación:

$$X_{ij} = \mu + \beta_i + \tau_j + e_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, n; j = 1, 2, \dots, k$$

Donde:

X_{ij} = Valor representativo de toda la población

μ = Constante desconocida

β_i = Efecto del bloque que refleja el hecho de que la unidad de experimentación cae en el i-ésimo bloque

τ_j = Efecto de un tratamiento que refleja que la unidad de experimentación recibe el j-ésimo tratamiento

e_{ij} = Componente residual que representa todas las fuentes de variación que no son tratamientos ni bloques





CAPITULO I.

ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO

Estudio descriptivo de la microbiota asociada al queso adobera artesanal de los Altos de Jalisco

Ruvalcaba-Gómez José Martín¹, Delgado-Macuil Raúl Jacobo¹, Arteaga-Garibay Ramón Ignacio².

¹ Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac – Tepetitla, km. 1.5. Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Blvd. de la Biodiversidad #400. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600.

Autor de correspondencia: Ramón Ignacio Arteaga-Garibay. E:mail: arteaga.ramon@inifap.gob.mx

Resumen

La comunidad bacteriana de los quesos de leche cruda puede ser bastante compleja, asociado principalmente a la cantidad de nutrientes, contenido de humedad y pH que posee la leche utilizada para su fabricación. Mediante la secuenciación de librerías de fragmentos del gen 16S rDNA se describió la composición y estructura de la comunidad bacteriana del queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco, la cual fue megadiversa, fuertemente representada por bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. La dinámica poblacional estuvo condicionada al proceso de elaboración y efecto de estacionalidad que modifica la estructura de la comunidad bacteriana del queso. Los géneros más abundantes en el queso condicionan además la prevalencia y abundancia de géneros de poco interés para la producción del queso. Los resultados contribuyen a una mayor comprensión de las interacciones bacterianas involucradas en el queso y que podrían servir para diseñar estrategias para optimizar su producción.

Introducción

La fermentación es un aprovechamiento tradicional que mejora las propiedades organolépticas, nutricionales y benéficas del producto mediante la acción de microorganismos; por lo que, de manera general, los alimentos fermentados han sido definidos como alimentos o bebidas elaborados a través del crecimiento microbiano controlado y conversiones enzimáticas de sus componentes mayoritarios y minoritarios (Marco et al. 2017, Macori y Cotter 2018). La fermentación ha sido aprovechada para la producción de diversos productos lácteos, de los cuales el más popular es el queso, ya que tanto los quesos frescos (suaves) o madurados (duros) son producidos mediante fermentación de la leche por periodos determinados de tiempo. Los quesos pueden ser elaborados de manera artesanal (fermentación asociada a la microbiota nativa de la leche) o de manera estandarizada o industrializada (inoculación de cultivos bacterianos definidos). Estos últimos se distinguen por elaborarse bajo procesos estandarizados, lo que entrega productos de calidad consistente, mientras que los quesos artesanales se caracterizan por ser productos acotados a ciertos nichos, usualmente elaborados mediante procesos con baja tecnificación e incluso producidos dentro de la granja o solamente a nivel de pueblo o localidad, además de ser una expresión única de la interacción entre recursos humanos, cultura de la comunidad de origen (generalmente rural) y la naturaleza (Licitra et al. 2019).

Particularmente, los quesos artesanales, al ser elaborados a partir de leche cruda, se sabe que comprenden una compleja comunidad microbiana, asociado a la cantidad de nutrientes, contenido de humedad y pH que posee la leche (Frank 1997, Quigley et al. 2011). Algunos estudios basados en microbiología cultivo-dependiente, aseveran que la microbiota de la leche cruda está representada por bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* y *Pediococcus*; además de algunos hongos y levaduras principalmente (Coppola et al. 2008, Quigley et al. 2011). Por otra parte, la introducción de las técnicas independientes de cultivo ha apoyado a conocer no solo la fracción cultivable de matrices como leche y

queso, sino que han sido útiles para determinar la composición de comunidades microbianas complejas (Quigley et al. 2011).

El desarrollo y optimización de plataformas basadas en tecnología de secuenciación de siguiente generación (Next generation sequencing) logrado en la última década, ha revolucionado el campo de la genómica y brindado diversas alternativas de secuenciación de mayor rapidez, fidelidad y aplicabilidad. Una de las innovaciones que ha permitido esto es la capacidad que estas plataformas tienen para ejecutar una multitud de reacciones independientes de manera simultánea (secuenciación paralela), lo que ha logrado aumentar el rendimiento en cuanto a la generación de información en el menor tiempo posible (Lavezzo et al. 2016).

El inicio de la secuenciación masiva se dio mediante el desarrollo de la plataforma basada en pirosecuenciación 454 FLX (método de secuenciación por síntesis) (Droege y Hill 2008) hacia 2005, sustituida posteriormente por las plataformas “Genome analyzer” (Illumina) y SOLiD (Applied BioSystems), la primera basada en el mismo principio de secuenciación por síntesis pero diferenciada por el uso de nucleótidos marcados por fluorescencia y la capacidad de realizar extensiones de base única gracias a la incorporación de terminadores reversibles (Dohm et al. 2008, Guo et al. 2008, Reuter et al. 2015). Mientras que la plataforma SOLiD lleva a cabo la secuenciación mediante ligación. Posteriormente surgió la plataforma de secuenciación de Ion Torrent, con un principio similar al de la 454 FLX, denominado PCR de emulsión, pero la detección de la incorporación de nucleótidos monitoreada basada en la detección de los cambios de pH en lugar de la emisión de luz, con lo que se evita la compleja cascada de enzimas y hace innecesario contar con el detector óptico utilizado en pirosecuenciación (Lavezzo et al. 2016).

Dos ejemplos de equipos de secuenciación Ion Torrent son el “Ion Proton” y el “PGM”, cada una de las cuales ofrece ventajas sobre la otra, como son la cantidad de información generada (10 Gb vs 1 Gb respectivamente) y la longitud de las secuencias que genera (200 vs 400 pb); aunque en general, una de las grandes ventajas que ofrece este sistema

es el tiempo requerido para la secuenciación, el cual puede ir de 2-8 h, en función del equipo utilizado y el chip empleado (hay disponibilidad de chips que ofrecen personalizar la salida de información para diferentes aplicaciones) (Mellmann et al. 2011, Reuter et al. 2015). En este tipo de secuenciación. Los errores más comunes son inserciones y deleciones (Liu et al. 2012, Reuter et al. 2015).

Conocer las ventajas y desventajas que ofrece cada una de las plataformas de secuenciación es importante, sobre todo para definir la forma en que los datos serán tratados para su interpretación. Recientemente, se publicaron los resultados de un estudio orientado a comparar diferentes plataformas y distintas estrategias para el análisis de datos, para efectuar un análisis composicional de la microbiota intestinal. El estudio se basó en la secuenciación de amplicones del gen 16S rDNA en las plataformas Illumina MiSeq, Ion Torrent PGM y 454 GS FLX de Roche. Diferencias respecto al número de lecturas obtenidas con cada una de las plataformas, con mayoría de lecturas para las plataformas, tanto sin filtrar como filtradas, fueron reportadas para las plataformas 454 GS FLX (118,000 y 113,006 respectivamente) e Illumina (4'149,441 y 3'811,042 respectivamente), en comparación con las obtenidas mediante la plataforma PGM de Ion Torrent (481,593 y 71,652 después del filtrado). Las longitudes promedio de las lecturas obtenidas fueron de 377, 334 y 297 pb para 454 GS FLX, Illumina y Ion Torrent respectivamente. No obstante, los autores reportan caídas en la calidad de las secuencias para las plataformas 454 GS FLX e Illumina, mientras que la calidad en las secuencias obtenidas mediante Ion Torrent se mantuvo estable. De cualquier manera, también reportan que los perfiles composicionales del microbioma en cuestión fueron comparables entre plataformas, y más bien, la abundancia relativa calculada para cada nivel taxonómico mostró variaciones en función no solo de la plataforma empleada, sino por la forma en que se prepararon las librerías y la estrategia de análisis bioinformático (Allali et al. 2017)

Los avances en la secuenciación de alto rendimiento (High throughput sequencing) han permitido describir una gran cantidad de metagenomas, lo que brinda información acerca de la diversidad de especies microbianas presentes en una amplia variedad de matrices,



incluidas muestras acuáticas, de suelo y del cuerpo humano. Algo que tienen en común todos estos estudios es que utilizan tanto la secuenciación del gen 16S rDNA para establecer relaciones filogenéticas, como la secuenciación tipo “shotgun” más completa para predecir especies más detalladas y su composición genética (Reuter et al. 2015).

Este tipo de marcadores moleculares ribosomales tienen muchas ventajas para ser usados en estudios de secuenciación masiva y metagenómica, ya que los ribosomas son moléculas ubicuas funcionalmente constantes, consideradas en un inicio como cronómetros moleculares universales. En ese contexto, las estructuras primarias de las dos principales subunidades ribosomales, 16S y 23S, comprenden una particular combinación de regiones conservadas, variables e hipervariables que evolucionan a diferentes tasas y permiten la resolución tanto de linajes antiguos como de linajes modernos. Mientras tanto, sus estructuras pueden utilizarse para asegurar la homología posicional en múltiples alineamientos de secuencias y análisis filogenéticos, es por ello que el gen 16S rDNA se ha convertido en el marcador molecular mayormente secuenciado y es considerado la base para la clasificación sistemática vigente de bacterias y arqueas (Olsen y Woese 1993), además de que la comparación de estas secuencias representa una poderosa herramienta para deducir relaciones filogenéticas y evolutivas entre este tipo de microorganismos (Lane 1991, Weisburg et al. 1991, Langille et al. 2013, Yarza et al. 2014).

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al 16S rDNA, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle y ha sido considerado como un cronómetro molecular definitivo (Woese 1987). El tamaño de este marcador, relativamente largo (1500 pb), minimiza las fluctuaciones estadísticas, conserva su estructura secundaria, lo que aporta una base para alineamiento preciso y, dado a que su secuenciación resulta relativamente fácil, las bases de datos disponibles se encuentran en continuo crecimiento (Woese 1987, Rodicio y Mendoza 2004).

La secuenciación del gen 16S rDNA para la identificación de bacterias en plataformas de siguiente generación, involucra la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) de una región del gen 16S rDNA seguida por la preparación de librerías, secuenciación y análisis de la información. Estos aprovechamientos cultivo-independientes, sus múltiples aplicaciones y capacidades, han sido benéficas para el estudio detallado de la microbiota y diversidad microbiana de los alimentos (sobre todo los más complejos, como son los fermentados), lo que ha sido de gran impacto en el área de microbiología de los alimentos (Quigley et al. 2011). Especialmente en productos lácteos artesanales, un conocimiento a profundidad de la microbiota nativa no solo contribuye a su descripción y comprensión, sino que podría servir para la selección de microorganismos y establecer la dosis de cultivo iniciador que mejore los pasos de transformación e incremente las propiedades sensoriales del producto (Alegría et al. 2012, Aldrete-Tapia et al. 2014, De Filippis et al. 2014, De Pasquale et al. 2014, Galimberti et al. 2015).

Los quesos artesanales mexicanos (Grass y Cesín 2014, Villegas de Gante et al. 2014) han sido abordados mediante estudios relacionados con describir su microbiota mediante el uso de estrategias cultivo-independientes. Por ejemplo, mediante Pirosecuenciación, en la plataforma 454-FLX Titanium (Roche diagnostics Ltd., West Sussex, United Kingdom), se ha descrito la comunidad bacteriana de dos de estos quesos: El queso Bola (originario de Ocosingo, Chiapas) y el queso de Poro (Balancán, Tabasco), dos quesos madurados por la microbiota nativa de la leche de bovino (Cervantes-Escoto et al. 2008, González-Córdova et al. 2016). La microbiota del queso Bola de Ocosingo (protegido mediante “marca colectiva”) resultó estar fuertemente representada por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* y *L. plantarum*, aunque también se encontraron (en baja proporción) microorganismos como *Escherichia coli* y *Shigella flexnerii* a lo largo del proceso de elaboración, aunque no fue posible su recuperación mediante microbiología dependiente de cultivo (Aldrete-Tapia et al. 2018).

Respecto al queso de Poro (Balancán, Tabasco); desmineralizado y desmenuzado durante su elaboración (lo que provoca la formación de poros en el interior del queso), (Cervantes-Escoto et al. 2008, González-Córdova et al. 2016), comprende una microbiota representada por bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*; aunque

bacterias como *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Sediminibacter*, *Lactococcus* y *Enterococcus* estuvieron ocasionalmente presentes. A nivel de especie, posterior a la cuajada, los microorganismos dominantes fueron *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* (Aldrete-Tapia et al. 2014).

Específicamente, el queso Adobera de los Altos de Jalisco, es un queso fresco producido en los municipios pertenecientes a la región Altos del estado de Jalisco en México, una de las cuencas lecheras más importantes del país. Es un queso fresco artesanal elaborado con leche cruda de vaca (principalmente de la raza Holstein y sus cruza), que se describe como un queso fresco (o ligeramente añejado) de pasta tipo *Filata* acidificado por la microbiota nativa de la leche utilizada para su fabricación, de pH bajo y que funde al calentarse (Cervantes et al. 2016). El protocolo de elaboración de queso Adobera inicia con la recepción de leche y (ocasionalmente) su estandarización al 3% de contenido de grasa; seguidos de la coagulación con cuajo enzimático (relación cuajo: leche 1:10000), corte de la cuajada, agitación (trabajado del grano para favorecer la sinéresis) y desuerado. Uno de los pasos esenciales y distintivos del proceso de elaboración de queso Adobera es la acidificación en masa (chedarización) de la cuajada durante un período de tiempo que puede ir de 18 a 24 h usualmente a temperatura ambiente, lo que provoca un importante descenso del pH. Una vez acidificada la cuajada es molida para generar un tamaño de partícula homogéneo y adicionada con sal (1-2%) para su moldeado y prensado (Cervantes et al. 2008, Cervantes y Villegas de Gante 2012).

Un primer acercamiento orientado a describir la microbiota que conforma al queso Adobera se incluye en lo reportado por Murugesan et al. (2018). En este estudio basado en resultados obtenidos mediante secuenciación de amplicones del 16S y 18S rDNA reportan que la microbiota de este queso está fuertemente representada por bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Además, los autores reportan también la presencia de hongos como *Saccharomyces* sp., *Scheffersomyces* sp., *Galactomyces* sp. No obstante, el estudio no incluye resultados sobre la composición de la comunidad bacteriana de la leche utilizada para la elaboración del queso, ni de etapas intermedias del proceso de elaboración; lo que permitiría elucidar como es la dinámica

poblacional de la comunidad bacteriana de este queso asociada a las condiciones de procesamiento e incluso a factores como la estacionalidad.

El objetivo del presente capítulo es mostrar los resultados e inferencias obtenidas mediante el uso de secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rDNA orientado a describir la composición y estructura de la comunidad bacteriana del queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco, así como establecer la dinámica poblacional en diferentes etapas de elaboración del queso y en dos temporadas del año, para evaluar un posible efecto de estacionalidad.

Estrategia metodológica

Toma de muestras

Se seleccionaron tres queseras ubicadas en dos municipios de la región de los Altos de Jalisco. El criterio para la inclusión de las queseras fue que elaboraran queso Adobera bajo el esquema artesanal original reportado y mencionado con anterioridad (Cervantes et al. 2008, Cervantes y Villegas de Gante 2012), sin la adición de aditivos ni conservadores. Un total de 26 muestras fueron colectadas, correspondientes a 4 etapas de elaboración del queso: leche cruda (RM), cuajada fresca (FC), cuajada acidificada (MC) y queso (CH) en dos temporadas del año: temporada de secas (febrero a mayo) y temporada de lluvias (agosto a octubre); además de dos muestras de queso de la temporada de secas que se conservaron en refrigeración (4-7 °C) durante 21 días para evaluar cambios en la comunidad bacteriana durante la vida de anaquel. Las muestras fueron conservadas en refrigeración (4-7 °C) durante su transporte al Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos del CNRG-INIFAP y mantenidas a -20 °C hasta su procesamiento.

Extracción de DNA metagenómico

DNA metagenómico a partir de 0.2 g de cada una de las muestras colectadas se obtuvo mediante el uso del sistema comercial “Fecal DNA extraction Kit de Bio Basic® (Bio Basic, Canadá, inc). La integridad del DNA metagenómico se verificó a través de electroforesis

en geles de agarosa al 1% durante 50 min a 80 V. El DNA íntegro se almacenó a -20 °C hasta su uso en los procedimientos de secuenciación.

Generación de amplicones del gen 16S rDNA y secuenciación masiva de siguiente generación.

El DNA metagenómico de cada muestra se utilizó para la amplificación de 7 de las 9 regiones hipervariables del gen 16S rDNA (V2, V3, V4, V6-7, V8 Y V9) en dos reacciones independientes mediante el uso del sistema 16S metagenomics™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific Inc.) en un termociclador modelo SelectCycler (Select BioProduct, Life Science Research, Edison, EUA). Posteriormente, 50 nanogramos de una mezcla equimolar generada con los productos de amplificación fueron utilizados para la preparación de las librerías mediante el uso del sistema comercial Ion Plus Fragment™ y los adaptadores de código de barras Ion Xpress™ (Thermo Fisher Scientific Inc.). La purificación se realizó en cada uno de los pasos mediante el uso del sistema Agentcourt AMPure® XP de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Beckman Coulter, Inc., Atlanta, USA). La cuantificación de las librerías se llevó a cabo con el sistema comercial High sensitivity DNA kit y el Bioanalyzer® 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) para ajustar la concentración (26 pM). La amplificación en cadena de la polimerasa en emulsión (emulsion PCR) fue llevada a cabo en un volumen de 25 µl a partir de una mezcla equimolar de todas las muestras (One-Touch 2. ThermoFisher Scientific Inc) seguida de su enriquecimiento en el sistema comercial OneTouch Enrichment system™ (Thermo Fisher scientific Inc.). La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma PGM (Personal Genome Machine) de Ion Torrent.

Análisis bioinformático de las secuencias.

Los análisis primarios de las secuencias se realizaron en la plataforma Ion Browser® para determinar el rendimiento de secuencias y calidad obtenida. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas mediante el uso del programa QIIME 1.9 (García-Mena et al. 2016) disponible en Phyton 2.7 para el sistema operativo Ubuntu 17.10. Los archivos .BAM obtenidos de la plataforma PGM fueron primeramente convertidos a archivos .fastq. La calidad fue evaluada mediante el uso de FastQC 0.11.7 (Andrews 2010). Las regiones

de baja calidad de las secuencias fueron recortadas mediante el uso de la aplicación Trimmomatic 0.36 (Bolger et al. 2014). La asignación y agrupamiento de las unidades operacionales taxonómicas (OTU) fue llevada a cabo en la plataforma Usearch con un aprovechamiento de referencia abierto, en el cual las secuencias son comparadas con una base de datos para su asignación y aquellas secuencias que no se asignan a algún clúster se asignan a un algoritmo *de novo* para su agrupamiento (97% de correspondencia) (Edgar et al. 2011). Los OTUs filogenéticamente representativos fueron asignados con un 80% de similitud mediante el clasificador RPD (Cole et al. 2014). Los índices de diversidad alfa (especies observadas, Chao1, Shannon y Simpson) fueron determinados a partir de las curvas de rarefacción de las muestras, mientras que los índices de diversidad beta (distancias cualitativas y cuantitativas) fueron calculados a través del sistema métrico UniFrac (ponderados y no-ponderados). El análisis de coordenadas principales (PCoA) se generó a través del visualizador EMPeror (Vazquez-Baeza et al. 2013), además de que se utilizó análisis multivariado con un modelo lineal para identificar asociaciones entre la composición de la microbiota y algunas variables como estacionalidad, composición y etapa de elaboración del queso. Las secuencias derivadas de la secuenciación de las regiones variables del gen 16S rDNA se registraron en la base de datos del NCBI bajo en número de **accesión:**

Resultados y discusión

Se generaron las librerías de DNA para estimar la diversidad bacteriana basada en la amplificación de las diferentes regiones del gen 16S rDNA mediante PCR de las 26 muestras de queso en sus diferentes etapas de elaboración. Las librerías construidas fueron secuenciadas y analizadas de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se incluyen los resultados de las muestras de queso adobera en diferentes etapas de elaboración de las tres queseras incluidas en el estudio de secuenciación masiva (Q1-Q3), en dos temporadas del año (temporada de secas T1, y temporada de lluvias T2) y cuatro diferentes etapas de elaboración (RM=leche cruda, FC=cujada fresca sin acidificar, MC=Cujada acidificada y CH=queso terminado). Se observó que la región V3 es la que mayor número de identidades asignadas arrojó, seguida de la región V8 (Fig. 1.1). De



cualquier forma, los resultados incluidos se basan en la asignación de identidades mediante el uso de las 7 regiones hipervariables secuenciadas.

Un total de 4'231,053 lecturas fue obtenido, con un promedio de 162,732 lecturas por muestra. Después de realizar el filtrado de las secuencias, se lograron identificar 1,196 OTUs (con más de dos lecturas) y fueron asignados a 15 phyla, 30 clases, 72 orden, 180 familias y alrededor de 400 géneros bacterianos.

A partir del análisis se identificó la presencia de los phyla Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria; y de manera muy poca significativa Bacteroidetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Fusobacteria, Spirochaetes y Terenicutes.

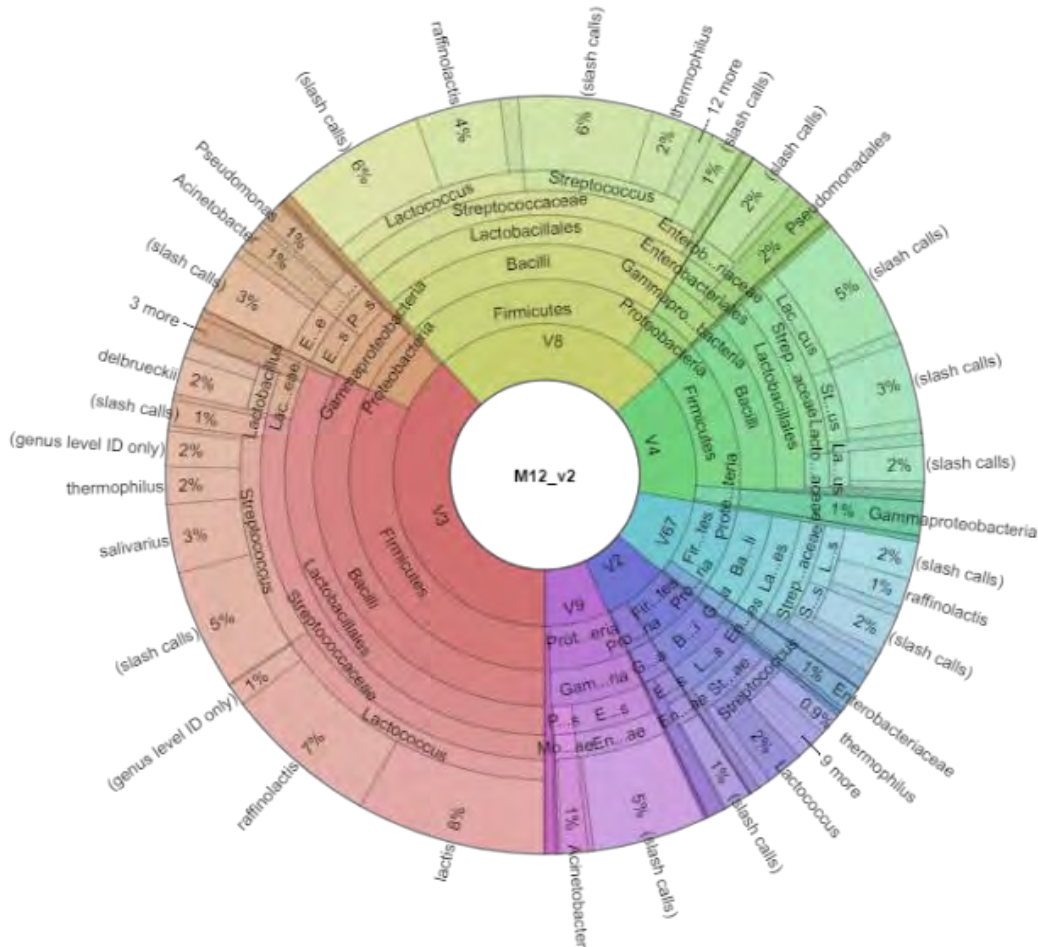


Figura 1.1 Ejemplificación de asignación de identidades a diferentes niveles taxonómicos de acuerdo a las diferentes regiones hipervariables del gen 16S rDNA

Los análisis primarios, obtenidos en la plataforma Ion Reporter® se llevaron a cabo mediante la inclusión de las 26 muestras. Posteriormente, los archivos resultantes se concatenaron a través del uso de la plataforma Use Galaxy® para generar un archivo único que incluyera la totalidad de las muestras obtenidas en los tres sitios de muestreo y dos temporadas del año.

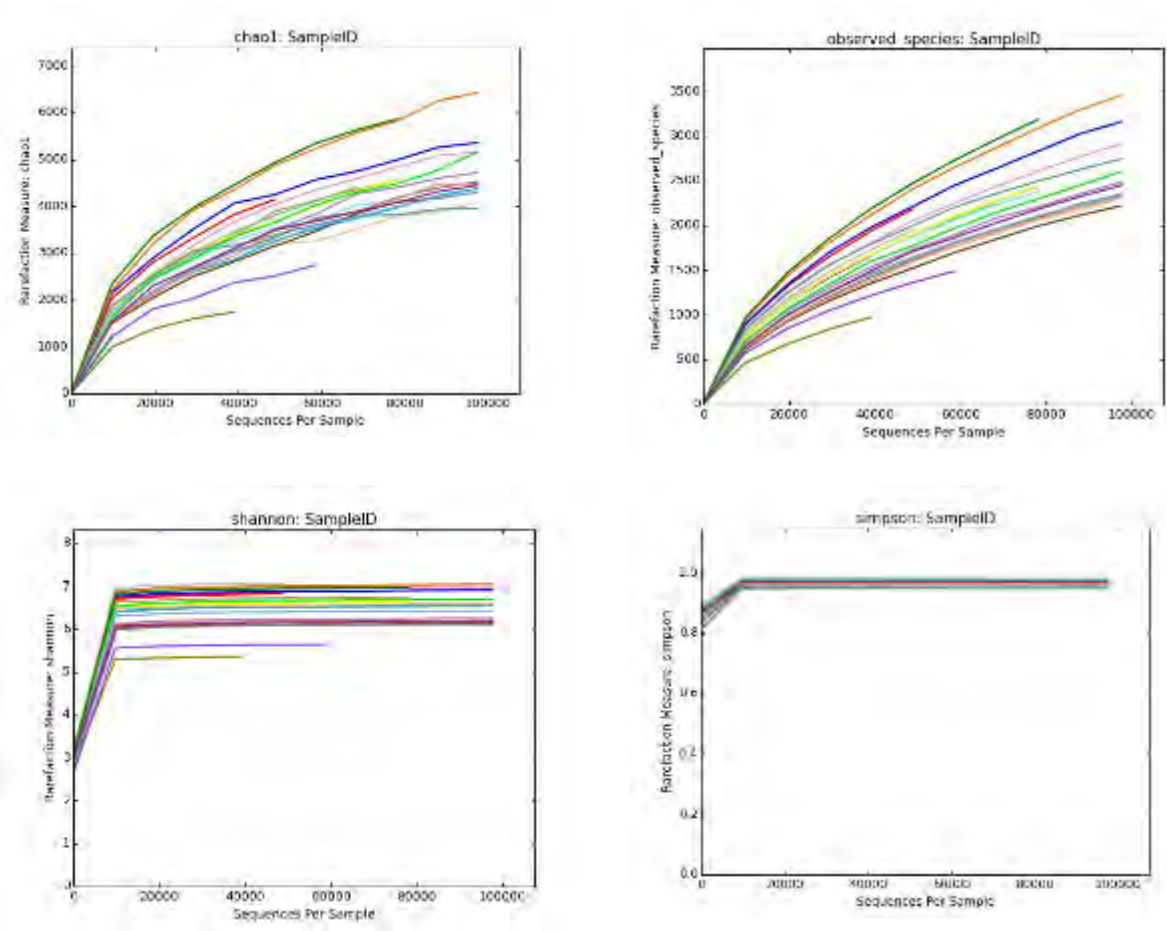


Figura 1.2 Curvas de rarefacción para los diferentes estimadores de diversidad alfa de la comunidad bacteriana de muestras de queso Adobera artesanal en diferentes etapas de elaboración

A través de las curvas de rarefacción (Fig. 1.2) para los diferentes índices de diversidad alfa, se puede observar que en todos los índices se alcanzó la saturación, es decir, que la probabilidad de encontrar OTU's nuevos o diferentes a los encontrados es limitada o nula. La asignación taxonómica indicó que los Phyla en mayor abundancia en la mayoría de las muestras fueron Firmicutes (promedio del total de las muestras (59.0%) y Proteobacteria (38.9%). El comportamiento general fue una disminución del phylum

Proteobacteria y aumento de Firmicutes conforme se avanzó en el proceso de elaboración del queso. Este comportamiento fue mucho más notable en las muestras de la temporada de secas (T1) donde al final del proceso (queso terminado) la proporción de proteobacteria fue solamente de 29%, mientras que la de firmicutes alcanzó una proporción superior al 70% (Fig. 1.3). Durante la vida de anaquel del queso se observa que la proporción de Firmicutes siguió en aumento y llegó a representar alrededor del 80% en muestras de 21 días, mientras que el phylum proteobacteria disminuyó hasta representar menos del 20% de abundancia relativa.

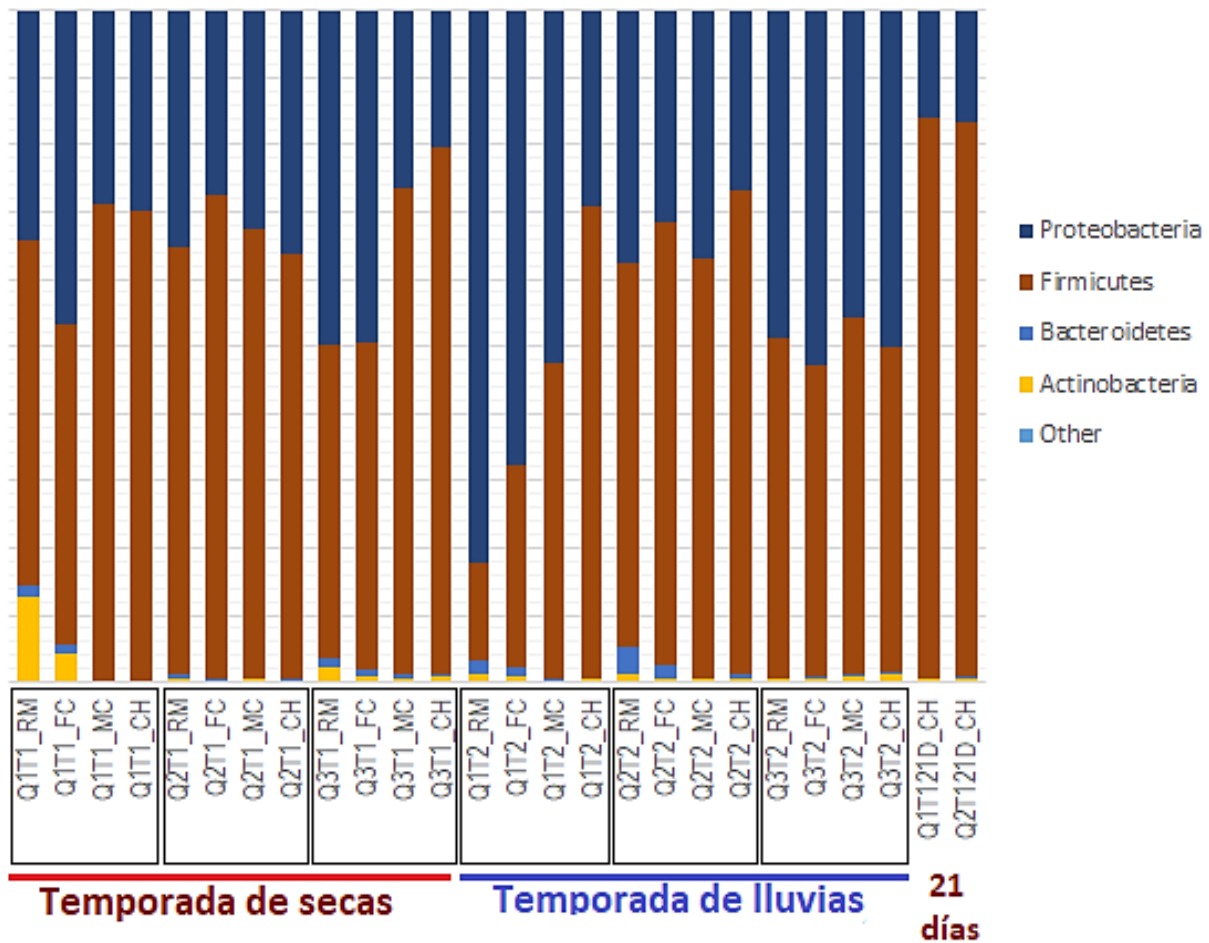


Figura 1.3 Tabla de abundancia a nivel Phyla para las muestras de queso adobera en diferentes etapas de elaboración y diferentes temporadas de muestreo. La letra Q representa el número de quesera, la letra T la temporada del año (T1 = temporada de secas, T2 = temporada de lluvias). (RM) = Leche cruda, (FC) = Cuajada Fresca, (MC) = Cuajada madurada o acidificada, (CH) = Queso como producto terminado

A nivel de clase (Fig. 1.4), Bacilli fue la clase predominante en todas las muestras (58.9% promedio del total de las muestras), seguido de Gammaproteobacteria (38.3%). En proporciones menores se encontraron las clases Actinobacteria, Flavobacteria, Alphaproteobacteria y Betaproteobacteria (<1%).

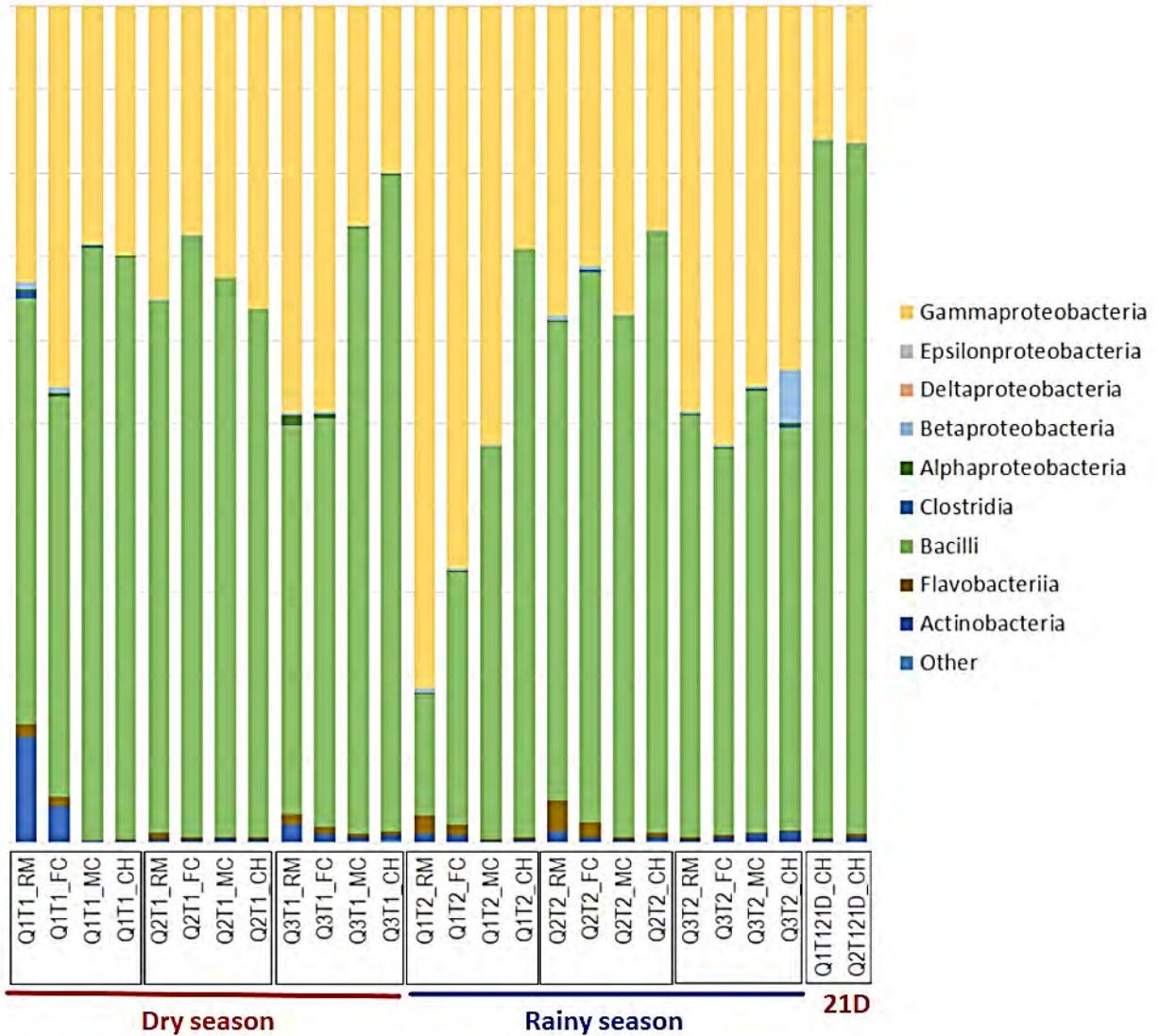


Figura 1.4 Tabla de abundancia a nivel Clase para las muestras de queso adobera en diferentes etapas de elaboración y diferentes temporadas de muestreo. La letra Q representa el número de quesera, la letra T la temporada del año (T1 = temporada de secas, T2 = temporada de lluvias). (RM) = Leche cruda, (FC) = Cujada Fresca, (MC) = Cujada madurada o acidificada, (CH) = Queso como producto terminado



La proporción de bacterias de la clase Bacilli fue superior en las muestras de leche de la temporada de secas (53.5%) y aumentó de manera considerable al final del proceso (70.3%) y durante la vida de anaquel del queso (82.9% a los 21 días). Mientras que Gammaproteobacteria registró paralelamente un descenso (38.8% en leche cruda vs 28.6% en queso y 16.2% en queso a los 21 días de vida de anaquel). El comportamiento de Bacilli fue similar durante la temporada de lluvias, no obstante, las proporciones que registraron fueron diferentes respecto a las muestras de la temporada de secas (40.7% y 55.6% en leche cruda vs 63.3% y 33.1% en queso terminado para Bacilli y Gammaproteobacteria respectivamente).

A nivel de orden (Fig. 1.5), los grupos de bacterias más representativos fueron los pertenecientes al orden de los Lactobacillales (58.2% de abundancia relativa en el total de las secuencias asignadas), seguido del orden de los Enterobacteriales (20.4%), los Aeromonadales (10.5%) y los Pseudomonadales (7.1%). El proceso de elaboración del queso favoreció el aumento de los Lactobacillales los cuales alcanzaron una abundancia relativa de 69.9% en queso de la temporada de secas y 63.2% en queso de la temporada de lluvias; a su vez que los Enterobacteriales, Aeromonadales y Pseudomonadales disminuyeron 17.4%, 7.6% y 3.4% para queso en temporada de secas y 26.8%, 5.1% y 1% para queso en temporada de lluvias respectivamente. De igual manera, la vida de anaquel parece ser que favorece el aumento en los Lactobacillales, que alcanzaron una abundancia relativa de 82.9% en queso de temporada de secas a los 21 días post-elaboración, al igual que disminuyó la proporción de Enterobacteriales (14.9%), Aeromonadales (0.8%) y Pseudomonadales (0.5%).

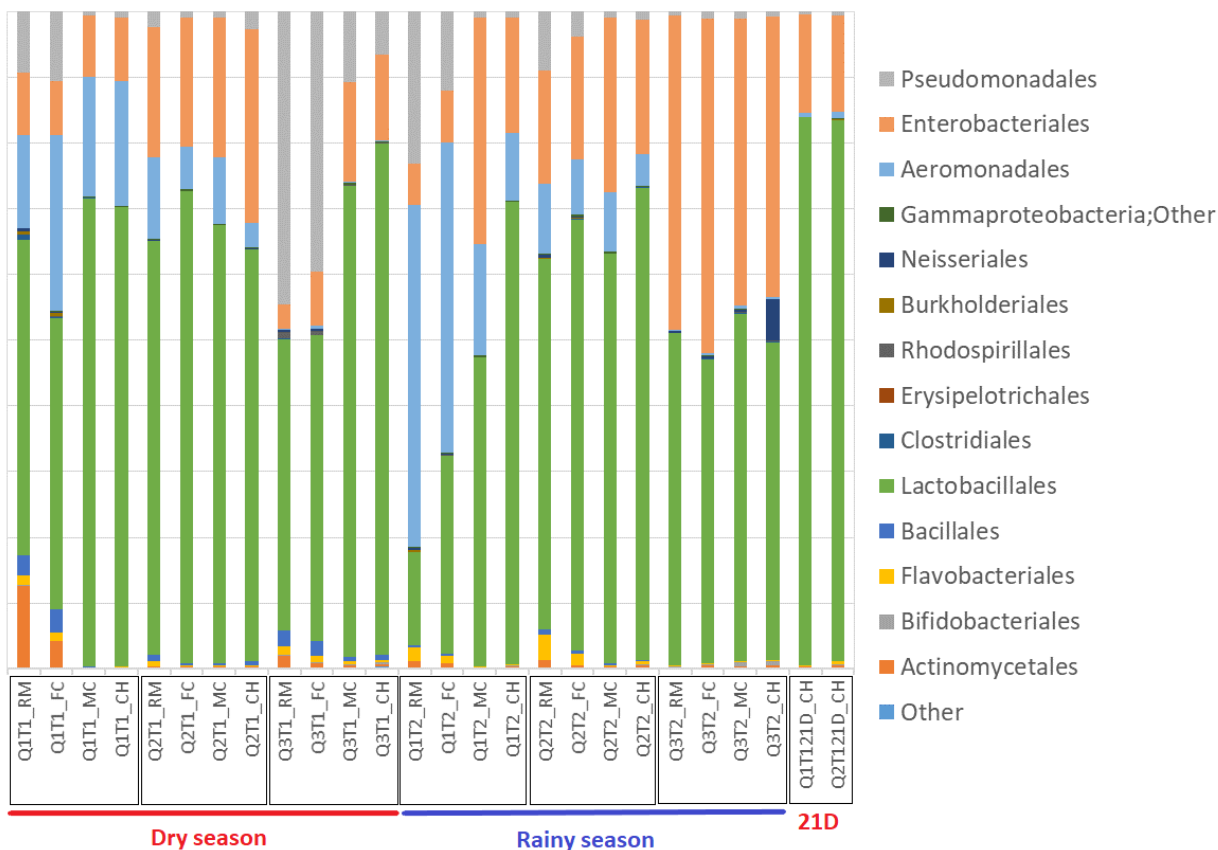


Figura 1.5 Tabla de abundancia a nivel de Orden para las muestras de queso Adobera en diferentes etapas de elaboración y diferentes temporadas de muestreo. La letra Q representa el número de quesera, la letra T la temporada del año (T1 = temporada de secas, T2 = temporada de lluvias). (RM) = Leche cruda, (FC)= Cuajada Fresca, (MC) = Cuajada madurada o acidificada, (CH) = Queso como producto terminado

Por otra parte, las familias de bacterias que registraron mayor abundancia en las muestras de queso Adobera (Fig. 1.6) fueron la Streptococcaceae (50.5% promedio en todas las muestras), la Enterobacteriaceae (20.4 % promedio), la Aeromonadaceae (10.5%), la Moraxellaceae (4.1%), la Lactobacillaceae (3.7%) y la Pseudomonadaceae (3.0%).

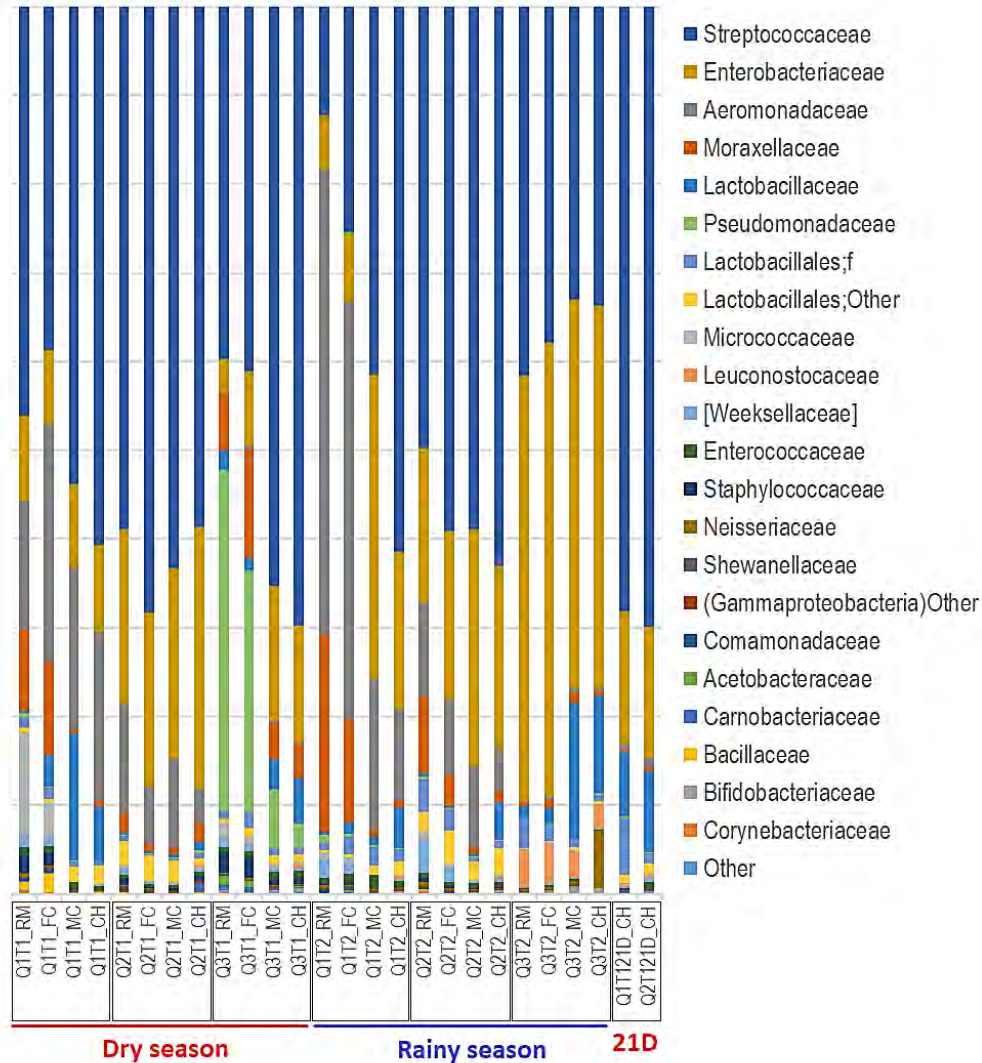


Figura 1.6 Tabla de abundancia a nivel de Familia para las muestras de queso adobera en diferentes etapas de elaboración y diferentes temporadas de muestreo. La letra Q representa el número de quesera, la letra T la temporada del año (T1 = temporada de secas, T2 = temporada de lluvias). (RM) = Leche cruda, (FC) = Cuajada Fresca, (MC) = Cuajada madurada o acidificada, (CH) = Queso como producto terminado

Al igual que a niveles taxonómicos superiores, la abundancia relativa a nivel familia se vio afectada tanto por la etapa de elaboración del queso como por la temporada del año en que se elabora (efecto de estacionalidad). La familia dominante en leche fue la Streptococcaceae (47.5% vs 34.3% para temporada de secas y lluvias respectivamente), la cual aumentó conforme se avanzó en el proceso de elaboración del queso (62.8% vs 52.4% para queso en temporada de secas y lluvias respectivamente). La proporción de esta familia de bacterias sigue en aumento durante la vida de anaquel (68.9% en queso de 21 d post elaboración en temporada de secas). La familia

Lactobacillaceae también aumentó durante la elaboración del queso y registró abundancias relativas de 4.1% y 6.6% en queso terminado en temporada de secas y lluvias respectivamente. Un ligero aumento también se observó para la familia Enterobacteriaceae (17.4% y 26.8% para queso en temporada de secas y lluvias respectivamente), mientras que el resto de las familias disminuyó.

Finalmente, los géneros predominantes en las muestras procesadas fueron *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, y *Pseudomonas* (Fig. 1.7, Tabla 1.1). La dinámica poblacional fue similar a la observada en niveles taxonómicos superiores. Los géneros bacterianos pertenecientes al grupo de bacterias ácido-lácticas (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*) aumentaron conforme se avanzó en el proceso de elaboración del queso. Mientras que géneros como *Acinetobacter* y *Pseudomonas* disminuyeron, logrando abundancias relativas alrededor del 1% en producto terminado. Las muestras evaluadas 21 días post-elaboración

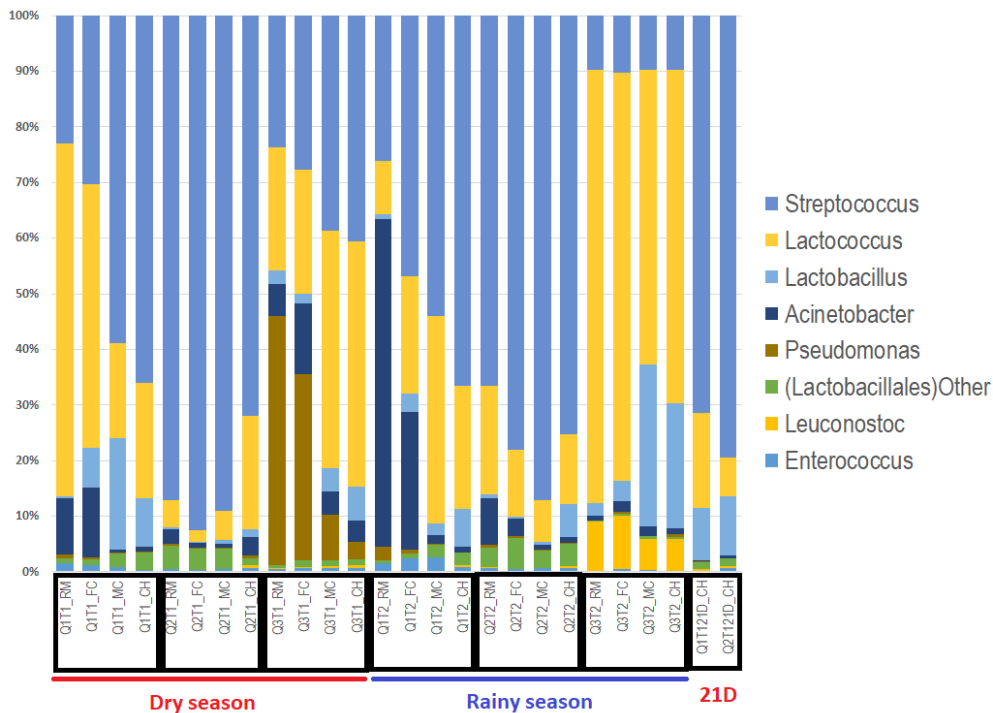


Figura 1.8 Tabla de abundancia a nivel de género para las muestras de queso Adobera en diferentes etapas de elaboración y diferentes temporadas de muestreo. La letra Q representa el número de quesera, la letra T la temporada del año (T1 = temporada de secas, T2 = temporada de lluvias). (RM) = Leche cruda, (FC) = Cuajada Fresca, (MC) = Cuajada madurada o acidificada, (CH) = Queso como producto terminado

Tabla 1.1 Principales géneros bacterianos encontrados en muestras de queso Adobera artesanal en diferentes etapas de elaboración y dos temporadas del año. (RM: leche cruda, FC: cuajada fresca, MC: cuajada acidificada, CH: Queso, CH-21D: queso con 21 días de vida de anaquel, Dry season: temporada de secas, Rainy season: temporada de lluvias). Los resultados representan la abundancia relativa de cada género expresada como porcentaje (%)

Genus	Dry season					CH-21D	Rainy season			
	RM	FC	MC	CH	RM		FC	MC	CH	
<i>Streptococcus</i>	29.10	34.47	43.90	41.40	48.35	17.13	24.17	27.77	34.60	
<i>Lactococcus</i>	18.17	14.23	16.50	21.10	9.55	16.90	16.13	16.37	17.60	
<i>Lactobacillus</i>	0.83	1.67	6.00	4.00	6.47	0.60	1.00	5.43	6.53	
<i>Acinetobacter</i>	3.90	5.67	1.40	1.90	0.21	8.37	4.03	0.70	0.63	
<i>Pseudomonas</i>	12.77	9.03	2.23	1.03	0.13	0.37	0.20	0.07	0.10	
<i>Serratia</i>	0.30	0.30	0.33	0.43	1.17	2.73	2.43	2.13	2.13	
<i>Enhydrobacter</i>	1.53	1.40	0.17	0.17	0.11	1.57	1.17	0.13	0.23	
<i>Leuconostoc</i>	0.03	0.03	0.10	0.27	0.63	1.40	1.43	0.97	1.10	
<i>Chryseobacterium</i>	0.93	0.60	0.17	0.23	0.15	1.63	0.80	0.10	0.23	
<i>Enterococcus</i>	0.53	0.47	0.50	0.43	0.32	0.33	0.47	0.60	0.40	
<i>Citrobacter</i>	0.47	0.50	0.80	0.50	0.34	0.23	0.33	1.13	0.47	
Other Enterobacteriaceae	9.53	10.70	13.53	15.50	12.47	20.23	22.57	30.53	23.73	
Other Aeromonadaceae	8.80	11.13	9.47	7.57	1.96	20.80	18.47	8.73	5.07	
Other Lactobacillales	2.10	2.47	2.20	1.77	3.76	3.47	3.43	2.30	2.47	
Other	11.00	7.33	2.70	3.70	14.38	4.23	3.37	3.03	4.70	

Relative abundance of most abundant bacterial genera in artisanal Adobera cheese in four stages of

En términos de diversidad alfa, entendida como el resultado del proceso evolutivo que se manifiesta en la existencia de diferentes especies dentro de una muestra particular, es decir, el conteo de especies sin necesidad de una evaluación del valor de importancia de cada especie dentro de la muestra; se evaluaron diferentes índices de diversidad (Moreno 2001). El primero, Chao1, basado en la presencia de especies extrañas (singletones y dobletones), registró mayor diversidad para las muestras de la temporada 1 en referencia a las de la temporada 2 (2709 vs 1232), lo que da indicio de que la comunidad bacteriana del queso está probablemente conformada por muchos géneros bacterianos, pero muchos de ellos con bajas abundancias.

El segundo índice de diversidad evaluado fue el índice de Shannon, que expresa el valor de uniformidad de los valores de importancia a través de las especies de una muestra; es decir, mide el grado de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido de una colección y asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Para éste índice, a nivel de género se observó que todas las muestras registraron valores de diversidad Shannon de entre 4.62 y 5.72 por lo que se asume que la microbiota de todas las muestras es megadiversa.

Finalmente se evaluó el índice de diversidad Simpson, que manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie o género (según corresponda). Éste índice está fuertemente influenciado por la importancia de las especies más dominantes. Los valores de diversidad para el índice de Simpson van de 0 a 1, mientras más se acerca el valor a 1, mayor es la posibilidad de dominancia; por el contrario, mientras más cercano a cero sea el valor, se concluirá que hay mayor diversidad en la muestra. Los índices de diversidad de Simpson para nuestras muestras fueron de entre 0.72 y 0.95, es decir hay dominancia de varios géneros bacterianos y la diversidad, de acuerdo a este índice, es baja, es decir, se espera que la comunidad estará fuertemente representada por un grupo selecto de géneros.

De acuerdo a los datos de diversidad y las diferencias entre las muestras obtenidas en diferentes etapas de elaboración del queso, se puede inferir que hay un efecto importante del proceso sobre la diversidad bacteriana de las muestras, es decir, hay mayor diversidad de bacterias en las muestras correspondientes a etapas iniciales del proceso, en relación a las etapas finales de elaboración. De igual manera, la dominancia de ciertos géneros bacterianos al inicio del proceso, como son bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae, se sustituye al final del proceso por aumentos considerables de bacterias de las familias Streptococcaceae y Lactobacillaceae; incluidos estreptococos, lactobacilos y lactococos. Esto hace que, en términos de diversidad (Beta) y abundancia, las muestras de diferentes etapas del proceso se diferencien entre sí (Fig. 1.9).

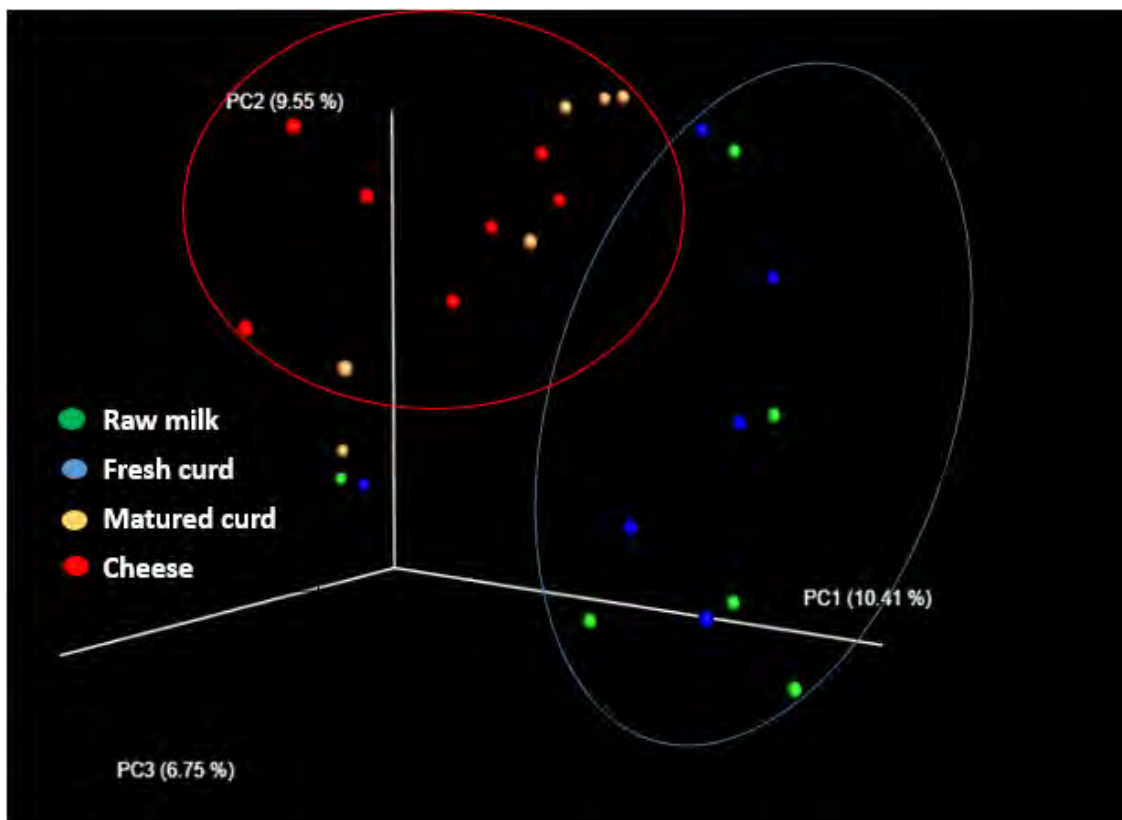


Figura 1.9 Gráfico de componentes principales para muestras de queso adobera en diferentes etapas de elaboración y dos épocas del año. La letra Q representa el número de quesera, la letra T la temporada del año (T1 = temporada de secas, T2 = temporada de lluvias). Raw milk = Leche cruda, Fresh curd = Cuajada Fresca, Matured curd = Cuajada madurada o acidificada, Cheese = Queso como producto terminado

La dinámica poblacional de la comunidad bacteriana del queso Adobera se puede apreciar en los árboles (heat-tree) incluidos en la figura 1.10, este tipo de representación utiliza la estructura jerárquica de las clasificaciones taxonómicas para cuantificar (mediante el uso de la abundancia media) y estadísticamente (usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon no paramétrica) representar diferencias taxonómicas entre comunidades microbianas (Foster et al). El árbol muestra los taxones más o menos abundantes en cada grupo; en los cuales cada ramificación representa uno de los géneros (o grupo de géneros) bacterianos más abundantes, además de que el grosor y la escala de colores ilustra la abundancia de cada uno de esos géneros en cada una de las etapas de elaboración del queso. Se observa que un paso crucial en la elaboración del queso es la acidificación en masa (chedarización) de la cuajada, lo que favorece el

aumento de géneros bacterianos (principalmente de bacterias ácido-lácticas) y limita la abundancia de otros.

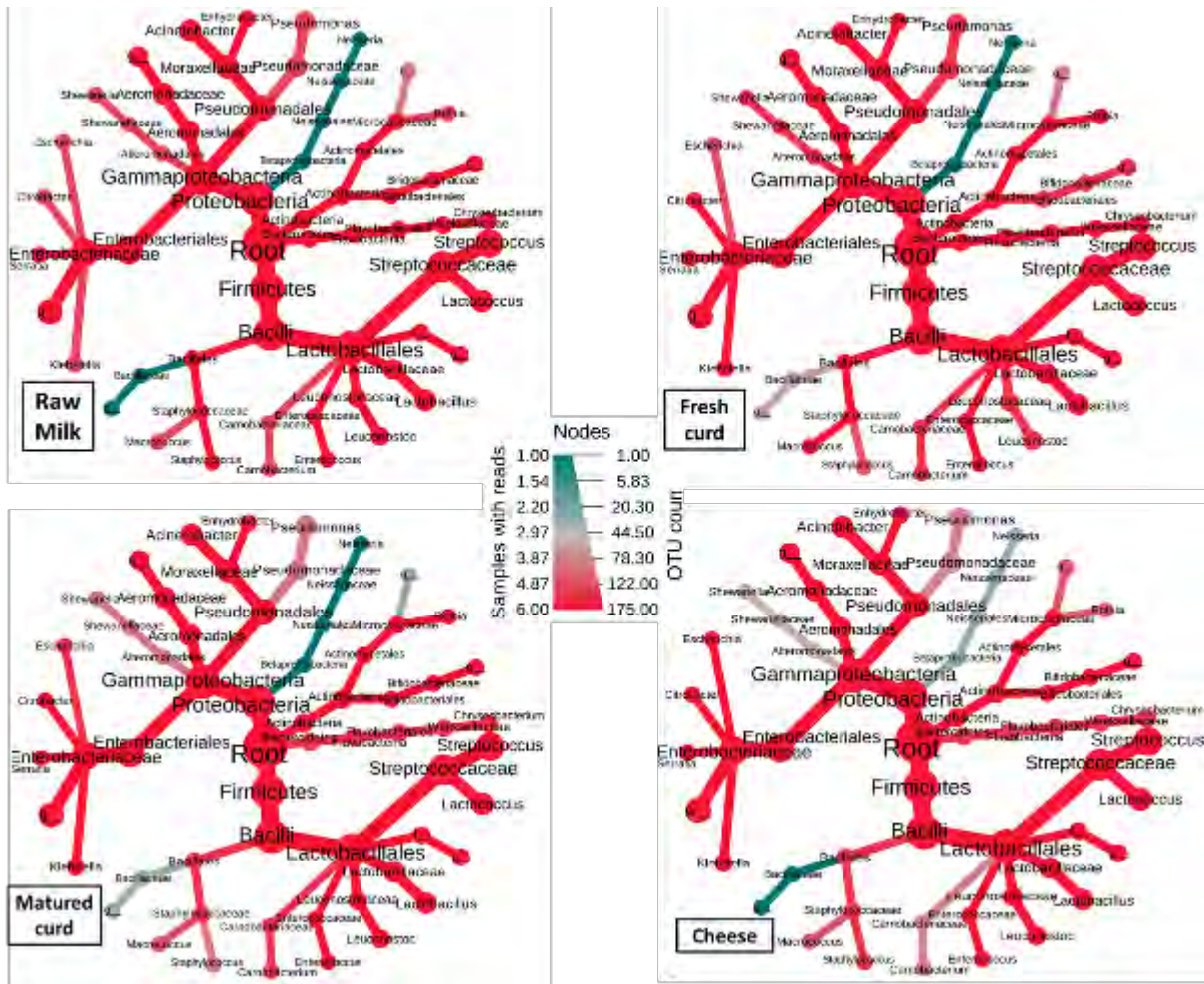


Figura 1.10 Arbol de abundancia de los principales géneros bacterianos en queso Adobera en cuatro etapas de elaboración. Cada nodo representa un género bacteriano, además de que las ramificaciones los vincula a su phylum correspondiente. El tamaño del nodo y la intensidad de color indica la ocurrencia de cada género. Raw milk = Leche cruda, Fresh curd = Cuajada Fresca, Mated curd = Cuajada madurada o acidificada, Cheese = Queso como producto terminado)

Por otra parte, la temporada del año en que se obtienen las muestras parece tener un impacto sobre la diversidad y abundancia de los diferentes géneros bacterianos en el queso. Esto podría corroborarse a través de la diversidad Beta ilustrada mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) (Fig. 1.11). Este hecho podría estar íntimamente relacionado con la calidad microbiológica de la leche que se utiliza para el proceso, así como de las condiciones bajo las que se obtiene. De acuerdo a la agrupación

observada en el gráfico de PCoA, la microbiota del queso producido en temporada de secas es diferente al generado en temporada de lluvias, tal como se había visto en la composición y estructura de la microbiota hasta ahora.

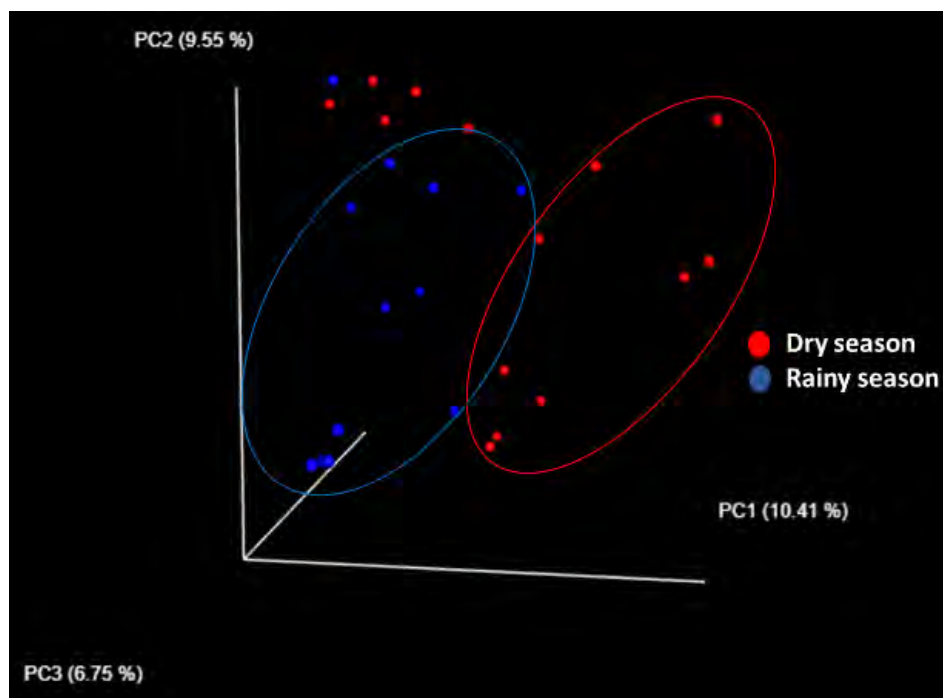


Figura 1.11 Gráfico de coordenadas principales (PCoA) para muestras de queso adobera en dos temporadas del año. La agrupación mostrada hace evidente diferencia en la composición de la comunidad bacteriana del queso en función de la temporada del año en que se produce.

Se ha establecido que la composición de la leche utilizada para elaborar queso puede tener efecto sobre la composición de la microbiota. Para evaluar el efecto de la composición del queso, las muestras de queso se clasificaron de acuerdo al contenido de grasa, proteína, concentración de aminoácidos libres y contenido de humedad (información no mostrada). El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la agrupación de las muestras en función de la composición de su comunidad bacteriana y de los componentes principales del queso mostró que el contenido de proteína parece tener influencia directa sobre la composición de la microbiota del queso (Fig. 1.12).

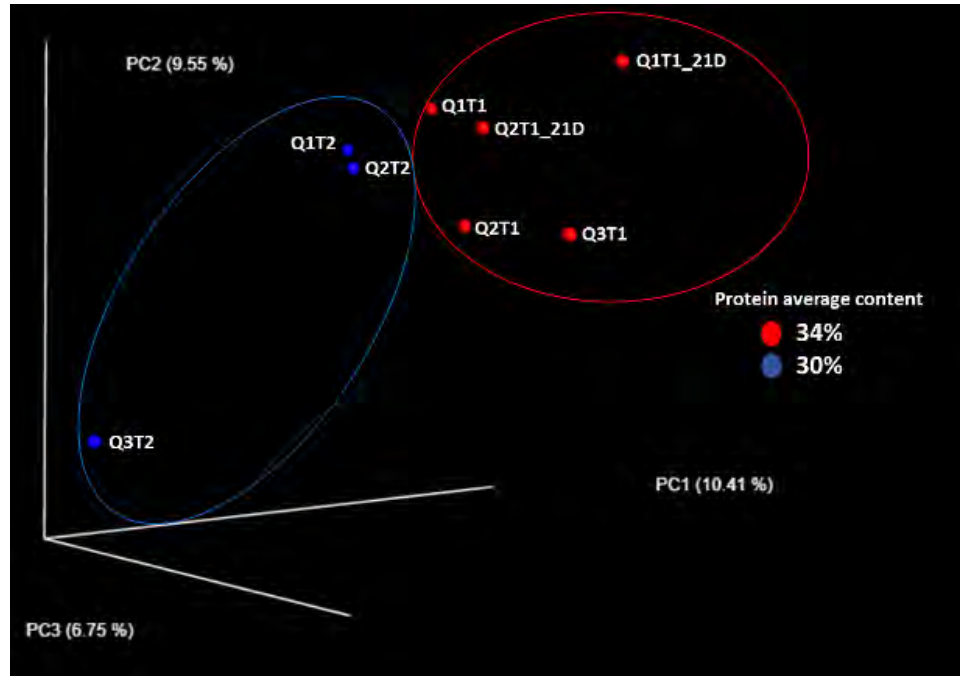


Figura 1.12 Gráfico de coordenadas principales (PCoA) para muestras de queso adobera en dos temporadas del año. La agrupación mostrada hace evidente diferencia en la composición de la comunidad bacteriana del queso en función de la temporada del año en que se produce.

Finalmente, basado en el análisis de correlaciones de Pearson, se identifica que ciertos géneros bacterianos tienen correlaciones (tanto positivas como negativas) con otros, lo que favorece o limita la incidencia de ciertos géneros bacterianos. El análisis muestra que los géneros que mayor interacción e influencia tienen en definir la composición de la comunidad bacteriana son *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Fig. 1.13).

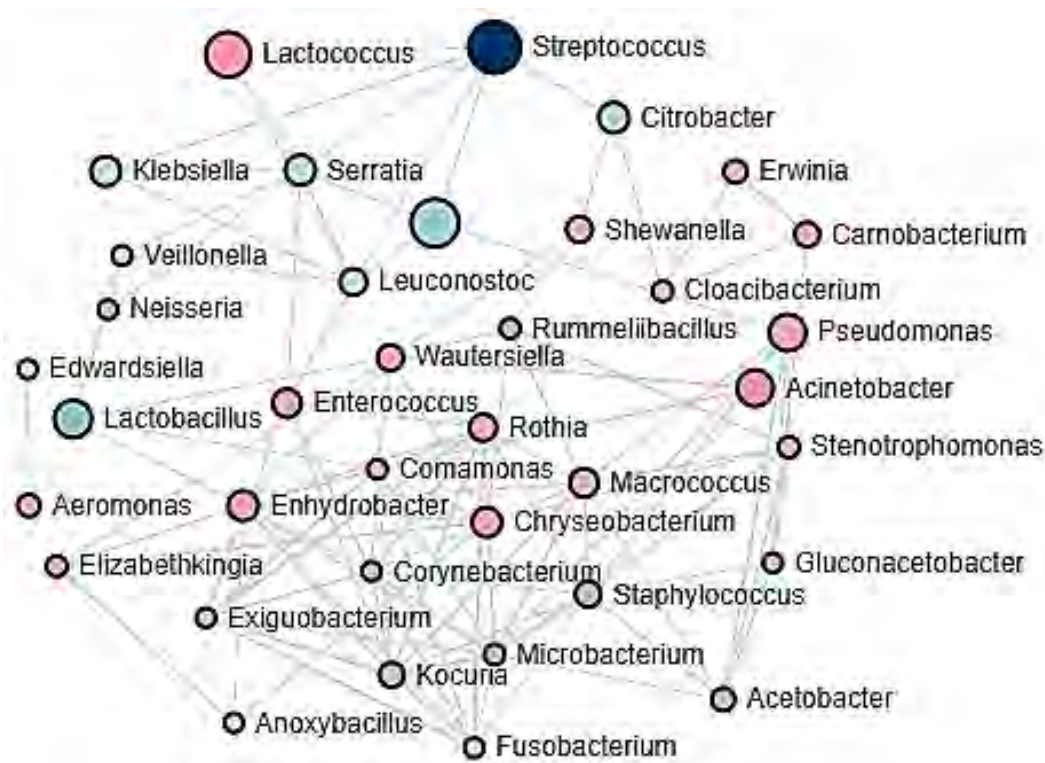


Figura 1.13 Esquemización de la interacción entre los géneros bacterianos de mayor abundancia en queso Adobera artesanal basado en el análisis de correlaciones de Pearson ($p < 0.05$, $P > 0.3$). Cada círculo representa un género bacteriano diferente. Círculos de mayor tamaño representan correlaciones de mayor magnitud un mayor número de correlaciones con otros géneros bacterianos. Las líneas conectan a cada género bacteriano con aquellos que se correlaciona.

La composición y estructura observada para el queso adobera Artesanal de los Altos de Jalisco es similar a lo reportado por Murugesan et al. (2018). El estudio, basado en la descripción de la microbiota de diferentes tipos de queso mexicanos, menciona que la microbiota de queso adobera para fundir está fuertemente representada por los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Esto cambia en Adobera de mesa (no fundente), para el que lo autores reportan que los géneros predominantes son *Marinomonas*, *Lactococcus*, *Lactobacillu* y *Enterobacter*.

Específicamente el género *Streptococcus*, que representa casi la mitad de la comunidad bacteriana observada en el queso, también ha sido reportado como un género dominante en la microbiota de otros quesos, como es el queso de Poro de Balancán, Tabasco, un

queso de pH bajo y madurado durante la vida de anaquel (Aldrete-Tapia et al. 2014). Este género bacteriano también fue reportado como el género más abundante en la comunidad bacteriana del queso Bola de Ocosingo Chiapas, en el que la abundancia relativa de éste género bacteriano puede ir desde un 44 hasta un 95%, en función del tiempo de maduración que se dé al queso, aun cuando la proporción de este género bacteriano fue baja en la leche cruda utilizada para la elaboración del queso (Aldrete-Tapia et al. 2018). Los autores mencionan que la proporción de *Streptococcus* (específicamente *S. thermophilus* que fue la especie representativa de este género) posiblemente aumenta debido al contenido de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular en leche (principalmente péptidos y aminoácidos) los cuales son necesarios para el crecimiento de este tipo de microorganismos; además de que estos compuestos nitrogenados también pueden ser provistos por la actividad metabólica de otras bacterias, lo que genera asociaciones comensales entre microorganismos (Giraffa et al. 2001, Courtin et al. 2002, Aldrete-Tapia et al. 2018).

Específicamente *Streptococcus thermophilus* es una de las bacterias ácido-lácticas termófilas utilizadas como cultivo iniciador, sobre todo para la producción de quesos duros y semi-duros, como son algunas variedades de queso italianas y suizas. Esto se puede explicar mediante la capacidad de adaptación a condiciones de estrés que tiene. Por ejemplo, en queso Emmental, mediante un estudio basado en proteómica, *S. thermophilus*, junto con *Propionibacterium freudenreichii* y *Lactobacillus helveticus*, exhibió sobreexpresión de proteínas asociadas a diversas condiciones de estrés durante la fabricación del queso, como son la maduración, concentraciones elevadas de ácido, calentamiento y cambios a nivel osmótico (Gagnaire et al. 2009).

Conclusiones

El estudio de la comunidad bacteriana asociada a la producción de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco revela que se trata de una microbiota compleja y megadiversa, no obstante, se encontró que mayormente está representada por bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Estos géneros bacterianos a su vez presentaron correlaciones importantes con otros, lo que indica que juegan un papel muy importante en definir la estructura de la microbiota del queso. El seguimiento de la dinámica poblacional de la microbiota durante la elaboración del queso reveló que la chedarización es un punto crucial para definir la estructura de la comunidad, lo que directamente podría influir las características sensoriales del queso; además que el efecto de estacionalidad también influye en dicha estructura. Pese a ser un producto catalogado como fresco, el queso Adobera presentó una microbiota comparable con la reportada para quesos madurados, lo cual podría redundar en riqueza de sabores y textura. La información obtenida en el presente estudio, complementada con el uso de microbiología dependiente de cultivo, podría servir como base para el diseño de cultivos iniciadores definidos mediante la selección de cepas con características tecnológicas deseables que puedan ser incorporadas durante el proceso de elaboración del queso para asegurar una comunidad bacteriana inocua y un producto de características homogéneas.

Referencias

- Aldrete-Tapia A., Escobar-Ramírez C. M., Tamplin M. L. y Hernández-Iturriaga M. (2018) Characterization of Bacterial Communities in Mexican Artisanal Raw Milk "Bola de Ocosingo" Cheese by High-Throughput Sequencing. *Front Microbiol* 9:2598. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02598](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02598).
- Aldrete-Tapia A., Escobar-Ramírez M. C., Tamplin M. L. y Hernández-Iturriaga M. (2014) High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiol* 44:136–141. DOI: [10.1016/j.fm.2014.05.022](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.022).
- Alegría Á., Szczesny P., Mayo B., Bardowski J. y Kowalczyk M. (2012) Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. *Applied and Environmental Microbiol* 78:1890–1898. DOI:10.1128/aem.06081-11.
- Allali I., Arnold J. W., Roach J., Cadenas M. B., Butz N., Hassan H. M., Koci M., Ballou A., Mendoza M., Ali R. y Azcarate-Peril A. (2017) A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol* 17:194. DOI:10.1186/s12866-017-1101-8.
- Andrews S. (2010) FastQC: a Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Bolger A. M., Lohse M. y Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–212. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170).
- Cervantes E. F., Villegas de Gante A., Cesín V. J. A. y Espinoza O. A. (2008) Los quesos mexicanos genuinos/ Genuine Mexican Cheeses: Patrimonio cultural que debe rescatarse. 1st ed. Mundi Prensa México, México City, Mexico.
- Cole J.R., Wang Q., Fish J. A., Chai B., McGarrell D. M., Sun Y., Brown C. T., Porras-Alfaro A., Kuske, C. R. y Tiedje, J. M. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res* 42:D633–D642. DOI: [10.1093/nar/gkt1244](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244).
- Coppola S., Blaiotta G. y Ercolini D. (2008) Dairy products. En: *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods* (Cocolin L. y Ercolini D., eds.). Springer, New York, Pp. 31–90.
- Courtin P., Monnet V. y Rul F. (2002) Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology* 148:3413–3421. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3413.
- De Filippis F., La Storia A., Stellato G., Gatti M. y Ercolini D. (2014) A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLoS ONE* 9(2):e89680. DOI:[10.1371/journal.pone.0089680](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089680).

- De Pasquale I., Di Cagno R., Buchin S., De Angeli M. y Gobbetti M. (2014) Microbial ecology dynamics reveal a succession in the core microbiota involved in the ripening of pasta filata caciocavallo pugliese cheese. *Appl Environ Microbiol* 80(19):6243-55. DOI: [10.1128/AEM.02097-14](https://doi.org/10.1128/AEM.02097-14).
- Dohm J. C., Lottaz C., Borodina T. y Himmelbauer H. (2008) Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 36(16):e105. DOI: [10.1093/nar/gkn425](https://doi.org/10.1093/nar/gkn425).
- Droege M. y Hill B. (2008) The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol* 136(1-2):3-10. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2008.03.021](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.03.021).
- Edgar R. C., Haas B. J., Clemente J. C., Quince C. y Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27(16):2194–2200. DOI: [10.1093/bioinformatics/btr381](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381).
- Foster Z. S. L., Sharpton T. J., y Grünwald N. J. (2017) Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology* 13(2), e1005404. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1005404](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005404).
- Frank J.F. (1997) Milk and dairy products. En: *Food Microbiology — Fundamental and Frontiers*. (Doyle P., Beuchat R. y Montville J. eds.). ASM Press, Herndon, Virginia, USA.
- Galimberti A., Bruno A., Mezzasalma V., De Mattia F., Bruni I. y Labra M. (2015) Emerging DNA-based technologies to characterize food ecosystems. *Food Res Int* 69:424-433. DOI: [10.1016/j.foodres.2015.01.017](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.017).
- García-Mena, J., Murugesan, S., Pérez-Muñoz, A. A., García-Espitia, M., Maya, O., Jacinto-Montiel, M., ... Núñez-Cardona, M. T. (2016). Airborne bacterial diversity from the low atmosphere of greater Mexico City. *Microbial Ecology*, 72, 70–84. DOI: [10.1007/s00248-016-0747-3](https://doi.org/10.1007/s00248-016-0747-3).
- Giraffa G., Paris A., Valcavi L., Gatti M. y Neviani E. (2001) Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J Appl Microbiol* 91:937–943. DOI: [10.1046/j.1365-2672.2001.01464.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01464.x).
- Gonzalez C. A. F., Yescas C., Ortiz E. A. M., De la Rosa A. M. A., Hernández M. A. y Vallejo C. B. (2016) Invited Review: Artisanal Mexican Cheeses. *J Dairy Sci* 99 3250-3262. DOI: [10.3168/jds.2015-10103](https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103).
- Grass R. J. F. y Cesín V. A. (2014) Situación actual y retrospectiva de los quesos genuinos de Chiautla de Tapia, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 11(2) 201-221.
- Guo J., Xu N., Li Z., Zhang S., Wu J., Kim D. H., Sano M. M., Meng Q., Cao H., Li X., Shi S, Yu L., Kalachikov S., Russo J. J., Turro N. J. y Ju J. (2008) Four-color DNA

- sequencing with 30-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(27):9145–9150. DOI: [10.1073/pnas.0804023105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804023105).
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rDNA sequencing. En: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt E. y Goodfellow M. eds.) Wiley & Sons, New York, N.Y. Pp. 115–176.
- Langille M. G., Zaneveld J., Caporaso J. G., McDonald D., Knights D., Reyes J., Clemente J. C., Burkpile D. E., Thurber R. V., Knight R., Beiko R. G. y Huttenhower C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnol* 31(9): 814–821. DOI: [10.1038/nbt.2676](https://doi.org/10.1038/nbt.2676)
- Lavezzo E., Barzon L., Toppo S. y Palú G. (2016) Third generation sequencing technologies applied to diagnostic microbiology: benefits and challenges in applications and data analysis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, DOI: 10.1080/14737159.2016.1217158.
- Licitra G., Caccamo M. y Lortal S. (2019) Chapter 9 - Artisanal Products Made with Raw Milk. En *Raw Milk* (Nero L. A. y Fernandes de Carvalho A., eds.) Academic Press. Pp. 175-221. DOI: 10.1016/B978-0-12-810530-6.00009-2.
- Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L. y Law, M. (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012. DOI:10.1155/2012/251364.
- Macori G. y Cotter P. D. (2018) Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Curr Opin Biotechnol* 49:172-178. DOI: [10.1016/j.copbio.2017.09.002](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.002).
- Marco M. L., Heeney D., Binda S., Cifelli C. J., Cotter P. D., Foligne B., Ganzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E. J. y Hutkins R. (2017) Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol* 44:94-102. DOI: [10.1016/j.copbio.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010).
- Mellmann A., Harmsen D., Cummings C. A., Zentz E.B., Leopold S. R., Rico A., Prior K., Szczepanowski R., Ji Y., Zhang W., McLaughlin S. F., Henkhaus J. K., Leopold B., Bielaszewska M., Prager R., Brzoska P. M., Moore R. L., Guenther S., Rothberg J. M. y Karch H. (2011) Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6(7):e22751. DOI: [10.1371/journal.pone.0022751](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022751).
- Moreno C. E. (2001) Métodos para medir la biodiversidad. Primera edición. Manuales y Tesis SEA. Vol. 1 Zaragoza, España. 84 pp.
- Olsen G. J. y Woese C. R. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 7(1):113-23. DOI: [10.1096/fasebj.7.1.8422957](https://doi.org/10.1096/fasebj.7.1.8422957).



- Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F. y Cotter P. D. (2011) Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int J Food Microbiol* 1,150(2-3):81-94. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001).
- Reuter J. A., Spacek D. V. y Snyder M. P. (2015) High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* 58(4):586-97. DOI: [10.1016/j.molcel.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004).
- Rodicio M. R. y Mendoza M. C. (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(4):238-245. DOI: [10.1016/S0213-005X\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73073-6).
- Vazquez-Baeza Y., Pirrung M., Gonzalez A. y Knight R. (2013) EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience* 2(1):16. DOI: [10.1186/2047-217X-2-16](https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-16).
- Villegas de Gante A., Cervantes E. F., Cesín V. A., Espinoza O. A., Hernández M. A., Santos M. A. y Martínez-Campos A. R. (2014) Atlas de los quesos mexicanos genuinos. 1st ed. Ed. Biblioteca básica de Agricultura, Texcoco, México, México.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. y Lane DJ. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173(2):697-703. DOI: [10.1128/jb.173.2.697-703.1991](https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991).
- Woese C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-7.
- Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F. O., Ludwig W., Schleifer K. H., Whitman W. B., Euzéby J., Amann R. y Rosselló-Móra R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12(9):635-45. DOI: [10.1038/nrmicro3330](https://doi.org/10.1038/nrmicro3330).

CAPITULO II.

DESCRIPCIÓN DE TEXTURA Y COMPOSICIÓN DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO

Desarrollo y validación de modelos de predicción basados en FT-IR para evaluar la composición y textura de queso Adobera artesanal

Ruvalcaba-Gómez José Martín¹, Arteaga-Garibay Ramón Ignacio², Delgado-Macuil Raúl Jacobo¹,

¹ Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac – Tepetitla, km. 1.5. Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Blvd. de la Biodiversidad #400. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600.

Autor de correspondencia: Raúl Jacobo Delgado-Macuil. E-mail: rdelgadom@ipn.mx

Resumen

La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier tiene la capacidad de generar el perfil químico de una gran variedad de muestras, de manera rápida, estable y no destructiva, por lo que se ha aplicado a diversas matrices alimenticias, incluido el queso. El presente estudio tuvo como objetivo generar, validar y aplicar modelos de predicción basados en FTIR y análisis de regresión para determinar el perfil de textura y composición del queso. Los modelos obtenidos mostraron buena capacidad de predicción ($r^2 > 0.8$) para todos los atributos evaluados. La textura del queso Adobera fue similar entre las muestras obtenidas en temporada de secas y lluvias, mientras que diferencias ($p < 0.05$) fueron observadas para los contenidos de grasa, proteína y aminoácidos libres. Los resultados contribuyen a contar con alternativas analíticas para evaluar la calidad del queso basados en su composición química de manera rápida y confiable.

Introducción

El queso es uno de los derivados lácteos de mayor distribución en el territorio mexicano; ya que se sabe que más del 14% de la leche que se produce en el país se destina a la producción de una amplia gama de quesos, industrializados y artesanales; incluidos los quesos mexicanos genuinos (Cervantes et al. 2008, Agricultura 2019). En ese contexto, la preferencia de los consumidores por cualquier producto alimenticio, incluido el queso, está principalmente determinada por sus características sensoriales; por lo que contar con metodologías precisas para la monitorización de propiedades sensoriales facilita la producción de alimentos de buena calidad sensorial.

Contar con métodos novedosos, rápidos y no destructivos para evaluar diferentes atributos de calidad del queso ha sido una premisa en la última década. A diferencia de los métodos convencionales, estas metodologías se basan en la adquisición de la información sin tener contacto directo con la muestra y se basan principalmente en el uso de visión por computadora, espectroscopia de infrarrojo cercano, espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier, espectroscopia Raman, imagen hiperespectral y otras técnicas que han sido aplicadas para la producción de queso, determinar su calidad, origen geográfico y adulteraciones (Downey et al. 2005, Everard et al. 2007, Abbas et al. 2012, Barreto et al. 2018, Ferragina et al. 2013, Wu & Sun 2013, Currò et al. 2017, Loudiyi et al. 2018, Vásquez et al. 2018, Lei y Sun 2019)

Específicamente, la espectroscopia de infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica basada en el principio de que la diferenciación de grupos funcionales puede realizarse mediante las diferencias en la energía necesaria para su excitación (Lei y Sun 2019). A través de FTIR se puede obtener un perfil químico general de las muestras, el cual estará en función de la composición y concentración de compuestos. El avance en desarrollar técnicas basadas en instrumentación como es la reflectancia total atenuada (ATR) y quimiometría ha permitido generar información relacionada con la composición de diversas matrices alimenticias a través del procesamiento de datos obtenidos mediante espectroscopia infrarroja (Subramanian et al. 2009)

La FTIR registra el estiramiento vibratorio y rotacional fundamental de las moléculas, lo que produce un perfil químico de la muestra. La región del infrarrojo medio ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) es una región del espectro electromagnético en la que se pueden medir de manera confiable diferencias muy pequeñas en la composición de las muestras. Las moléculas absorben la energía y exhiben vibraciones en una o más regiones del espectro, dependiendo de varios factores (como la configuración del enlace y la ubicación), lo que ayuda a inferir la composición y la estructura de las moléculas químicas (Subramanian et al. 2016).

En la *Figura 2.1* se ilustran los espectros de un concentrado de proteína de suero y un queso suizo; cada uno de los grupos funcionales se asocia a alguno de los componentes de la matriz. Por ejemplo, el queso cheddar se caracteriza por la absorbancia generada por el complejo de grasa y proteína en las regiones entre $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$ y $1800-1000 \text{ cm}^{-1}$, respectivamente. También presenta estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos C-H en los grupos metileno de largas cadenas de ácidos grasos ($3000-2800 \text{ cm}^{-1}$), una fuerte señal del grupo C-O de ésteres de ácidos grasos (1740 cm^{-1}), las bandas de las amidas I y II asociadas a proteína (1640 y 1540 cm^{-1} , respectivamente), además de varias bandas en la región $1800-900 \text{ cm}^{-1}$ asociadas a flexión de los enlaces C-H y C-O-H, y estiramiento del C-O asociado a lípidos, ácidos orgánicos, aminoácidos y derivados de carbohidratos (Subramanian et al. 2016).

Las propiedades espectrales del queso han sido aprovechadas para su caracterización. Por ejemplo, el uso de espectros de FTIR obtenidos mediante ATR permitió determinar la composición y tiempo de maduración de muestras de queso Suizo, mediante un sencillo protocolo que permitió generar modelos de predicción con elevados coeficientes de correlación ($r > 0.95$) y valores bajos de error estándar durante la validación para la determinación de humedad, proteína y grasa, sin importar el grado de maduración; además de que provee de bandas distintivas que permiten la clasificación del queso de acuerdo al productor y edad del queso, muy probablemente por la formación de grupos carbonilos (1800 a 1730 cm^{-1}) durante la maduración. Por lo que FTIR provee información que permite un mejor entendimiento de los complejos cambios bioquímicos que ocurren

durante la maduración del queso a través de protocolos simples de aplicar (Rodríguez-Saona et al. 2006).

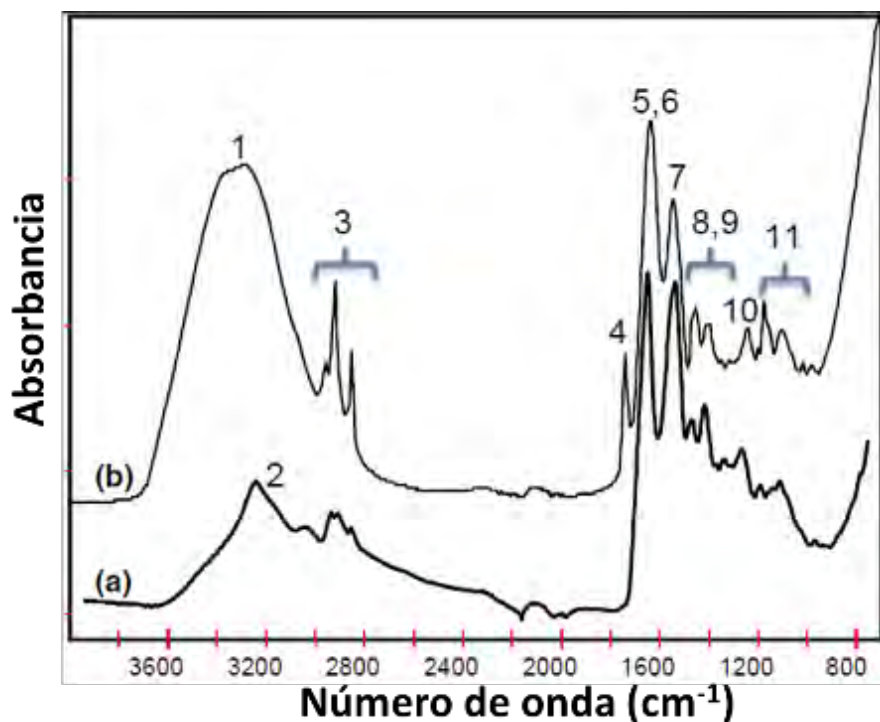


Figura 2.1 Espectro FTIR de (a) concentrado de proteína de suero y (b) Queso suizo. Se presenta la asignación de los principales grupos funcionales. 1: 3600-3300, estiramiento OH asociado al contenido de agua. 2: 3280-3225, Amida A (N-H), vibraciones de tensión. 3: 3050 =CH₂, vibraciones de tensión. 4: 1740 C=O, estiramiento de ésteres. 5: 1700-1600 Amida I, C=O vibración de enlaces peptídicos. 6: 1654, flexión del O-H, agua. 7: 1580-1510, Amida II, flexión del N-H. 8: 1500-1300, flexión del C-H de CH₂ y CH₃ de grasas y proteínas. 9: 1400, estiramiento simétrico del C=O; COO-. 10: 1200-1350, Amida III, flexión del NH y estiramiento de CN. 11: 1299-900 (huella dactilar), estiramiento de C-O y C-C; deformación de C-O-H y C-O-C en carbohidratos (Subramanian et al. 2016)

Más recientemente se ha publicado un estudio similar para determinar la composición del queso Cheddar a través del uso de análisis de transmitancia en infrarrojo medio en combinación con un sensor de conductividad en línea acoplado a un analizador de leche basado en infrarrojo cercano. Mediante esta aplicación, se midió el contenido de grasa, proteína, humedad y sal, validado mediante técnicas convencionales; con lo que se concluye que el uso de infrarrojo medio puede ser una sencilla y efectiva forma para determinar la recuperación de proteína durante la elaboración del queso (Margolies y Barbano et al. 2018).

Otra aplicación reportada del uso de FTIR-ATR en combinación con análisis quimiométrico es la publicada por [Gori et al. \(2012\)](#), mediante la cual diferencian queso Parmigiano-Reggiano de otros quesos tipo-grana (denominados así por su textura granular) de Italia y las regiones centro y norte de Europa, lo que representó una técnica viable que no requiere de análisis químico para su discriminación.

El objetivo del presente estudio fue generar modelos de predicción basados en FTIR-ATR y análisis de correlación para determinar el perfil composicional y de textura del queso Adobera artesanal y su uso para la caracterización del queso, así como evaluar la correlación entre los diferentes parámetros de calidad del queso, establecer variaciones asociadas a la estacionalidad y su relación con los principales grupos de bacterias que integran su microbiota.

Estrategia metodológica

Toma de muestras

Se colectaron muestras de queso Adobera artesanal a partir de tres plantas procesadoras de leche ubicadas en dos municipios de la región Altos Sur del estado de Jalisco, México. Las muestras se mantuvieron en refrigeración (4-7 °C) hasta su análisis (no más de 48 h). De cada quesera se tomaron dos muestras al azar de diferentes lotes de elaboración. La toma de muestras se llevó a cabo en dos temporadas del año: temporada de secas (febrero-mayo) y temporada de lluvias (agosto-noviembre) para determinar efecto de estacionalidad.

Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

Se utilizó un equipo de FTIR marca Bruker® modelo Vertex 70 en el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR), con el cual se obtuvieron los espectros de infrarrojo de secciones cúbicas de cada queso (1x1x1 cm). Las muestras se colocaron sobre el cristal del equipo y se cubrieron con un portaobjetos para aplicar presión positiva sobre la muestra. De cada muestra se generó el espectro FTIR medio (4000-400 cm^{-1}) a partir de un total de 120 mediciones por muestra y una resolución de 4 cm^{-1} . Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Generación y validación de modelos de predicción para determinar la composición y textura de queso adobera.

A partir de una colección de espectros de FTIR, perfil de composición fisicoquímica y perfil de textura medida instrumentalmente de muestras de queso Adobera obtenidos en un ensayo previo, se evaluó la factibilidad de su uso para generar modelos de predicción. Para ello, los datos espectrales (datos crudos, datos con función de primera y segunda derivada) se sometieron a análisis de regresión por cuadrados mínimos parciales. Como variable de respuesta se utilizaron los datos obtenidos tanto a partir de los análisis de composición (pH, grasa, proteína, aminoácidos libres y humedad) así como del análisis de perfil de textura (dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad, gomosidad y resiliencia). Como predictores se utilizaron los números de onda o las frecuencias de las

regiones del espectro de infrarrojo medio más informativas. La validación cruzada se llevó a cabo mediante la función *–leave one out–* (dejar uno fuera). Se obtuvieron las gráficas de puntuación de componentes principales en dos y tres dimensiones. A partir del gráfico de coeficientes estándar se determinó el número de predictores a incluir en cada modelo, con base en la información que proporcionan para cada una de las variables de respuesta, con el objetivo de generar modelos de predicción más precisos (valores de r^2 cercanos a 1).

Procesamiento de los datos

La información espectral obtenida se graficó en software Origin ver 8.0 ® y se procesó por análisis multivariado y de regresión mediante el análisis de componentes principales, regresión por mínimos cuadrados parciales y regresión lineal en el paquete estadístico Minitab ver. 16 ®. El análisis estadístico de los datos de composición y textura de las muestras se llevó a cabo mediante un modelo lineal general (GLM a través de una prueba de ANOVA con la comparación de medias mediante la prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$) en el paquete estadístico SAS™ 9.0 (SAS Institute Inc., NC, USA). Finalmente se llevó a cabo un análisis de correlación (Pearson) en el mismo paquete estadístico para establecer asociación entre las diferentes variables evaluadas en queso.

Resultados y discusión

Diferenciación de muestras de queso adobera artesanal mediante FTIR

Para evaluar la sensibilidad y factibilidad del uso de FTIR para el análisis de muestras de queso Adobera, se procesó un grupo inicial de muestras obtenidas durante la temporada de secas al día posterior a su fabricación y 21 días después (vida de anaquel). El espectro característico para las muestras de queso, y los grupos funcionales de mayor contribución, se muestran en la Figura 2.2.

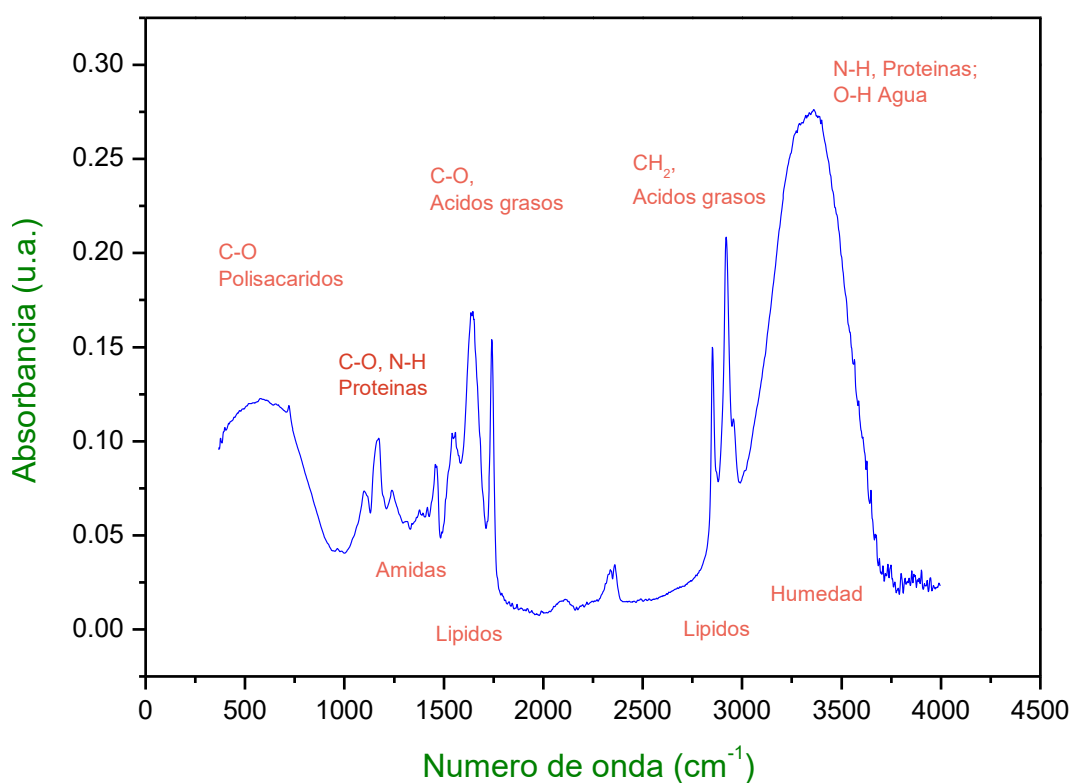


Figura 2.2 Espectro de Infrarrojo característico para queso Adobera y principales contribuciones por grupo funcional

Los datos de los espectros fueron depurados, mediante la eliminación de regiones poco informativas por lo que se usaron solo las regiones comprendidas entre 931-1768 y 2839-3700 cm⁻¹. Se utilizó el análisis por componentes principales para evaluar diferencias composicionales entre las diferentes muestras al día de su elaboración y 21 días después

(Figura 2.3). A través del gráfico de componentes principales se observó que la composición del queso cambia durante el periodo de vida de anaquel.

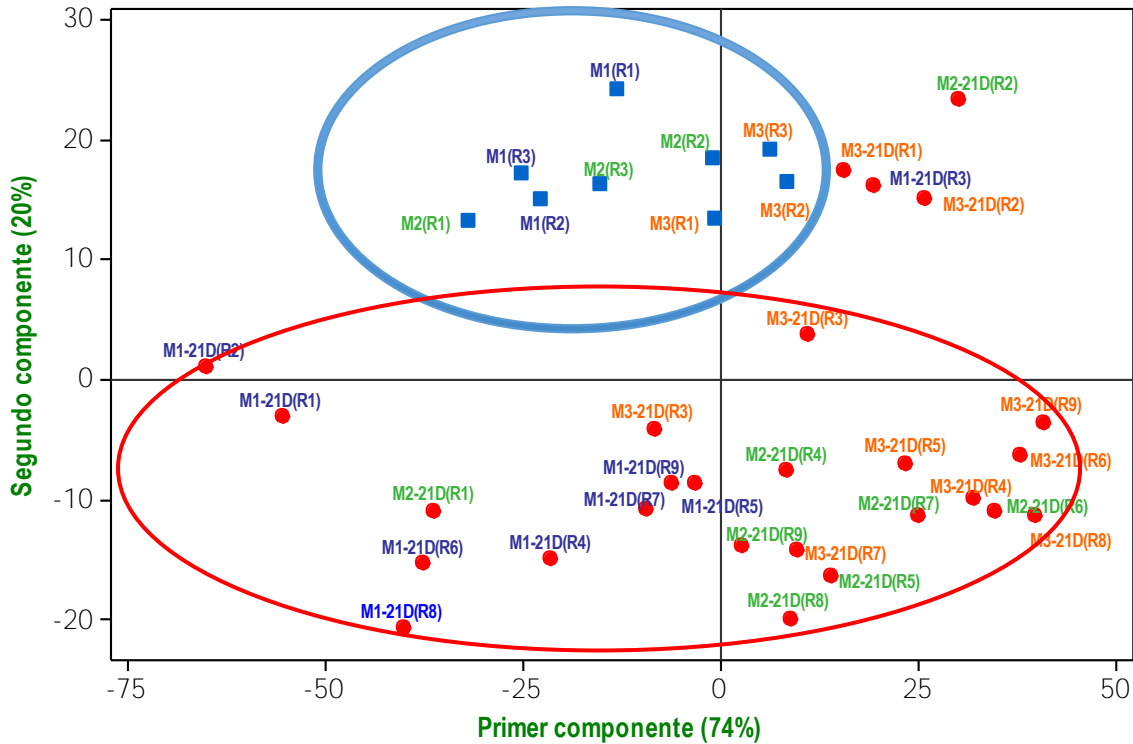


Figura 2.3 Análisis de componentes principales de espectros FTIR de muestras de queso adobera artesanal al día de su elaboración y 21 días de vida de anaquel

Las muestras al día cero (día de elaboración) de las diferentes marcas de queso adobera incluidas tuvieron tendencia de agrupación diferente a las muestras después de 21 días de su elaboración y conservadas a 4 °C, lo que podría indicar cambios en su composición fisicoquímica, asociado a las actividades enzimáticas residuales de su microbiota, primordialmente. La información obtenida mediante FTIR servirá para predecir atributos composicionales de las muestras de queso; así como su perfil de textura, mediante el uso de los modelos matemáticos generados. La información resultante podrá correlacionarse con modificaciones de la microbiota del queso, tal como se observó en el ensayo de secuenciación masiva, donde se hace evidente que la vida de anaquel (al menos a 21 días de almacenamiento en refrigeración) induce modificaciones en la estructura de la microbiota del queso, con aumento de bacterias del grupo de ácido-

lácticas primordialmente, que, a través de su metabolismo (principalmente secundario), podrían inducir cambios en la matriz del queso (Blaya et al. 2018)

Generación y validación de modelos de predicción para evaluar perfil de textura en queso Adobera artesanal.

A partir de una colección de espectros de FTIR de muestras de queso Adobera y los perfiles de textura instrumental (TPA) generados en un estudio previo (información no incluida), se hizo el análisis por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para generar y validar modelos de predicción para determinar los atributos de textura y composición del queso.

El uso de una banda de absorción de un espectro de orden cero (datos crudos) permite la identificación solamente a través de la posición del máximo de absorción como único punto de referencia (que en bandas anchas es una aproximación), este número de puntos de referencia de la banda aumenta a tres en un espectro de primera derivada (máximo, mínimo y corte con abscisas) o a cinco en un espectro de segunda derivada. Es decir, la primera derivada se utiliza generalmente para determinar el máximo de absorción (especialmente en bandas anchas), mientras que la segunda derivada del espectro presenta dos máximos correspondientes a los puntos de inflexión del espectro de primera derivada, mientras que el máximo de absorción del espectro de orden cero aparece ahora como un mínimo (López-de Alba y López Martínez 1993). Por esta razón, los espectros fueron transformados con la función de primera y segunda derivada, para tener evidencia de la mejor forma de utilizar los datos bajo la premisa de generar modelos de predicción confiables y precisos.

Los espectros FTIR (crudos y transformados) se incluyeron en el análisis PLS para determinar la factibilidad para la predicción de atributos sensoriales y conocer la forma en que se pueden aprovechar de mejor manera los datos. El potencial del modelo para predecir atributos de textura fue evaluado utilizando la capacidad para explicar la varianza de x (variable de respuesta), el coeficiente de determinación (r^2) y el número de predictores que utilizaría el modelo para llevar a cabo la predicción (Tabla 2.1).

Los resultados indican que mediante el uso de los datos crudos de los espectros (sin aplicar ningún tratamiento matemático) se logra una mayor explicación de la varianza de cada uno de los atributos de textura, además de que exhibe valores del coeficiente de determinación elevados, lo que nos indica que podrían generarse modelos de predicción confiables y robustos; aunque el número de predictores que requiere es muy elevado para la mayoría de los casos.

Tabla 2.1 Análisis PLS para perfil de Textura y FTIR de queso adobera comercial

Atributo	Rango Espectral (cm-1)	Datos Crudos			Primera Derivada			Segunda Derivada		
		R2	Varianza de X	# Componentes	R2	Varianza de X	# componentes	R2	Varianza de X	# componentes
Dureza	931-1768 y 2839-3700	0.789	0.998	18	0.790	0.714	8	0.705	0.517	5
Cohesividad	931-1768 y 2839-3700	0.907	0.998	20	0.830	0.838	16	0.816	0.552	6
Elasticidad	931-1768 y 2839-3700	0.897	0.997	13	0.913	0.734	9	0.915	0.552	6
Masticabilidad	931-1768 y 2839-3700	0.844	0.997	15	0.857	0.702	7	0.844	0.605	8
Gomosidad	931-1768 y 2839-3700	0.804	0.998	20	0.834	0.703	7	0.812	0.545	6
Resistencia	931-1768 y 2839-3700	0.700	0.998	20	0.866	0.757	10	0.882	0.689	13

Por su parte, mediante el uso de modelos predictivos basados en el uso de los datos espectrales tratados con la función de primera derivada se lograría menor explicación de la varianza de cada uno de los atributos de textura, en comparación a utilizar los datos crudos, aun cuando la certeza en la predicción parece ser mejor de acuerdo a los valores del coeficiente de determinación y requiere de un número menor de predictores para el modelo.

Finalmente utilizando los datos obtenidos mediante la función de segunda derivada de los espectros los valores del coeficiente de determinación son buenos, semejantes a los obtenidos mediante el uso de primera derivada, y el número de predictores o componentes requeridos es menor en comparación a los dos casos anteriores, pero el nivel de explicación de la varianza de cada una de las variables de respuesta es más bajo. Por estas razones se decidió que la opción más apropiada es el uso del espectro



crudo (sin aplicar ninguna función matemática), puesto que garantiza que el modelo ofrecerá una mayor explicación de la variación de cada uno de los atributos del queso, es decir, los resultados serían más certeros; aun cuando el coeficiente de determinación sea un poco inferior a si se utilizaran los datos transformados.

Con el análisis de PLS también se obtuvieron las gráficas de respuesta para evaluar la precisión en la predicción que ofrecen los modelos. Se trata de una gráfica de dispersión de las respuestas del modelo ajustadas y con validación cruzada contra las respuestas reales, que sirve para demostrar que tan bien se ajusta y predice el modelo (Minitab 2019).

Las gráficas de respuesta de la predicción con el uso de los datos espectrales crudos de los atributos evaluados se ajustan a un patrón lineal, lo que indica que los modelos se ajustan a los datos adecuadamente y predicen la respuesta con exactitud (Fig. 2.4)

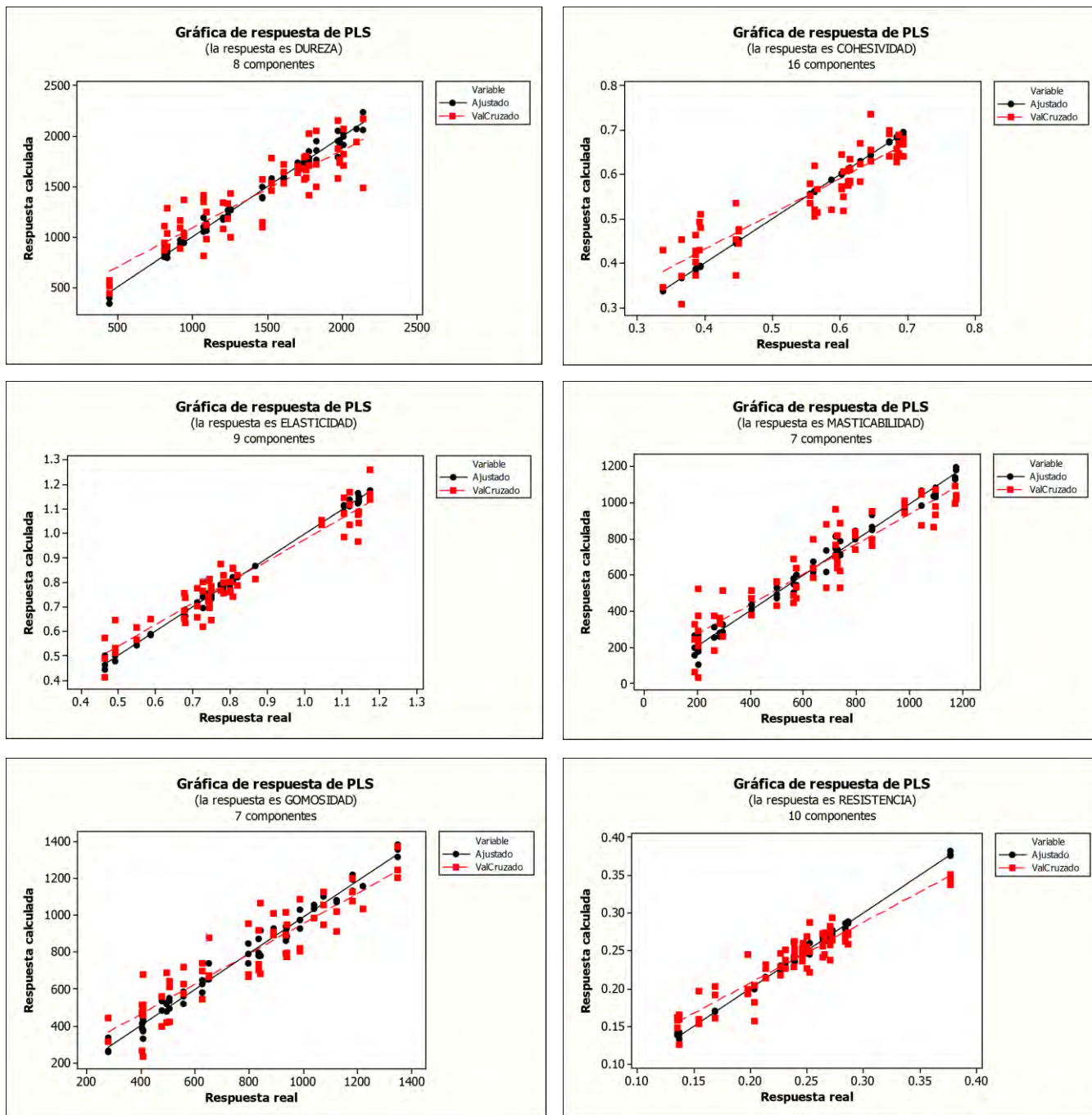


Figura 2.4 Gráficas de respuesta de PLS para la predicción de atributos de textura en queso adobera mediante el uso de datos espectrales crudos.

Mediante el gráfico de cargas (que compara la influencia relativa de los predictores en la respuesta) y el gráfico de coeficientes estándar (muestra la dispersión proyectada de los coeficientes de regresión estandarizados, es decir, ve el signo y la magnitud de la relación entre los predictores y las respuestas) de PLS para los atributos de textura de las diferentes muestras de queso, se obtuvo información acerca de las regiones espectrales y bandas de absorción que mayor contribución tienen para explicar las variaciones de cada uno de los atributos. Se observó que la región entre 3000 y 3800 cm^{-1} (directamente relacionada con el contenido de humedad en el queso), que se asocia a las vibraciones de estiramiento del O-H así como a la aparición de un pequeño sobretono del carbonilo y estiramiento simétrico y asimétrico de la amina primaria, fueron las regiones de mayor importancia para predecir la mayor parte de los atributos, con excepción de gomosidad.

Por su parte, las señales presentes alrededor de 1730 , 2850 y 2940 cm^{-1} , asociadas con las vibraciones de C-H y C-O de lípidos, fueron importantes para predecir atributos de resistencia, masticabilidad, gomosidad y elasticidad principalmente.

Finalmente, las señales encontradas en 1640 y 1540 cm^{-1} aproximadamente, que se asocian a las amidas primaria y secundaria, fueron de importancia para la predicción de la cohesividad y la elasticidad en las muestras. Estas últimas están relacionadas con el contenido de proteína en queso, así como el estado de desnaturalización de las mismas (Ruvalcaba et al. 2015). Algunas otras señales complementarias fueron encontradas de importancia para la predicción de los atributos de textura como son señales en 1072 , 1000 , 987 y 956 cm^{-1} (Tabla 2.2). La región comprendida entre 1000 y 1200 cm^{-1} y las señales entre 1300 y 1400 cm^{-1} , que se asocian con las vibraciones de los grupos funcionales C-H y C-O de carbohidratos, también mostraron importancia para la predicción de masticabilidad, gomosidad y resistencia.

Tabla 2.2 Principales regiones espectrales de importancia para la predicción de atributos de textura en queso adobera

Atributo	Mayor contribución (número de onda cm^{-1})	Grupos funcionales
Dureza	3843(-), 3649, 3666(-), 3616, 3577(-), 3518	NH; OH- Contenido de Humedad en la muestra
	2983(-)	CH_2
	2879	CH_3 - Metilo
	1334	$-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$
	1072, 987	C-C; C-N; C-O (señales complementarias)
	Cohesividad	3666, 3649(-), 3631, 3616(-), 3599
3059		CH
1620(-)		NH_2 - Amida primaria, Flexión -OH
1473		-NH; CH_3 ; CH_2
1384(-)		CH_3
1001, 987		C-C; C-N; C-O (señales complementarias)
Elasticidad	3701, 3649(-), 3629	NH; OH- Contenido de Humedad en la muestra
	2993(-), 2841	CH_2
	2972(-), 1386(-)	CH_3
	1772(-)	COO- Estiramiento simétrico de los carbonilos
	1562	NH- Amida secundaria
Masticabilidad	3656, 3635, 3608(-), 3614, 3572(-)	NH; OH- Contenido de Humedad en la muestra
	2987(-)	CH_2
	2879	CH_3 (Lípidos)
	1732, 1718	COO- Lípidos. Estiramiento del carbonilo
	1386(-)	CH_3 - Vibraciones de CH
	1348	CH
Gomosidad	3608(-)	OH- Contenido de Humedad en la muestra
	2970, 2962(-), 2877, 2839(-)	CH_3 (Lípidos)
	2943	CH_2
	1718(-)	COO- Lípidos. Estiramiento del carbonilo
	1386(-)	CH_3 - Vibraciones de CH
	1346	CH
Resistencia	1070	C-C; C-N; C-O (señales complementarias)
	3691, 3651, 3626(-), 3597(-), 3564(-), 3514(-), 3509(-), 3481	NH; OH- Contenido de Humedad en la muestra
	2979, 2964, 2875(-)	CH_3 (Lípidos)
	1440, 1390	COO- Torsión estiramiento del carboxilo
	956	COO- Torsión fuera del plano del dímero del carboxilo

Mediante la información obtenida de los gráficos de coeficientes estándar para cada uno de los parámetros de textura, se seleccionaron los números de onda (componentes) de los espectros crudos que mayor contribución tienen para cada uno de los modelos y, mediante análisis por regresión lineal, se generaron los modelos para predicción del perfil de textura del queso.

Los modelos generados para cada uno de los componentes se utilizaron para predecir el perfil de textura de las muestras de queso obtenidas durante las dos temporadas de muestreo (Tabla 2.3).

Tabla 2.3 Perfil de Textura de muestras de queso adobera artesanal de los Altos de Jalisco en dos temporadas del año

QUESERA	TEMPORADA	DUREZA	COHESIVIDAD	ELASTICIDAD	MASTICABILIDAD	RESILIENCIA
1	Secas	0.93 ^{a,A} (±0.16)	0.63 ^{a,B} (±0.02)	0.75 ^{b,A} (±0.01)	0.80 ^{a,B} (±0.04)	0.24 ^{b,A} (±0.01)
1	Lluvias	0.93 ^{b,A} (±0.15)	0.65 ^{a,A} (±0.01)	0.76 ^{a,A} (±0.01)	0.87 ^{a,A} (±0.06)	0.25 ^{a,A} (±0.01)
2	Secas	0.78 ^{a,B} (±0.21)	0.65 ^{a,A} (±0.03)	0.76 ^{ab,A} (±0.01)	0.79 ^{a,A} (±0.04)	0.26 ^{a,A} ^a (±0.01)
2	Lluvias	0.99 ^{b,A} (±0.74)	0.63 ^{a,A} (±0.02)	0.76 ^{a,A} (±0.01)	0.81 ^{a,A} (±0.06)	0.25 ^{a,A} (±0.004)
3	Secas	0.77 ^{a,B} (±0.17)	0.65 ^{a,A} (±0.04)	0.77 ^{a,A} (±0.02)	0.79 ^{a,A} (±0.08)	0.26 ^{a,A} (±0.01)
3	Lluvias	1.54 ^{a,A} (±0.56)	0.60 ^{a,A} (±0.07)	0.76 ^{a,A} (±0.02)	0.84 ^{a,A} (±0.08)	0.25 ^{a,A} (±0.01)
Promedio temporada secas		0.82 ^B (±0.19)	0.64 ^A (±0.03)	0.76 ^A (±0.01)	0.80 ^B (±0.05)	0.26 ^A (±0.01)
Promedio temporada lluvias		1.15 ^A (±0.42)	0.63 ^A (±0.04)	0.76 ^A (±0.01)	0.84 ^A (±0.07)	0.25 ^B (±0.01)

^{a,b,c} Muestras de diferente marca en la misma temporada que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

^{A,B} Muestras de la misma marca y diferente temporada que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Generación y validación de modelos de predicción para evaluar la composición fisicoquímica de queso Adobera artesanal

A partir de una colección de datos sobre composición fisicoquímica obtenida mediante técnicas convencionales que incluyó la determinación de grasa, proteína, pH, humedad (Wehr and Frank 2004) y concentración de aminoácidos libres (Wick et al. 2004)

(información no mostrada), se llevó a cabo un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales para evaluar la factibilidad de generar modelos a partir de FTIR para la predicción del perfil de composicional del queso adobera. A través de los resultados se puede inferir que existe una correlación entre los datos de composición de queso adobera y la intensidad de absorbancia en FTIR de las muestras, al menos para cuatro atributos incluidos (Grasa, Proteína, Acidez y contenido de aminoácidos libres), además de que la generación de modelos podría ser una herramienta útil para su predicción a partir de FTIR, con modelos que consideren de entre 18 y 20 componentes. Solamente el atributo de humedad registró un coeficiente de determinación relativamente bajo (0.70), no obstante, el modelo generado a partir de 20 componentes permite predecir su contenido con un buen coeficiente de determinación (0.99) (Tabla 2.4). La validación, representada a través de los gráficos de respuesta, confirmó la capacidad de los modelos de predecir de manera confiable la composición de queso Adobera (Fig. 2.5).

Tabla 2.4 Análisis PLS para perfil de composición y FTIR de queso adobera comercial

Atributo	Rango Espectral (cm-1)	Datos Crudos		
		R ²	Varianza de X	# Componentes
Grasa	931-1768 y 2839-3700	0.91	0.99	20
Proteína	931-1768 y 2839-3700	0.99	0.99	18
pH	931-1768 y 2839-3700	0.99	0.91	20
FAA	931-1768 y 2839-3700	0.96	0.99	20
Humedad	931-1768 y 2839-3700	0.99	0.70	20

A través del uso de los gráficos de carga se identificaron y seleccionaron las regiones espectrales y números de onda para incluir en cada uno de los modelos de predicción, los cuales se generaron mediante análisis de regresión lineal para cada uno de los componentes. Las regiones que mayor información proveen para la predicción de la composición del queso fueron las mismas identificadas para la generación de los modelos predictivos de textura (Tabla 2.2).

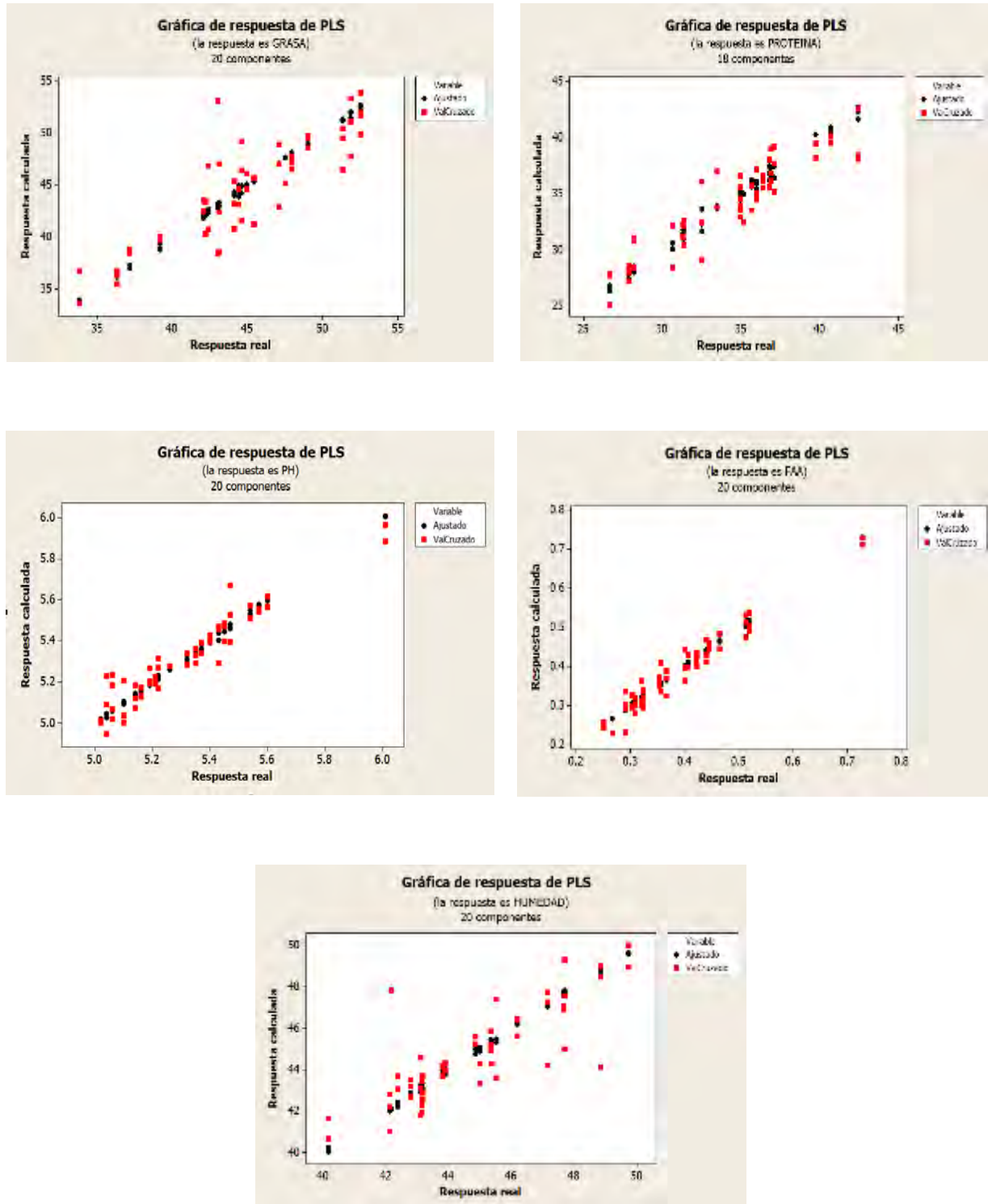


Figura 2.5 Gráficas de respuesta de PLS para la predicción de la composición de queso Adobera mediante el uso de datos espectrales crudos

A través del gráfico de coeficientes estándar, se seleccionaron los números de onda (componentes) para la generación de los modelos de predicción. Una vez obtenidos los componentes para los modelos de predicción y a través de análisis de regresión lineal, se generaron los modelos para estimar la composición fisicoquímica de queso Adobera artesanal. Los modelos se utilizaron para la evaluación de muestras de queso Adobera artesanal a partir de sus espectros de FTIR. Las muestras fueron obtenidas a partir de tres queseras en dos temporadas del año (Tabla 2.5).

Tabla 2.5 Composición fisicoquímica de muestras de queso adobera artesanal de los altos de Jalisco estimada a partir de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

QUESERA	TEMPORADA	pH	GRASA (%)	PROTEINA (%)	FAA (mmol/g)	HUMEDAD
1	Secas	5.20 ^{a,A} (±0.03)	47.47 ^{a,A} (±0.79)	34.02 ^{a,A} (±0.07)	0.47 ^{a,A} (±0.02)	43.63 ^{b,A} (±0.53)
	Lluvias	5.14 ^{b,B} (±0.02)	47.57 ^{a,A} (±0.91)	30.60 ^{a,B} (±0.09)	0.46 ^{a,A} (±0.03)	43.57 ^{c,A} (±0.40)
2	Secas	5.16 ^{ab,A} (±0.05)	47.83 ^{a,A} (±0.85)	33.96 ^{a,A} (±0.12)	0.49 ^{a,A} (±0.03)	44.19 ^{a,A} (±0.27)
	Lluvias	5.15 ^{ab,A} (±0.02)	46.96 ^{a,B} (±0.28)	30.59 ^{a,B} (±0.08)	0.45 ^{a,B} (±0.02)	44.10 ^{b,A} (±0.27)
3	Secas	5.14 ^{b,B} (±0.04)	47.93 ^{a,A} (±0.95)	33.92 ^{a,A} (±0.10)	0.49 ^{a,A} (±0.03)	44.56 ^{a,B} (±0.13)
	Lluvias	5.24 ^{a,A} (±0.11)	44.89 ^{b,B} (±1.97)	30.90 ^{a,B} (±0.37)	0.40 ^{a,B} (±0.06)	44.73 ^{a,A} (±0.19)
Promedio temporada secas		5.17 ^A (±0.04)	47.74 ^A (±0.86)	33.97 ^A (±0.10)	0.48 ^A (±0.03)	44.12 ^A (±0.51)
Promedio temporada lluvias		5.18 ^A (±0.08)	46.47 ^B (±1.68)	30.70 ^B (±0.26)	0.43 ^B (±0.05)	44.13 ^A (±0.57)

^{a,b,c} Muestras de diferente marca en la misma temporada que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

^{A,B} Muestras de la misma marca y diferente temporada que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se observaron para el contenido de grasa, proteína y humedad entre las muestras de queso obtenidas en temporada de secas y las obtenidas durante la temporada de lluvias. Por el contrario, no se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre temporadas para los valores de pH del queso y la concentración de aminoácidos libres (FAA).

Finalmente, con el objetivo de establecer asociaciones entre la composición del queso y los diferentes atributos de textura, se llevó a cabo el análisis de correlación, mediante el cual se logró establecer que la composición del queso adobera tiene impacto directo sobre el perfil de textura del mismo (Fig. 2.6). Asimismo, se observó que los principales géneros bacterianos que conforman su microbiota también se correlacionan con el desarrollo de las características propias del queso, como es la disminución del pH, el cual es un factor determinante para el desarrollo del perfil de textura del queso.

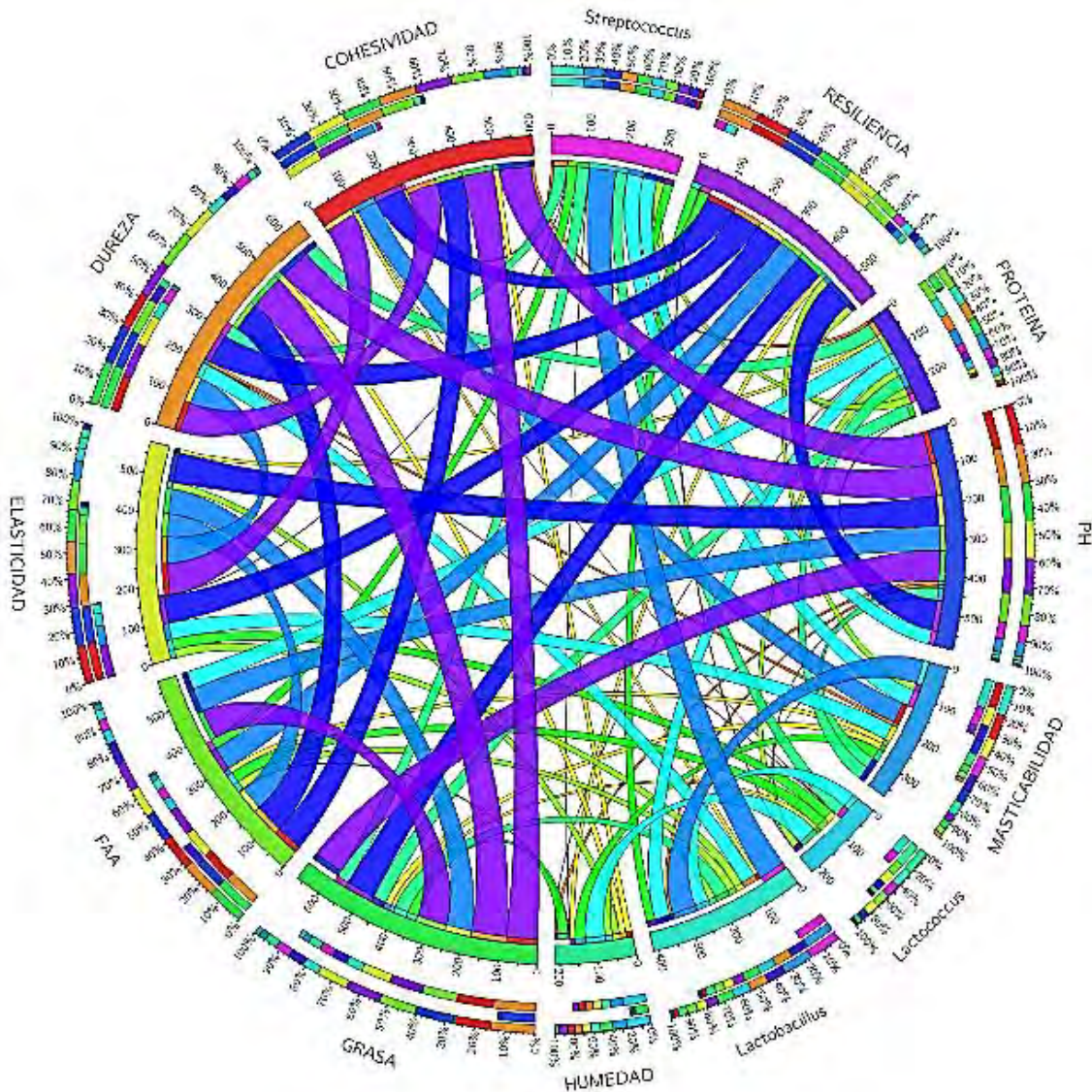


Figura 2.6 Representación esquemática de las correlaciones de Pearson ($p < 0.05$) entre la composición del queso Adobera artesanal, sus atributos de textura y los principales géneros bacterianos de su microbiota.

Conclusiones

El uso de la información generada a partir de los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier en el modo de reflectancia total atenuada (ATR), permitió determinar de forma precisa la composición y el perfil de textura del queso Adobera artesanal, a través del uso de modelos de predicción obtenidos mediante análisis de regresión de cuadrados mínimos parciales y regresión lineal. Los modelos obtenidos mostraron coeficientes de determinación elevados ($r^2 > 0.80$). Los resultados obtenidos favorecen a la generación y validación de una técnica de análisis rápida, precisa y no destructiva para evaluar la calidad de queso Adobera. Por su parte, el perfil de textura del queso fue similar en ambas temporadas del año (secas y lluvias) con ligeras variaciones sobre todo en la dureza del queso. Mayores diferencias ($p < 0.05$) se observaron para el perfil de composición del queso, con mayor concentración de grasa, proteína y aminoácidos libres en los quesos obtenidos durante la temporada de secas. Se observó además que tanto la abundancia de los principales géneros bacterianos del queso (*Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*) como la composición fisicoquímica del queso, tienen correlación con el desarrollo del perfil del queso.

Referencias

- Abbas K., Karoui R. y Aït-Kaddour A. (2012) Application of synchronous fluorescence spectroscopy for the determination of some chemical parameters in PDO French blue cheeses. *Europ Food Res Technol* 234(3):457–465. DOI: [10.1007/s00217-011-1652-0](https://doi.org/10.1007/s00217-011-1652-0).
- Agricultura. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019) Boletín de Leche. Enero-Marzo 2019. Sistema de información agroalimentaria y Pesquera.
- Barreto A., Cruz-Tirado J. P., Siche R. y Quevedo R. (2018) Determination of starch content in adulterated fresh cheese using hyperspectral imaging. *Food Bioscience* 21:14–19. DOI: [10.1016/j.fbio.2017.10.009](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.009).
- Blaya J., Barzideh Z. y LaPointe G. (2018) Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *J Dairy Sci* 101(4):3611-3629. DOI: [10.3168/jds.2017-13345](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345).
- Cervantes E. F., Villegas de Gante A. y Cesín V. A. (2008) Los quesos mexicanos genuinos/ Genuine Mexican Cheeses: Patrimonio cultural que debe rescatarse. Mundi Prensa, Mexico.
- Currò S., Manuelian C. L., Penasa M., Cassandro M. y De Marchi M. (2017) Feasibility of near infrared transmittance spectroscopy to predict cheese ripeness. *J Dairy Sci* 100(11):8759–8763. DOI: [10.3168/jds.2017-13001](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13001).
- Downey G., Sheehan E., Delahunty C., O'Callaghan D., Guinee T. y Howard V. (2005) Prediction of maturity and sensory attributes of Cheddar cheese using nearinfrared spectroscopy. *Int Dairy J* 15(6–9):701–709. DOI: [10.1016/j.idairyj.2004.06.013](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.06.013).
- Everard C. D., O'callaghan D. J., Fagan C. C., O'donnell C. P., Castillo M. y Payne F. A. (2007) Computer vision and color measurement techniques for inline monitoring of cheese curd syneresis. *J Dairy Sci* 90(7):3162–3170. DOI: [10.3168/jds.2006-872](https://doi.org/10.3168/jds.2006-872).
- Ferragina A., Cipolat-Gotet C., Cecchinato A. y Bittante G. (2013) The use of Fouriertransform infrared spectroscopy to predict cheese yield and nutrient recovery or whey loss traits from unprocessed bovine milk samples. *J Dairy Sci* 96(12), 7980–7990. DOI: [10.3168/jds.2013-7036](https://doi.org/10.3168/jds.2013-7036).
- Gori A., Maggio R. M., Cerretani L., Nocetti M. y Caboni M. F. (2012) Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. *Int Dairy J* 23(2):115–120. DOI: [10.1016/j.idairyj.2011.11.005](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.005).
- Lei T. y Sun D. W. (2019) Developments of nondestructive techniques for evaluating quality attributes of cheeses: A review. *Trends Food Sci Tech* 88:527-542. DOI: [10.1016/j.tifs.2019.04.013](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.013).

- López-de Alba P. L. y López-Martínez L. (1993) Una introducción a la espectrometría de derivadas. *Educación Química* 4:160. DOI: 10.22201/fq.18708404e.1993.3.66813.
- Loudiyi M., Rutledge D. N. y Aït-Kaddour A. (2018) ComDim for explorative multiblock data analysis of Cantal-type cheeses: Effects of salts, gentle heating and ripening. *Food Chem* 264:401–410. DOI:[10.1016/j.foodchem.2018.05.039](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.039).
- Margolies B. J. y Barbano D. M. (2018) Determination of fat, protein, moisture, and salt content of Cheddar cheese using mid-infrared transmittance spectroscopy. *J Dairy Sci* 101(2):924-933. DOI:[10.3168/jds.2017-13431](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13431).
- Minitab (2019) Regresión de mínimos cuadrados parciales. En: soporte de Minitab®. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/19/help-and-how-to/modeling-statistics/regression/supporting-topics/partial-least-squares-regression/pls-regression-graphs/>. Consultado el 21 de noviembre de 2019.
- Rodríguez-Saona L. E., Koca N., Harper W. J. y Alvarez V. B. (2006) Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *J Dairy Sci* 89(5):1407-12. DOI:[10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72209-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72209-3).
- Ruvalcaba-Gómez J. M. (2015) Determinación del Efecto de la Formación de Agregados de β -Lactoglobulina sobre las Características Físico-químicas del Queso Adobera. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Tlaxcala, México.
- Subramanian A., Harper W. J. y Rodríguez-Saona L. E. (2009) Rapid prediction of composition and flavor quality of cheddar cheese using ATR-FTIR spectroscopy. *J Food Sci* 74(3):C292-7. DOI:[10.1111/j.1750-3841.2009.01111.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01111.x).
- Subramanian A., Prabhakar V. y Rodríguez-Saona L. (2016) Analytical Methods: Infrared Spectroscopy in Dairy Analysis. Reference Module in Food Science. DOI:10.1016/b978-0-08-100596-5.00602-8.
- Vásquez N., Magán C., Oblitas J., Chuquizuta T., Avila-George H. y Castro, W. (2018) Comparison between artificial neural network and partial least squares regression models for hardness modeling during the ripening process of Swiss-type cheese using spectral profiles. *J Food Eng* 219:8–15. DOI:[0.1016/j.jfoodeng.2017.09.008](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.008).
- Wu D. y Sun D.W. (2013) Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review—Part I: Fundamentals. *Innov Food Sci Emerg Technol* 19:1–14. DOI:[10.1016/j.ifset.2013.04.014](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.014).

CAPITULO III.

PERFIL DE INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO

Evaluación del perfil de inocuidad microbiológica de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco

Arteaga-Garibay Ramón Ignacio², Ruvalcaba-Gómez José Martín¹, Delgado-Macuil Raúl Jacobo¹

¹ Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac – Tepetitla, km. 1.5. Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Blvd. de la Biodiversidad #400. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600.

Autor de correspondencia: José Martín Ruvalcaba-Gómez. E-mail: ruvalcaba.josemartin@inifap.gob.mx

Resumen

Los quesos elaborados a partir de leche cruda pueden representar un reservorio de microorganismos potencialmente patógenos. Esta sección tiene como objetivo describir el perfil de inocuidad microbiológica del queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco, basado en el uso de técnicas dependientes de cultivo y su apego a la normatividad aplicable vigente. Los resultados mostraron una elevada concentración de organismos coliformes totales y fecales, mesofílicos aerobios, hongos y levaduras. Mayor incidencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se presentó en los quesos de la temporada de secas, en los que hubo menor contenido de bacterias ácido-lácticas. No se encontró *Salmonella* spp. ni *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras de queso. Los resultados sugieren la necesidad de implementar estrategias para el control de la carga microbiana en queso Adobera artesanal que permita asegurar su inocuidad microbiológica y cumplir con lo señalado en la normatividad aplicable vigente.

Introducción

Uno de los temas de interés relacionado con la producción y consumo de quesos artesanales, es la inocuidad microbiológica, esto debido a los riesgos que potencialmente representa el uso de leche cruda. Estos quesos han sido definidos como quesos que durante su elaboración no son calentados más allá de 40 °C o que no son elaborados bajo un tratamiento térmico. Por ello la calidad microbiológica de la leche cruda juega un papel integral sobre la inocuidad de los quesos artesanales, dado que un gran número de microorganismos potencialmente patógenos puede estar asociado a este producto; los cuales pueden llegar a la leche por contacto directo con la ubre enferma de la vaca, o provenir de fuentes externas posterior a la ordeña (superfices animales, ambiente, condiciones durante la obtención, equipo y personal) (Te Mana y Ahitereiria 2009).

No obstante, la preferencia por el consumo de quesos con mayor riqueza e intensidad de sabores, que no se encuentra en los quesos de leche pasteurizada, ha ido en aumento; así como el conocimiento acerca de que la microbiota propia de la leche cruda (principalmente bacterias ácido-lácticas) juega un papel crucial, no solo en el desarrollo de sabores, sino en contribuir en la inhibición de microorganismos patógenos asociados a brotes por alimento (Yoon et al. 2016).

El riesgo de brotes asociados con consumo de queso no es exclusivo de los quesos artesanales ya que, en Estados Unidos, en el periodo comprendido entre 1998-2011, de los 90 brotes atribuidos a este derivado lácteo, se reporta que solo el 42% estuvo relacionado con el consumo de quesos elaborados con leche cruda, mientras otro 49% se relacionó con el consumo de quesos de leche pasteurizada; mientras que del resto (9%) no se tuvo información del origen del queso. Infecciones por *Salmonella* (10 brotes) y consumo de queso estilo mexicano sin pasteurizar fueron las causas más comunes de enfermedad asociada a queso artesanal; mientras que, para quesos de leche pasteurizada, el patógeno más común fue *Listeria* (6 brotes), queso fresco mexicano y otros quesos de origen mexicano. Un hallazgo relevante fue que del 38% de los brotes

asociados a consumo de queso artesanal fue con quesos producidos en México (Gould et al. 2014).

En ese contexto, en México se tienen identificados cerca de 40 tipos de quesos catalogados como genuinos, de los cuales, al menos 17 se elaboran de manera artesanal incluidos los quesos Adobera, Oaxaca, asadero, de poro, Cotija, entre otros; y su producción generalmente se asocia y mantiene en pequeñas cuencas o regiones especializadas en la producción de queso. Estos quesos son elaborados por micro, pequeña y medianas industrias, en muchas ocasiones ubicadas en rancherías y pequeños pueblos, a través de procesos rústicos y con deficiente control de calidad, pero desempeñan un papel fundamental en la gastronomía y economía regional y en algunos casos, nacional (Cervantes et al. 2008, Villegas de Gante et al. 2014).

Las principales problemáticas que enfrentan los quesos mexicanos genuinos, son variabilidad en calidad, incluyendo aspectos relacionados con su composición, inocuidad microbiológica y características sensoriales; altos costos de producción por falta de tecnología que eficiente los procesos, problemas de comercialización por los volúmenes de producción y falta de estrategia de mercado, y finalmente incumplimiento de normatividad vigente aplicable, sobretodo relacionada con aspectos sanitarios (Cesín et al. 2012).

Particularmente, el queso Adobera de los Altos de Jalisco, que es un queso fresco elaborado en su mayoría con leche cruda de vaca, de pH bajo y elevado contenido de humedad, pero con características fundentes; ha logrado mantenerse en el mercado, por el aumento en los volúmenes de producción y el área de distribución. Sin embargo, se ha señalado que uno de los principales problemas que enfrenta este queso es que, al elaborarse con leche cruda, sumado a la deficiente implementación de prácticas adecuadas de manufactura, podría favorecer la incidencia de microorganismos patógenos, ya que en estudios previos se ha reportado incidencia de este tipo de microorganismos en este queso (Méndez et al. 2007, Torres-Vitela et al. 2012).

Por otra parte, también se ha señalado que el pH podría ser un factor determinante para la eliminación de patógenos en queso adobera, sobre todo en quesos con valores de pH 5 o inferiores (Torres-Vitela et al. 2012). En ese sentido, es importante garantizar la inocuidad de este tipo de productos y en general de los alimentos destinados a consumo humano, a través de control del proceso de elaboración de alimentos e indicadores que favorezcan el control de patógenos, que podría redundar en el aseguramiento de la calidad microbiológica del producto.

Por ejemplo, en un extensivo estudio llevado a cabo en Estados Unidos, se evaluó la prevalencia de microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter*) en 41 muestras de quesos elaborados con leche cruda, obtenidos en puntos de venta, pequeñas empresas y granjas. El listado de muestras incluyó quesos duros, semi-duros y blandos, y madurados (al menos 60 días), con valores de pH de entre 4.9 y 7; aunque la mayoría osciló alrededor de los 5. Los resultados mostraron poca incidencia de microorganismos patógenos, solamente se detectó la presencia de organismos coliformes en cinco de las muestras y *E. coli* en dos de ellas ($<10^2$ UFC/g); mientras que *S. aureus* solo fue detectable en tres de los quesos (Brooks et al. 2012).

Por el contrario, en otro estudio realizado en Brasil para evaluar la calidad microbiológica del queso tipo Colonial del sur de Brasil, un queso ligeramente madurado con humedad alrededor del 50% (Funck et al. 2015), demostró que del total de las muestras procesadas (12) ninguna cumplió con los parámetros establecidos por la normativa de ese país (Organismos coliformes totales, coliforme termotolerantes, *E. coli*, *Staphylococcus coagulasa* positivos, conteo de células somáticas y cuenta total de bacterias), no obstante, no se obtuvieron colonias positivas para *Listeria monocytogenes* ni *Salmonella* sp. a partir de ninguna de las muestras de queso (de Medeiros et al. 2019).

El objetivo del presente capítulo es describir la inocuidad microbiológica de muestras de queso adobera elaborado artesanalmente, así como de aislar y conservar bacterias ácido-lácticas (BAL) propias de este queso.

Estrategia metodológica

Toma de muestras

Se seleccionaron y visitaron tres fábricas elaboradoras de queso Adobera ubicadas en la Región Altos Sur de Jalisco (M1, M2 y M3). Los criterios para la inclusión de las plantas queseras fue que mantuvieran un proceso de elaboración artesanal (Villegas et al. 2014), sin uso de pasteurización de leche ni aditivos en el producto; además de la accesibilidad y disponibilidad de cooperación de los responsables. El levantamiento de muestras se llevo a cabo por duplicado, en dos fechas diferentes para cada temporada del año considerada (secas y lluvias). Las muestras se conservaron en refrigeración (4-7 °C) durante su transporte al laboratorio de recursos genéticos microbianos y hasta su procesamiento (no más de 48 h posteriores a la toma).

Análisis microbiológico de queso Adobera

Las muestras se prepararon y diluyeron de acuerdo a lo sugerido por la NOM-110-SSA1-1994. La evaluación microbiológica se llevó a cabo de acuerdo a lo señalado en la NOM-243-SSA1-2010 e incluyó la determinación de bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Organismos Coliformes Totales y Fecales (OCT y OCF) y Hongos y Levaduras (H y L). Las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron como UFC/g o NMP/g en función del principio de cada una de las técnicas. Adicionalmente se llevó a cabo la búsqueda de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* y el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL).

Análisis estadístico

Los resultados del conteo de BMA, OCT, OCF, HyL, BAL y *Staphylococcus aureus* se analizaron mediante el procedimiento GLM (modelo lineal general) del paquete estadístico SAS® seguido de análisis normal de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey ($p < 0.05$) para evaluar diferencias asociadas a la temporada del año en que fueron tomada las muestras.

Resultados y discusión

Indicadores microbiológicos en queso Adobera

Los resultados del análisis microbiológico de las muestras de queso adobera, de las temporadas de secas y lluvias, se incluyen en la [Figura 3.1](#). Los resultados indican concentraciones elevadas de microorganismos para todas las muestras de queso adobera en ambas temporadas del año. Diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se registraron para el contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras (HyL) y bacterias ácido-lácticas (BAL), con valores superiores en las muestras de queso Adobera obtenidas en temporada de lluvias. El contenido de organismos coliformes totales y fecales (OCT y OCF) en ambas temporadas revasó el límite de detección de la técnica empleada (> 1100 NMP/g).

Por otra parte, mayor número de muestras positivas para *Staphylococcus aureus* se observaron en temporada de secas (50%) en relación a la temporada de lluvias (35%), aunque el contenido de este microorganismo en las muestras fue similar entre muestras positivas de ambas temporadas ($6 \log_{10}$ UFC/g). Un comportamiento similar se observó para *Escherichia coli* con un 66% de muestras positivas en la temporada de secas; superior al 33% de muestras positivas para este patógeno en temporada de lluvias. Es importante resaltar que no fue posible el aislamiento de colonias positivas para *Salmonella* sp. ni para *Listeria monocytogenes* a partir de ninguna de las muestras de ambas temporadas del año.

Respecto al contenido de BAL en queso Adobera, el contenido de este grupo de microorganismos fue mayor en las muestras obtenidas en temporada de lluvias en relación a la temporada de secas ($p < 0.05$).

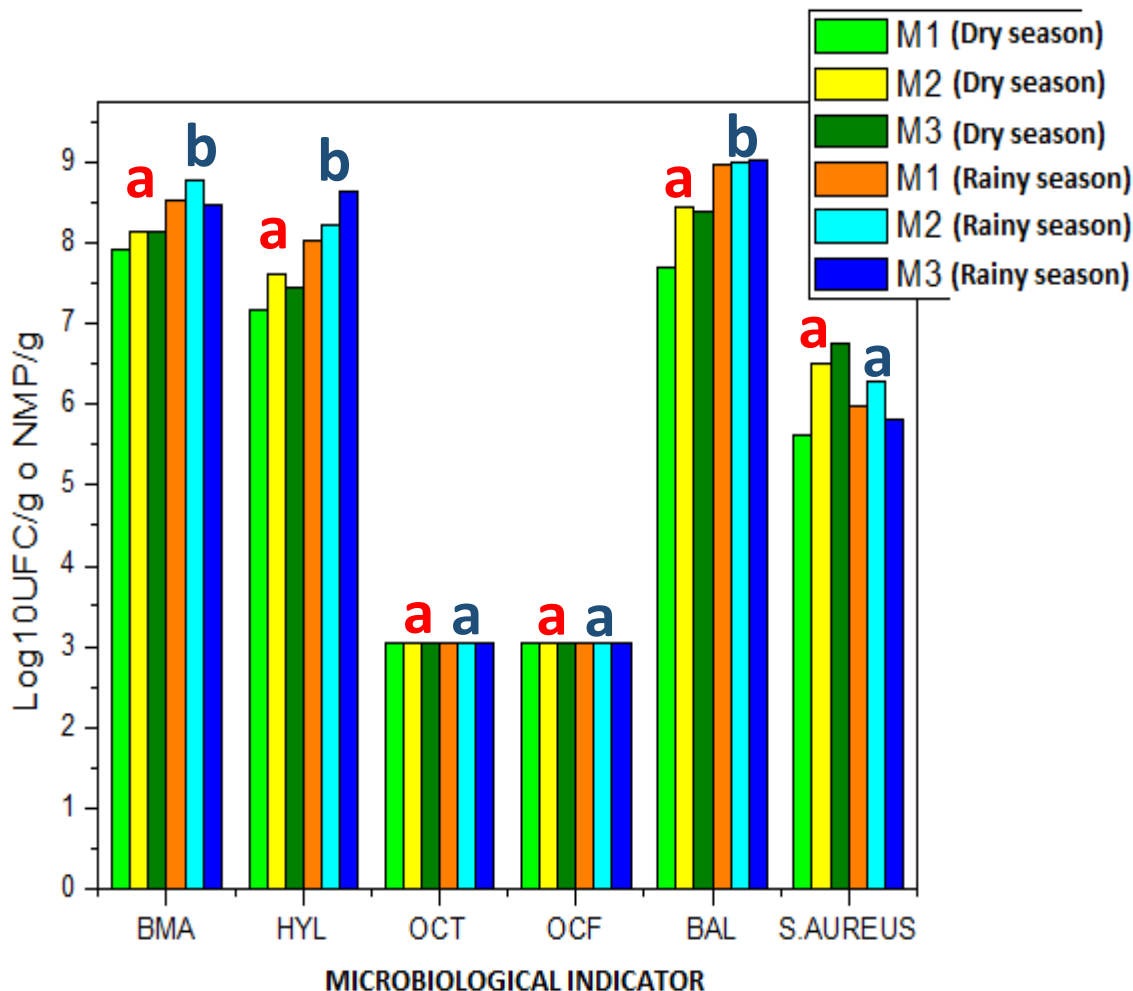


Figura 3.1 Perfil de inocuidad microbiológica de queso Adobera elaborado artesanalmente en diferentes queserías (M1, M2, M3) y dos temporadas del año (Dry season: temporada de secas; Rainy season: temporada de lluvias). *BMA*: bacterias mesófilas aerobias, *HyL*: Hongos y levaduras, *OCT*: Organismos coliformes totales, *OCF*: Organismos coliformes fecales, *BAL*: bacterias ácido lácticas.

En un estudio similar, Torres-Vitela et al (2012) reportan que, de un total de 100 muestras de queso Adobera evaluadas por métodos dependientes de cultivo, el 36% fue positiva para al menos uno de 4 microorganismos patógenos (*Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, toxina de *Staphylococcus*). Mencionan, además, en las muestras positivas, una incidencia de 20% para *Salmonella*, 4% para *E. coli* O157:H7 y 12% para *Listeria monocytogenes*. Adicionalmente los autores reportan que no se encontraron muestras positivas para toxina estafilocócica. Los autores finalmente

señalan que existe un posible efecto protector por pH en el queso, debido a que hubo menor incidencia de patógenos en quesos con niveles de pH debajo de 5.0, sin embargo, también señalan que es necesario confirmar esa hipótesis a través de estudios adicionales. Particularmente, mediante un estudio de correlación de variables, hemos observado que el pH es un factor determinante para definir las características del queso, a su vez el pH está condicionado a la cantidad de bacterias ácido-lácticas presentes en la muestra (Ruvalcaba et al. 2016), por lo que podría estar relacionado con la baja incidencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* observada en las muestras obtenidas en temporada de lluvias, en las que la abundancia de bacterias ácido-lácticas fue mayor.

Un estudio reciente orientado al aislamiento e identificación de Enterobacterias a partir de queso Adobera de diferentes regiones demostró que a partir de todos los quesos (incluidos quesos tipo adobera elaborados con leche pasteurizada) hubo la presencia de Enterobacterias, y la identificación bioquímica de estas mostró identidad presuntiva al género *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Proteus* principalmente (Martín et al. 2018), por lo que los autores sugieren la necesidad de incluir alguna estrategia durante la elaboración de queso adobera que garantice la eliminación de este tipo de microorganismos potencialmente patógenos.

Los resultados observados en el presente estudio demuestran que es necesario vigilar y mejorar las condiciones de producción del queso Adobera artesanal, con el objetivo de que pueda cumplir con los requisitos normativos aplicables vigentes para este producto, ya que, al menos los resultados de los indicadores de organismos coliformes totales y fecales, hongos y levaduras, *S. aureus* y *Escherichia coli* lo ubican fuera de los límites permisibles.

Aislamiento de bacterias ácido-lácticas

A partir de las placas de gelosa MRS con crecimiento de BAL de las muestras de queso Adobera de ambas temporadas del año, se seleccionaron de dos a tres colonias de cada morfología colonial identificada para obtener un total de 180 aislados bacterianos (Fig.

3.2), de los cuales se llevó a cabo su resiembra en medio MRS y conservación a -80 °C en el mismo medio adicionado con glicerol al 20%. Los aislados se recuperaron en medio selectivo y la biomasa se utilizó para los procedimientos de fenotipificación y genotipificación en fases experimentales posteriores.

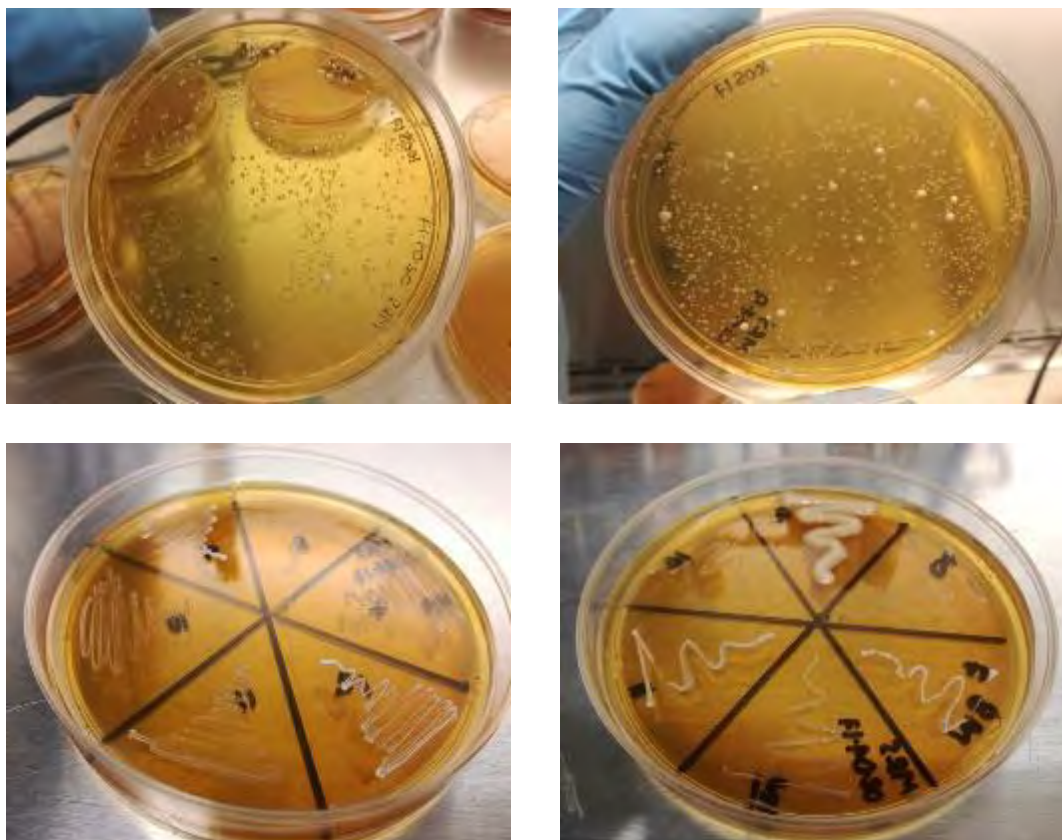


Figura 3.2. Aislamiento y selección de BAL de queso adobera artesanal por discriminación de morfología colonial

Conclusiones

El contenido de bacterias en queso Adobera artesanal es elevado, sobre todo en las muestras de queso producido en temporada de secas, asociado principalmente a su origen artesanal; esto incluye una alta incidencia de *Staphylococcus aureus*. No obstante, para este microorganismo en particular, es necesario confirmar la presencia o ausencia de la toxina que produce, en atención a descartar posibles riesgos sanitarios. Los resultados ubican al queso adobera artesanal por encima de los límites permisibles para algunos de los indicadores microbiológicos de acuerdo a lo establecido en la normatividad aplicable vigente. Por otra parte, se observó una gran prevalencia de bacterias ácido-lácticas, las cuales fueron aisladas para su aprovechamiento subsecuente en desarrollos biotecnológicos orientados a mejorar la calidad del queso, aumentar su valor agregado y utilizarlo en aplicaciones distintas a la producción de lácteos fermentados.

Referencias

- Brooks J. C., Martinez B., Stratton J., Bianchini A., Krokstrom R. y Hutkins R. (2012) Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiol* 31(2):154-8. DOI: [10.1016/j.fm.2012.03.013](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.013).
- Cervantes E. F., Villegas de Gante A., Cesín V. J. A. y Espinoza O. A. (2008) Los quesos mexicanos genuinos/ Genuine Mexican Cheeses: Patrimonio cultural que debe rescatarse. 1st ed. Mundi Prensa México, México City, Mexico.
- Cesín V. A., Cervantes E. F. y Villegas de G. A. (2012) Producción industrial y artesanal de queso en México. En: *La leche y los quesos artesanales en México*. (Cervantes E. F. y Villegas de G. A., eds.) Universidad Autónoma Chapingo, México.
- De Medeiros C. M., de Fariña L. O., Strongin D., Ferreira C. L. L. F. y Lindner J. D. D. (2019) Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. *J Dairy Sci* 102. DOI:10.3168/jds.2019-16373.
- Funck G. D., Hermanns G., Vicenzi R., Schmidt J. T., Richards N. S. P. S., Silva W. P. y Fiorentini A. M. (2015) Microbiological and physicochemical characterization of the raw milk and the colonial type cheese from the Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 74(3):247-57.
- Gould L. H., Mungai E., y Barton B. C. (2014) Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011. *Foodborne Pathog Dis* 11(7):545–551. DOI:10.1089/fpd.2013.1650.
- Martín J. A., Contreras S. M. A., Contreras S. L. M., Moreno de la T. C., Martínez E. F. y Méndez R. M. D. (2018) Aislamiento e identificación de Enterobacterias a partir de quesos adobera. *Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos*. Disponible en: <http://e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad/article/view/336/200>.
- Méndez R. M. D., Gutiérrez R. N. E., León C. A. O. y Hernández J. A. L. (2007) Evaluación de la Calidad Microbiológica de Quesos Tipo Adobera Elaborados en Tepatitlán de Morelos, Jalisco. En: *9º Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos*; Puerto Vallarta, Jalisco. México. Universidad de Guadalajara: Pp. 39.
- NOM-110-SSA1-1994 (1994) Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-243-SS1-2010 (2010) Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, 2010, Diario Oficial de la federación México.

- Ruvalcaba G. J. M., Delgado M. R. J., Ruiz E. H. y Méndez R. M. D. (2016) Conteo de bacterias ácido-lácticas en queso adobera de los Altos de Jalisco y su relación con aspectos de calidad del producto. En Estudios en Inocuidad y Microbiología Alimentaria. Orozco H. L. O., Garay M. L. E. y Torres V. M. R., eds. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. pp 218-221.
- Te Mana K. K. y Ahitereiria M. A. (2009) Microbiological risk assessment if raw milk cheese. En: Food Standars, Rik assessment microbiology section. Australia, New Zealand.
- Torres-Vitela M. R., Mendoza-Bernardo M., Castro-Rosas J., Gomez-Aldapa C. A., Garay-Martinez L. E., Navarro-Hidalgo V. y Villarruel-Lopez A. (2012) Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. J Food Prot 75(1):79-84. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-11-258](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-258).
- Villegas de Gante A., Cervantes E. F., Cesín V. A., Espinoza O. A., Hernández M. A., Santos M. A. y Martínez-Campos A. R. (2014) Atlas de los quesos mexicanos genuinos. 1st ed. Ed. Biblioteca básica de Agricultura, Texcoco, México, México.
- Yoon Y., Lee S. y Choi K.-H. (2016) Microbial benefits and risks of raw milk cheese. Food Control 63:201-215. DOI: [10.1016/j.foodcont.2015.11.013](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013).

CAPITULO IV.

INTEGRACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO- LÁCTICAS AUTÓCTONAS DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO

Aislamiento, conservación e identificación genética de bacterias ácido lácticas autóctonas de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco

Delgado-Macuil Raúl Jacobo¹, Arteaga-Garibay Ramón Ignacio², Ruvalcaba-Gómez José Martín¹.

¹ Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac – Tepetitla, km. 1.5. Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Blvd. de la Biodiversidad #400. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600.

Autor de correspondencia: José Martín Ruvalcaba-Gómez. E-mail: ruvalcaba.josemartin@inifap.gob.mx

Resumen

El aislamiento y aprovechamiento de cepas específicas para la producción conlleva a la necesidad de contar con reservorios suficientes de cada microorganismo; por lo que, conservar microorganismos *ex-situ* se ha convertido en la razón primordial para el establecimiento de colecciones de microorganismos. El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento, identificación, tipificación y conservación de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de queso Adobera de los Altos de Jalisco. Se integró una colección de 115 bacterias de los géneros *Lactobacillus* (67%), *Leuconostoc* (11.3%), *Lactococcus* (10.4%), *Streptococcus* (1.7%), *Pediococcus* (5.2%), *Enterococcus* (2.6%) y *Weisella* (0.9%). La especie más abundante fue *L. plantarum* de las cuales, mediante secuenciación de multi locus se tipificaron 18 cepas y encontraron 10 perfiles alélicos diferentes. Se validó además un protocolo de conservación a largo plazo mediante el cual se conserva la viabilidad e integridad a nivel de membrana de las BAL.

Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo diverso de bacterias metabólica y fisiológicamente relacionadas por una serie de características. Son microorganismos Gram (+) positivos, negativos a actividades catalasa y oxidasa, carentes de citocromos, integrado por bacterias en forma de cocos y bacilos. Regularmente son bacterias no esporuladas y que no respiran, aero- y ácido-tolerantes, consideradas fastidiosas, es decir, que son difíciles de mantener y en algunos casos es complicado cultivarlas, puesto que requieren, para el crecimiento, una fuente de nitrógeno exógena, (como aminoácidos péptidos), la cual obtienen regularmente a través de la hidrólisis de caseína (en leche) o de algunas otras proteínas de acuerdo al medio en que se encuentren. Fermentan hexosas mediante las rutas metabólicas Embden–Meyerhof–Parnas y 6-fosfogluconato mediante la cual producen ácido láctico como producto final principal. La composición del DNA de este grupo de bacterias es de menos del 50 %mol de G+C (guanina+citosina), comprende seis familias y cerca de 40 géneros de los cuales destacan *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Fig. 4.1). (Salam 2016, Björkroth y Koort J. 2016).

Los quesos artesanales, por su naturaleza, y por ser elaborados bajo procesos poco estandarizados, sin pasteurización y por efecto del metabolismo de la microbiota nativa de la leche que se emplea (González-Córdova et al. 2016, Martins et al. 2018, Perin et al. 2017, Pardini et al. 2020) son un reservorio importante de BAL, las cuales juegan un papel crucial en el desarrollo de sabores, aromas y textura del queso y otros alimentos fermentados (Parra 2010, Picon et al. 2019), además de que muchas de ellas pueden ser benéficas para el humano mediante su consumo (Montel et al. 2014), o presentar propiedades tecnológicas basadas en la producción de metabolitos de interés o la capacidad de inhibir microorganismo potencialmente patógenos o asociados al deterioro del producto (Ferrari et al. 2016, Salvucci et al. 2016, Santiago-López et al. 2018).

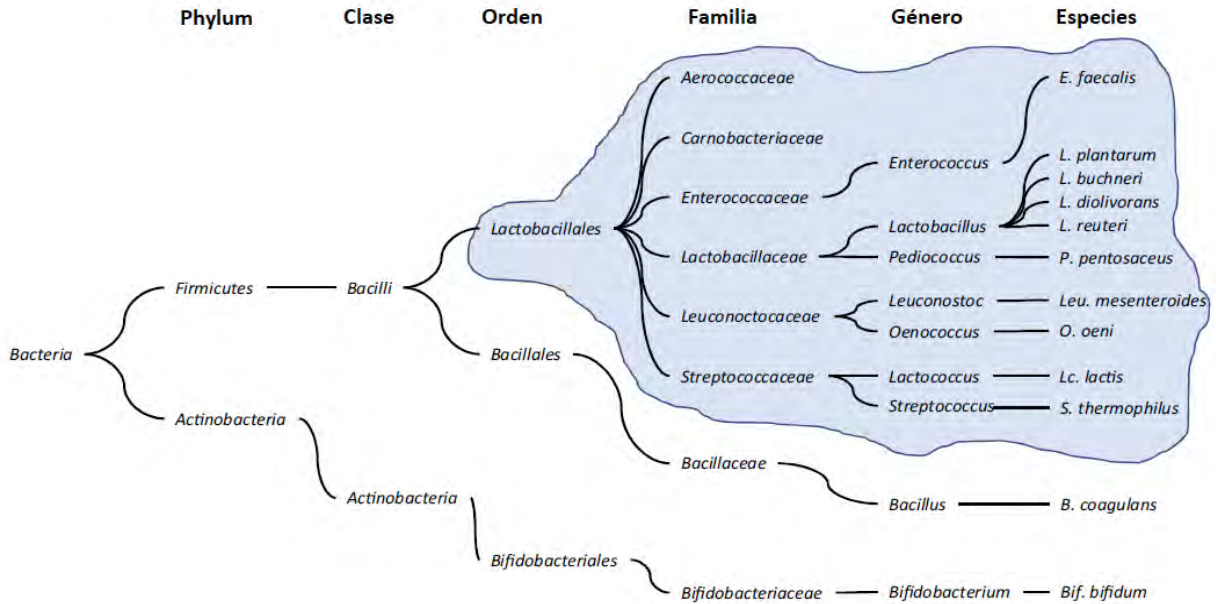


Figura 4.1 Descripción esquemática de la filogenia de las bacterias ácido-lácticas. Se representan solo dos phylum de los 30 del dominio Bacteria para mayor claridad. El orden de los Lactobacillales comprende 6 familias. Cada familia consta de varios géneros y se muestran solo los más conocidos, así como una selección de las especies más representativas. (Sauer et al. 2017)

Los principales géneros reportados como parte de la microbiota de BAL en quesos artesanales incluye *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Aldrete-Tapia et al. 2014, 2018, Ramírez-López y Vélez-Ruiz 2016, Falardeau et al. 2019, Ruiz-Moyano et al. 2019); inclusive en algunos casos han sido aprovechadas para mejorar los procesos de producción del queso de que son obtenidas, mediante su inclusión como cultivos iniciadores o promotores de la maduración (Terzic-Vidojevic 2015, Sacristán et al. 2016).

El aislamiento y aprovechamiento de cepas específicas para la producción conlleva además a la necesidad de contar con reservorios suficientes de cada microorganismo; por lo que, conservar microorganismos *ex-situ* se ha convertido en la razón primordial para el establecimiento de colecciones de microorganismos; las cuales se identifican como depósitos de recursos biológicos y constituyen una estrategia esencial para la conservación de la biodiversidad, a su vez que favorecen el estudio de la problemática involucrada con el uso de cada microorganismo (Weng et al. 2003, Montes de Oca et al. 2008, González y Jiménez 2013, Sharma y Shouche 2014).

La integración de colecciones de bacterias inicia con el aislamiento e identificación de las mismas. En ese contexto, para las BAL, como para la mayoría de especies bacterianas, el procedimiento inicial para su identificación genética es la amplificación, secuenciación y análisis filogenético del gen 16S rRNA, este gen se encuentra en todas las bacterias y su secuencia es lo suficientemente conservada para contener regiones hipervariables, variables y conservadas. Por su tamaño (~1500 pb), el gen 16S rDNA es fácil de secuenciar y contiene suficiente información para realizar análisis filogenéticos (Das et al. 2014). Este marcador molecular además ha sido aprovechado tanto para la identificación de bacterias a través de su recuperación con medios de cultivo como para aplicaciones de secuenciación masiva (Mori et al. 1997, Rodicio y Mendoza 2004, González et al. 2013, Yarza et al. 2014).

Hasta ahora, a través de la aplicación de metodologías independientes de cultivo y uso de medios de cultivo para determinar indicadores microbiológicos en queso Adobera, se ha visto que la microbiota de este queso es abundante en BAL, inclusive por secuenciación se identificaron los géneros más representativos de este grupo de bacterias, los cuales además mostraron ser los más representativos en la comunidad bacteriana del queso Adobera. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue el de aislar, conservar e identificar genéticamente bacterias ácido-lácticas para la integración de una colección activa de bacterias autóctonas del queso Adobera, que pueda ser aprovechada para su estudio y aplicación en desarrollos biotecnológicos.

Estrategia metodológica

Toma de muestras

La colección de bacterias se integró a partir de muestras de dos estudios diferentes. El primero de ellos correspondiente a un estudio independiente en el cual se visitaron ocho empresas queseras ubicadas en tres municipios de la región Altos sur del estado de Jalisco, cinco de ellas que producían queso adobera artesanal y tres más que producían queso tipo Adobera a partir de leche pasteurizada y un cultivo no específico para queso adobera. El segundo estudio incluyó la toma de muestras en tres queseras de dos municipios de los Altos de Jalisco que elaboran queso Adobera artesanal. Las muestras se conservaron en refrigeración (4-7 °C) durante su transporte al laboratorio y hasta su procesamiento (periodo no mayor a 48 h).

Aislamiento y selección

A partir de cada muestra de queso se prepararon diluciones decimales seriadas de acuerdo a lo sugerido por la NOM-110-SSA1-1994. De cada dilución se tomó una alícuota de 100 µl y se depositó sobre placas de gelosa MRS. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. De cada placa con crecimiento se seleccionaron los aislados bacterianos presuntivos para BAL (discriminación morfológica colonial. 2-3 colonias de cada morfología encontrada por muestra). Cada colonia se transfirió a medio MRS y se incubó nuevamente a 37 °C en agitación (120 rpm) durante 24 h. De cada tubo con crecimiento se inoculó una placa de gelosa MRS por estría cruzada para evaluar pureza (a nivel macroscópico).

Colonias aisladas de cada cepa se utilizaron para llevar a cabo la identificación presuntiva a nivel de grupo (BAL) con base en las pruebas de catalasa y oxidasa, afinidad tintoreal con la técnica de Gram, así como la descripción de la morfología colonial y microscópicas compatibles con el grupo de las BAL. Las cepas que cumplieran con las características de las BAL se transfirieron a placas de gelosa MRS para generar biomasa para su conservación y extracción del material genético para su identificación.

Consevación

Biomasa del cultivo fresco de cada aislado bacteriano presuntivo para BAL se resuspendió en caldo MRS a una concentración aproximada de 1×10^9 UFC/ml de acuerdo a la escala de turbidez de McFarland. 500 μ l de cada suspensión bacteriana se transfirió a un crio-tubo de 1.5 ml de capacidad con un volumen igual de glicerol al 30% (v/v) estéril. Las suspensiones con el crioprotector se homogeneizaron mediante uso de vortex y se colocaron a 4 °C durante 30 minutos para su estabilización. La conservación a largo plazo se llevó a cabo en congelación a -80 °C.

Extracción de DNA genómico

De dos a tres colonias de un cultivo fresco de cada cepa fueron re-suspendidas en solución buffer TE-50:20 para la extracción de DNA genómico. La extracción se hizo por el método sugerido por [Wilson \(2001\)](#). La integridad del material genético se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v y se conservó a -20 °C para análisis posteriores.

Amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA

La amplificación del gen 16S rDNA se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores 27f (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). El volumen de reacción fue de 25 μ l (2.5 μ l buffer de reacción Taq polimerasa 10X, 1 μ l de MgCl₂, 2.5 μ l de dNTP's, 2.5 μ l de cada iniciador, 11.7 μ l de agua grado molecular, 0.3 μ l de Taq polimerasa y 2 μ l de DNA). La reacción de amplificación comenzó con un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 57 °C por 1 min y elongación 72 °C por un min; para terminar, se incluyó un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.5 % p/v. Los amplicones fueron conservados a -20 °C y enviados secuenciados mediante secuenciación capilar tipo Sanger.

El análisis in silico de las secuencias para asignación de identidades consistió en la visualización, edición y generación de secuencias consenso en el software Bioedit® ([Hall](#)

1999) y FinchTV® ver. 1.4.0 (Geospiza Inc.). La asignación de identidad se llevó a cabo mediante BLAST en las plataformas GenBank y Ribosomal Data Project. Las identidades se corroboraron con la topología de una reconstrucción filogenética mediante el método Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000.

Identificación especie específico para cepas de Lactobacillus de los grupos Plantarum y casei

La identificación basada en secuenciación del gen 16S rDNA no siempre es suficiente para diferenciar entre especies bacterianas estrechamente relacionadas, como es el caso de los grupos plantarum y casei del género *Lactobacillus*. Por ello, para la diferenciación de especies para estos grupos se apoyó en la amplificación de genes especie-específico. La diferenciación de *Lactobacillus Plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus* se basó en la amplificación del gen recA de acuerdo a lo sugerido por (Torriani et al. 2001). Por su parte la diferenciación de *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* y *L. rahmnosus* se llevó a cabo basado en las diferencias dentro de la región V1 del gen 16S rDNA de acuerdo al procedimiento descrito por Ward y Timmins (1999).

Secuenciación multi-locus para L. plantarum

Debido a la abundancia de cepas de *L. plantarum* que se obtuvo en la colección de BAL autóctonas de queso Adobera artesanal, se llevó a cabo la secuenciación multi-locus de 18 cepas de *L. plantarum* para evaluar diversidad intra-especie. La estrategia incluyó la amplificación y secuenciación en reacciones independientes de siete genes *housekeeping* de *L. plantarum* (Tabla 4.1).

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 25 microlitros (2.5 µl Buffer 10X, 1 µl MgCl₂ 50 mM, 1.5 µl DNTP's 200 µM, 0.625 µl primer forward, 0.625 µl primer reverse, 0.2 µl TaqDNA pol, 2 µl DNA templado, 16.55 µl H₂O libre de nucleasas). La amplificación por PCR incluyó un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C 10 minutos, 30 ciclos que incluyó desnaturalización a 95 °C 30 s, alineamiento a 48 °C 1 min, y extensión a 72 °C 1 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa al 1.5 % y 80 V durante 1 hora.

Tabla 4.1 Primers utilizados para el análisis multi locus para evaluar diversidad intraespecie en *L. plantarum*.

Proteína	Gen	Primers	Secuencia 5' - 3'	Fragmento	Referencia
Fosfoglucomutasa	pgm	PGM1-LP PGM2	CTTGCGGCCAACCCCAGAAC CCGTAGGATTCTTCAAACC	863 pb	
D-Alanina-D-alanina ligasa	ddl	DDL1-LP DDL2-LP	AACATGATGTTTCGAAGCG GTTAGTAAAACCAGGTAACG	916 pb	
Sub-unidad beta de DNA girasa	gyrB	GYRB1-LP GYRB2-LP	GTGGTCTCACGGGGTTCG TTCGACAATGAACAACAC	946 pb	De las Rivas et al. 2006
Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	purK1	PURK1 PURK2	TGACCTACGAGTTTGAAAAC GGTGACATGACCCATCTTGCG	838 pb	
Glutamato deshidrogenasa	gdh	GDH1 GDH2	CCTTACAAGGGCGGCTTACG ACGCCACCAGCATTGGCAGC	859 pb	
Proteína de reparación de DNA	mutS	MUT1 MUT2	AAGTACGTTCTCATCCCATATG ATAACGCACACCCCGCAGGTC	987 pb	
DNA recombinasa	recA	planF pREV	CCGTTTATGCGGAACACCTA TCGGGATTACCAAACATCAC	318 pb	Torriani et al. 2001

Las secuencias se editaron en software Bioedit ver. 7.1.3.0 (Hall 1999) para generar las secuencias consenso, las cuales se alinearon, junto con las secuencias de referencia de los alelos ya reportados para *L. plantarum* (De las Rivas et al. 2006) y se analizaron para la asignación alélica en el software Dambe ver. 7.0.1 y DnaSP ver. 6.12.03. (Barcelona, España) para obtener información acerca del número de sitios polimórficos, contenido de G+C, número de sustituciones polimórficas y la relación entre sustituciones no sinónimas y sinónimas.

Resultados y discusión

Aislamiento, recuperación y conservación de BAL

Se obtuvo un total de 115 aislados bacterianos de BAL a partir de las muestras de queso Adobera artesanal de los altos de Jalisco. Los cuales fueron identificados genéticamente mediante la amplificación del gen 16S rDNA. Para ello se obtuvieron y visualizaron amplicones de 1500 pb del gen 16S rDNA (Fig. 4.2).

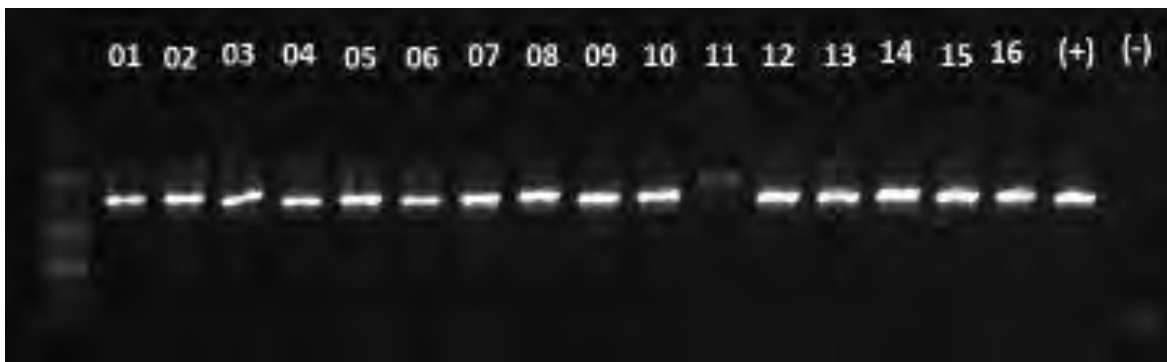


Figura 4.2 Producto de la amplificación por PCR del gen 16S ribosomal con el uso de los iniciadores universales 27f y 1492r

Los análisis *in silico* de las secuencias cumplieron los criterios mínimos de calidad para asignar identidad al menos a nivel de género. Las secuencias se encuentran disponibles en la base de datos del GenBank con los números de accesoión MH935829 – MH935923 (www.ncbi.nlm.nih.gov). La identidad de las cepas se distribuyó en un total de siete géneros bacterianos, *Lactobacillus* (67%), *Leuconostoc* (11.3%), *Lactococcus* (10.4%), *Streptococcus* (1.7%), *Pediococcus* (5.2%), *Enterococcus* (2.6%) y *Weisella* (0.9%) (Fig. 4.3). Los géneros encontrados coinciden con reportes previos en los que se hace identificación de cepas de BAL aisladas de quesos artesanales, sobre todo para quesos frescos (Saxer et al., 2013).

La asignación de identidades a nivel de especie fue posible para todos los géneros bacterianos, con excepción de las cepas del género *Lactobacillus* de los grupos *plantarum* y *casei* (59% de las cepas). Todas las cepas bacterianas fueron conservadas en medio MRS adicionado con glicerol a -80 °C. Adicionalmente se validó un protocolo de conservación para BAL basado en crioconservación con medio tioglicolato; la viabilidad



celular se evaluó mediante cuenta en placa, además de que se generó evidencia de que las células mantienen su integridad a nivel de membrana mediante citometría de flujo y fluorescencia, lo cual se corroboró a través de la evaluación de su cinética de crecimiento posterior a su recuperación (ANEXO 4).

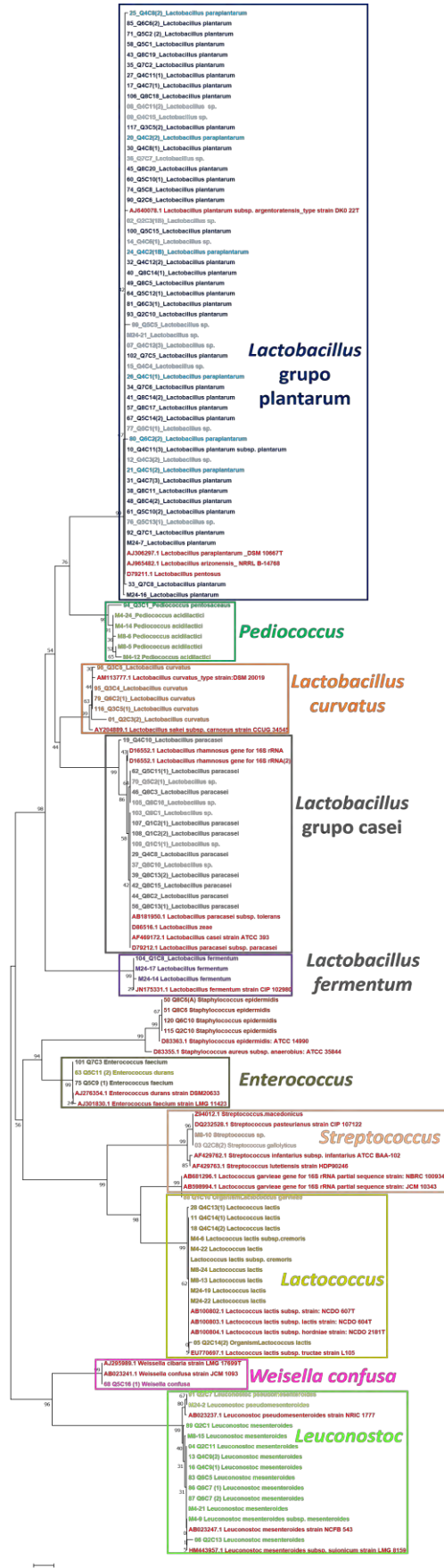


Figura 4.3 Filograma de 98 cepas de BAL de queso Adobera. Se usó el método evolutivo de máxima verosimilitud, el valor porcentual de las ramas indica el Bootstrap de 1000 repeticiones (MEGA7).

Identificación especie-específico de cepas de *Lactobacillus*

A través del uso de iniciadores especie-específico se logró la diferenciación a nivel de especie de las cepas de *Lactobacillus* de los grupos *plantarum* y *casei* (Fig.4.4 y 4.5). Los resultados mostraron que del total de cepas del grupo *plantarum*, el 90% correspondió a *L. plantarum* y el resto a *L. paraplantarum*; mientras que para las cepas del grupo de *Lactobacillus casei*, el total de las cepas resultaron positivas para *L. paracasei*. La identidad se corroboró a través de la secuenciación de amplicones al azar de cada una de las especies observadas y la función BLAST de la plataforma NCBI.

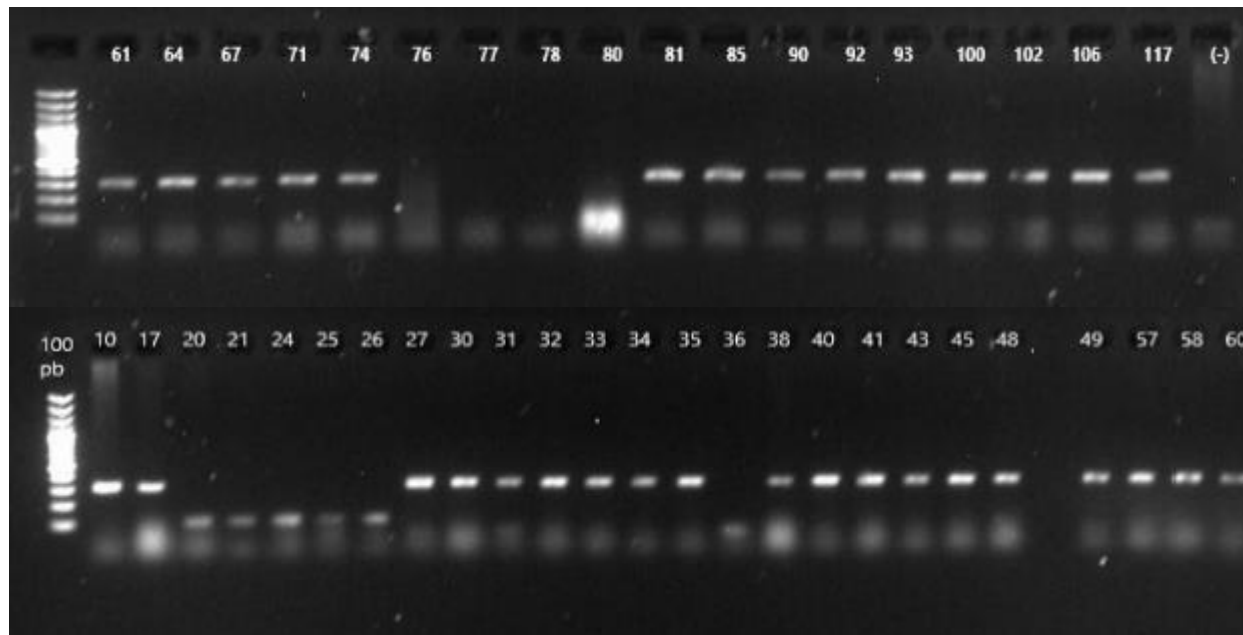


Figura 4.4 Diferenciación de cepas del grupo de *L. plantarum* a través del uso de iniciadores especie-específico para el gen *recA* (*L. plantarum*: 318 pb. *L. paraplantarum*: 107 pb)

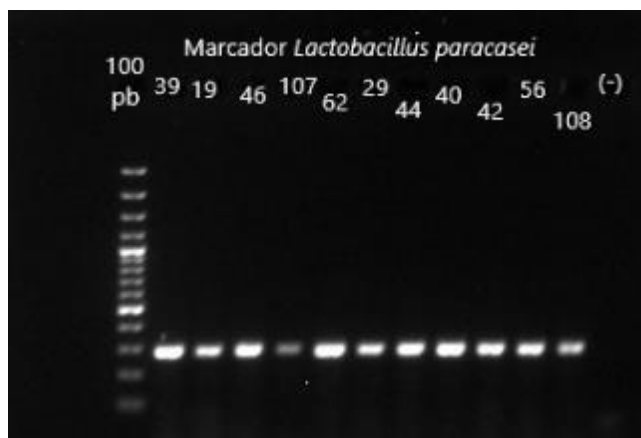


Figura 4.5 Diferenciación de cepas del grupo de *Lactobacillus casei* a través de amplificación por PCR de la región V1 del gen 16S rDNA.

Secuenciación multi-locus para *Lactobacillus plantarum*

Se logró la amplificación y secuenciación de siete marcadores moleculares para *L. plantarum*. Dos de los marcadores (16S rRNA y *recA*) se utilizaron para preliminarmente identificar diferentes haplotipos del microorganismo. Los cinco marcadores restantes correspondieron a los diferentes loci considerados para obtener los perfiles alélicos de las cepas.

El análisis de haplotipos realizado con las secuencias del gen 16S rDNA y el gen *recA* indican que, de las 18 cepas incluidas en el estudio, se distribuyen en 15 haplotipos diferentes para el gen 16S rDNA y 4 haplotipos del gen *recA*.

Por su parte, las secuencias de los cinco locus incluidos para la tipificación de las cepas de *L. plantarum* generaron fragmentos útiles de entre 525 pb (*purK*) y 677 pb (*ddl*) de longitud (Tabla 4.2). La asignación de alelos se llevó a cabo mediante el uso de las secuencias de referencia reportadas por de las Rivas et al (2006) y la búsqueda de nuevos alelos (diferentes a los ya referenciados). Para el marcador *pgm*, las cepas estudiadas se distribuyeron en 4 variantes alélicas, dos de ellas correspondientes a alelos ya reportados del microorganismo y dos alelos nuevos. Por su parte, de acuerdo al

marcador *ddl*, las cepas pertenecen a cuatro alelos diferentes, dos de ellos reportados en el esquema previamente publicado para *L. plantarum* y dos alelos nuevos o diferentes a los previamente reportados. El marcador *gyrB* mostró una distribución de las cepas en 6 variantes alélicas, de las cuales solo una cepa correspondió a uno de los alelos previamente reportados y los cinco restantes se distribuyeron en alelos nuevos. Por el contrario, para el marcador *purK* no se observaron alelos nuevos, y las cepas se distribuyeron en tres variantes alélicas diferentes. Finalmente, cuatro alelos diferentes del marcador *mut* fueron observados en la colección de bacterias evaluadas, uno de ellos correspondiente a los alelos previamente reportados (8) y cuatro alelos nuevos o distintos a los del esquema previamente publicado para *L. plantarum*. El número de sitios polimórficos fue desde 2 hasta 17, en función del marcador molecular; mientras que la proporción de G+C osciló entre 42.8 y 48.1 %.

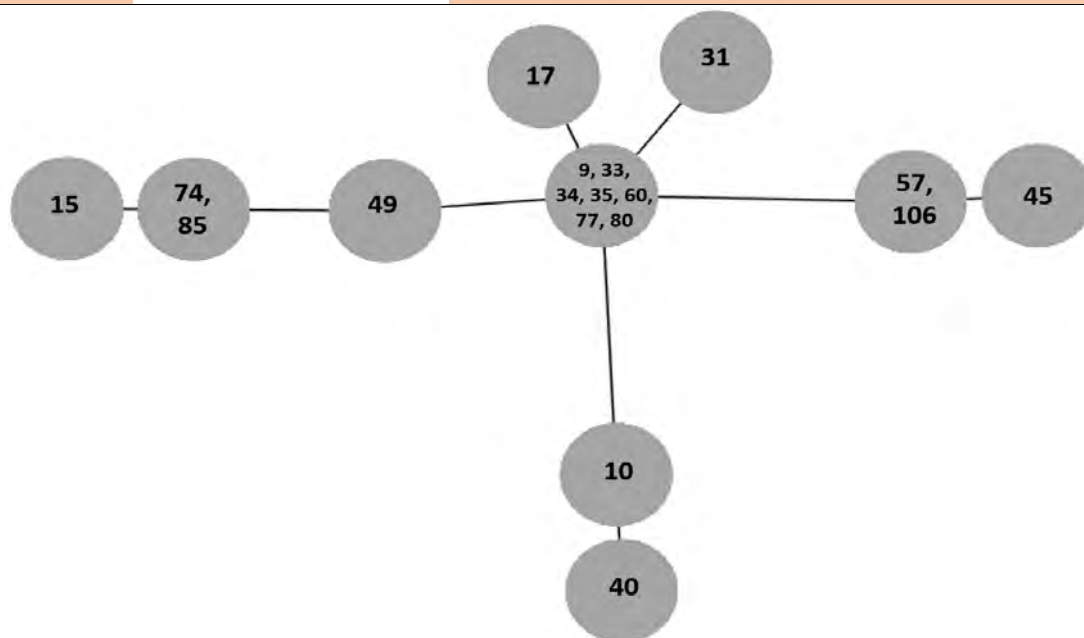
Tabla 4.2 Variaciones en las secuencias de los 6 locus utilizados para la tipificación de *L. plantarum*.

Gen	Tamaño del fragmento	Contenido de G+C (mol %)	No. de alelos observados	No. de sitios polimórficos	No. de sustituciones nucleotídicas por sitio
<i>pgm</i>	558	43.2	4	17	0.0046
<i>ddl</i>	677	42.8	4	2	0.0009
<i>gyrB</i>	612	44.4	6	5	0.0016
<i>purK</i>	525	48.1	3	3	0.0017
<i>mutS</i>	586	46.8	5	9	0.0045

La frecuencia de alelos mostró que, para todos los marcadores, uno de los alelos fue predominante en la población sobre los demás. El perfil alélico de las cepas se analizó para evaluar la incidencia de la misma variante alélica de *L. plantarum* en las muestras incluidas en el estudio. Se observó que existe una variante alélica presente en cuatro de las seis muestras de queso, incluido un queso elaborado a partir de leche pasteurizada (Tabla 4.3). Lo que podría indicar que esta cepa es necesaria para lograr las características propias del producto.

Tabla 4.3 Asignación del número de alelo por cada locus evaluado para la tipificación de cepas de *L. plantarum*.

ID CEPa	QUESO	TIPO QUESO*	PGM	DDL	GYR	PURK	MUT
74	Q5	RM	1	3	11	1	10
85	Q6	PM	1	3	11	1	10
49	Q8	RM	1	1	11	1	9
31	Q4	RM	4	8	12	1	12
40	Q8	RM	2	1	10	6	6
17	Q4	RM	1	1	9	1	12
15	Q4	RM	1	3	8	1	10
10	Q4	RM	2	1	4	6	6
9	Q4	RM	1	1	12	1	12
33	Q7	RM	1	1	12	1	12
34	Q7	RM	1	1	12	1	12
35	Q7	RM	1	1	12	1	12
60	Q5	RM	1	1	12	1	12
77	Q6	PM	1	1	12	1	12
80	Q6	PM	1	1	12	1	12
45	Q8	RM	5	9	12	4	11
57	Q8	RM	5	3	12	4	11
106	Q8	RM	5	3	12	4	11



*RM: Queso elaborado artesanalmente a partir de leche cruda. PM: Queso elaborado a partir de leche pasteurizada y cultivo iniciador. El color del renglón representa diferentes perfiles alélicos. Cada uno de los círculos del esquema representa un perfil alélico y el número corresponde al ID de las cepas evaluadas.

Conclusiones

Se integró una colección activa de BAL obtenidas a partir de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco, la cual servirá como base para identificar su potencial tecnológico y probiótico. Los géneros bacterianos predominantes entre cepas de BAL aisladas de queso adobera fueron *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. La genotipificación por amplificación del gen 16S rRNA resulta ideal para la identificación de BAL aisladas a partir de queso adobera artesanal. No obstante, para cepas estrechamente relacionadas del grupo de *Lactobacillus*, la identificación tuvo que complementarse con el uso de marcadores especie-específico, siendo *Lb. plantarum* y *Lb. paracasei* los mas representativos para este grupo de bacterias. El análisis de MLST para cepas de *L. plantarum*, como bacteria más abundante en la colección, fue útil para la tipificación de diferentes variantes alélicas, de las cuales se identificaron 10 perfiles diferentes, con incidencia de uno de estos en la mayoría de las muestras de origen de las bacterias. Adicionalmente se validó un protolo de conservación a largo plazo para BAL con el que se logró mantener alrededor del 90% de la viabilidad celular y 80% de las células con sus membranas citoplasmáticas integras.

Referencias

- Aldrete-Tapia A., Escobar-Ramírez C. M., Tamplin M. L. y Hernández-Iturriaga M. (2018) Characterization of Bacterial Communities in Mexican Artisanal Raw Milk "Bola de Ocosingo" Cheese by High-Throughput Sequencing. *Front Microbiol* 9:2598. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02598](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02598).
- Aldrete-Tapia A., Escobar-Ramírez M. C., Tamplin M. L. y Hernández-Iturriaga M. (2014) High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiol* 44:136–141. DOI: [10.1016/j.fm.2014.05.022](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.022).
- Björkroth, J. y Koort J. (2016) *Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity*. Reference Module in Food Science. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.00864-7.
- Das S., Dash H. R., Mangwani N., Chakraborty J. y Kumari S. (2014) Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods* 103:80-100. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.05.013.
- de Las Rivas B., Marcobal A. y Muñoz R. (2006) Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology* 152(Pt 1):85-93. DOI: [10.1099/mic.0.28482-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.28482-0).
- Falardeau J., Keeney K., Trmčić A., Kitts D. y Wang S. (2019) Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiol* 83:48-58. DOI: 10.1016/j.fm.2019.04.002.
- Ferrari I. da S., de Souza J. V., Ramos C. L., da Costa M. M., Schwan R. F., Dias F. S. (2016) Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. *Food Microbiol* 60:29-38. DOI: 10.1016/j.fm.2016.06.014.
- González G. D. M. y Jiménez Q. J. N. (2013) Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiol.* 4(1):23-33.
- González G. L. N., Venegas L. M. C. y Riaño P. D. M. (2013) Comparación entre el potencial de las regiones variables del 16s rDNA para la identificación de *Lactobacillus* spp. (Lactobacillaceae). *Acta biol Colomb* 18(2):349-364.
- González-Córdova A. F., Yescas C., Ortiz-Estrada Á. M., De la Rosa-Alcaraz M. de los Á., Hernández-Mendoza A. y Vallejo-Cordoba, B. (2016) Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *J Dairy Sci* 99(5):3250–3262. DOI:10.3168/jds.2015-10103.



- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Martins M. C. de F., de Freitas R., Deuvaux J. C., Eller M. R., Nero L. A. y de Carvalho A. F. (2018) Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. Food Res Int 108:295–300. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.060.
- Montel M.-C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D.A., Desmasures N. y Berthier F. (2014) Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. Int. J. Food Microbiol 177:136–154. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019).
- Montes de Oca N., Gonzáles R. A., Riverón Y., Nuñez A., Villoch A. y Rodríguez N. (2008) ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA COLECCIÓN DE CULTIVOS DEL CENSA. Rev Salud Anim. [en línea] 30(1):17-24. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X200800010003&lng=es&nrm=iso accedido en 28 jul. 2019.
- Mori K., Yamazaki K., Ishiyama T., Katsumata M., Kobayashi K., Kawai Y., Inoue N. y Shinano H. (1997) Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of Lactobacillus casei-related taxa. Int J Syst Bacteriol 47(1):54-7. DOI: [10.1099/00207713-47-1-54](https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-54).
- Pardini G. M. T, de Sousa S. J., Pereira V. P. M y Prado M. J. G. (2020) Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. Food Res Int 128:108783. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108783.
- Parra H. R. A. (2010) Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de ciencias agropecuarias 8(1):93-105.
- Perin L. M., Savo Sardaro M. L., Nero L. A., Neviani E. y Gatti, M. (2017). Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. Food Microbiol 65:160–169. DOI: 10.1016/j.fm.2017.02.005.
- Picon A., López-Pérez O., Torres E., Garde S. y Nuñez M. (2019) Contribution of autochthonous lactic acid bacteria to the typical flavour of raw goat milk cheeses. Int J Food Microbiol 299:8-22. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.011](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.011).
- Ramírez-López C. y Vélez-Ruiz J. F. (2016) Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. Información Tecnológica 27(6):115-128. DOI: 10.4067/S0718-0764201600060001.
- Rodicio M. R. y Mendoza M. C. (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22(4):238-245. DOI: 10.1016/S0213-005X(04)73073-6.

- Ruiz-Moyano S., Gonçalves S. M. T. P, Galván A. I., Merchán A. V., González E., Córdoba M. G. y Benito M. J. (2019) Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. *LWT Food Sci Technol* 114:108388. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108388.
- Sacristán N., Fernández D., Catro J. M., Tornadijo M. E. y Fresno J. M. (2016). Effect of an autochthonous starter culture, including lactococci and *Geotrichum candidum* strains, on the ripening of a semi-hard goats milk cheese. *African J Microbiol Res* 10. 301-311. 10.5897/AJMR2015.7833.
- Salam A. I. (2016) Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. Reference Module in Food Science. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00857-X.
- Salvucci E., LeBlanc J. G., Pérez G. (2016) Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT - Food Sci Technol* 70:185-191. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.02.043
- Santiago-López L., Aguilar-Toalá J. E., Hernández-Mendoza A. Vallejo-Cordoba B., Liceaga A. M. y González-Córdova A. F. (2018) Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *J Dairy Sci* 101:3742–3757. DOI: 10.3168/jds.2017-13465.
- Sauer M., Russmayer H., Grabherr R., Peterbauer C. K. y Marx H. (2017) The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends Biotechnol* 35(8):756-769. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.05.002.
- Sharma A. y Shouche Y. (2014) Microbial Culture Collection (MCC) and International Depository Authority (IDA) at National Centre for Cell Science, Pune. *Indian J Microbiol.* 54(2): 129–133. DOI: 10.1007/s12088-014-0447-y.
- Terzić-Vidojević A., Tonković K., Leboš P. A., Beganović J., Strahinić I., Kojić M., Veljović K., Golić N., Kos B., Čadež N., Gregurek L., Šušković J., Raspor P. y Topisirović L. (2015) Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. 63(1):298-306. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.050.
- Torriani S., Felis G. E. y Dellaglio F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* 67(8):3450-4. DOI: [10.1128/AEM.67.8.3450-3454.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3450-3454.2001).
- Ward L. J. y Timmins M. J. (1999) Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 29(2):90-2. DOI: [10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x).
- Weng A. Z., Junco D. R. A. y Díaz R. O. E. (2003) Colección de cultivos microbianos: Apuntes sobre su desarrollo. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 41(1). Disponible en



http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156130032003000100009&lng=es&nrm=iso accedido en 29 jul. 2019.

Wilson K. (2001) Preparation of genómico ADN from bacteria. in Current protocols in molecular biology (2003). (Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore David D., Seidman J.G., Smith J. A. y Struhl K., eds). Greene John Wiley & Sons, Inc. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56

Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F. O., Ludwig W., Schleifer K. H., Whitman W. B., Euzéby J., Amann R. y Rosselló-Móra R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. Nat Rev Microbiol 12(9):635-45. DOI: [10.1038/nrmicro3330](https://doi.org/10.1038/nrmicro3330).

CAPITULO V.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS AUTÓCTONAS DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DE LOS ALTOS DE JALISCO

Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas autóctonas de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco

Delgado-Macuil Raúl Jacobo¹, Arteaga-Garibay Ramón Ignacio², Ruvalcaba-Gómez José Martín¹.

¹ Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac – Tepetitla, km. 1.5. Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Blvd. de la Biodiversidad #400. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600.

Autor de correspondencia: José Martín Ruvalcaba-Gómez. E-mail: ruvalcaba.josemartin@inifap.gob.mx

Resumen

Los productos lácteos fermentados artesanales, incluida una gran variedad de quesos, pueden ser vehículo de diversos microorganismos que potencialmente pueden exhibir propiedades probióticas. La microbiota del queso adobera de los Altos de Jalisco está fuertemente representada por bacterias ácido-lácticas. El presente estudio presenta el perfil probiótico de 38 cepas de BAL autóctonas de este queso. Cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* mostraron mejor desempeño en evaluaciones, tanto en lo referente a tolerar las diferentes condiciones de estrés, como fue lo exhibido por *Lactobacillus plantarum* Q8C20, como en lo que respecta a propiedades de adherencia, actividad proteolítica y producción de bacteriocinas; sobre todo lo mostrado por los sobrenadantes de *Enterococcus faecium* Q5C9(1) que presentaron el espectro de inhibición más amplio contra microorganismos patógenos. Los resultados confirman que ciertas cepas de BAL autóctonas de queso adobera podrían ser aprovechadas como microorganismos probióticos.

Introducción

Los probióticos son comúnmente denominados como microorganismos viables que exhiben un efecto benéfico sobre la salud del consumidor (humanos o animales) mediante su ingesta en concentraciones apropiadas, aunque además de que los beneficios son cepa-específicos y no especie- o género-específicos. Muchos de estos efectos benéficos atribuidos a los probióticos se relacionan, entre otros, al tracto gastrointestinal, por lo que se asocia a la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir al tracto gastrointestinal superior y su supervivencia y crecimiento en el intestino, por la tolerancia a ácido y sales biliares que presentan; además de que algunos tienen la capacidad de producir sustancias como bacteriocinas y pueden adherirse a líneas celulares de intestino humano y colonizar el intestino (Anadón et al. 2016).

Los microorganismos considerados como probióticos tienen como característica principal el poseer la capacidad de resistir condiciones desfavorables en el cuerpo humano (o el organismo al que se suministren), por ejemplo enzimas presentes en la saliva, niveles bajos de pH y jugos pancreáticos; así como la capacidad de colonizar células epiteliales del intestino y contribuir a la salud del huésped mediante la regulación de la comunidad microbiana y ejercer funciones biológicas específicas (de Melo et al. 2018).

La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) en conjunto con la WHO (World Health Organization) ha establecido los criterios mínimos para la selección de microorganismos con potencial probiótico para ser incluidos en alimentos (FAO/WHO 2002), esto incluye: conocer el género y especie de la cepa con potencial probiótico, ya que evidencias vigentes sugieren que los efectos probióticos son cepa-dependiente; la nomenclatura deberá alinearse a lo publicado y la identificación basada en hibridación DNA-DNA o secuencias del gen 16S rDNA; evaluar el potencial probiótico *in vitro* de las cepas bajo estudio (evaluar la resistencia a acidez gástrica, resistencia a acidez biliar, capacidad de adherencia a mucosa y/o células epiteliales humanas y otras líneas celulares, actividad antimicrobiana contra microorganismos potencialmente patógenos, capacidad para reducir la adhesión de patógenos a superficies, actividad hidrolítica de

sales biliares); asegurar aspectos relacionados con la seguridad en el uso de la cepa como probiótico (infecciones sistémicas, deterioro de actividades metabólicas, estimulación excesiva del sistema inmune y transferencia de genes) y evaluar el potencial probiótico en modelos *in vivo* (Fase 1:seguridad, Fase 2 eficacia, Fase 3 eficiencia y Fase 4 vigilancia).

Dentro del grupo de BAL que se han estudiado como probióticos, *Lactobacillus* fue el primer género del cual se describió el potencial probiótico, además de que más se ha aprovechado en aplicaciones tecnológicas, tales como su uso para producir conservadores, acidulantes y saborizantes para alimentos, además de su aprovechamiento en la industria cosmética y la producción de polímeros biodegradables de ácido poli-láctico. (König y Fröhlich, 2009). Otros géneros de BAL de los cuales se ha demostrado algún efecto probiótico incluyen *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Wood and Holzapfel, 1995, de Melo et al. 2019).

Debido al metabolismo que presentan, gran parte de las BAL que han sido reportadas como potencialmente probióticas, se asocian a productos lácteos fermentados; de hecho, a inicios del siglo XX, el bacteriólogo ruso Eli Metchnikoff dio la primera explicación científica de los efectos benéficos de las BAL presentes en leches fermentadas, ya que atribuía el buen estado de salud y la longevidad de la población Búlgara a la gran cantidad de leches fermentadas que consumían y, en 1908 postuló su teoría “longevidad sin envejecimiento” en la que considera que las BAL promueven el desplazamiento de bacterias productoras de toxinas normalmente presentes en el intestino, lo que resulta en un ambiente más saludable (Lourens-Hattingh and Viljoen 2001, Vinderola et al. 2017).

En ese contexto, se sabe que una fuente importante de microorganismos probióticos son los productos lácteos artesanales, por lo que una gran cantidad de investigaciones se han orientado a caracterizar las BAL presentes en este tipo de productos para su evaluación probiótica y su aprovechamiento en la mejora y desarrollo de nuevos productos lácteos con actividad probiótica; además de que estos esquemas de

evaluación también se han aprovechado para la obtención y aprovechamiento de BAL con potencial probiótico en especies animales de interés zootécnico.

Ejemplo de ello es lo publicado por [Edalati en 2018](#), donde, a partir de muestras de leche de camello realizó el aislamiento e identificación genética de cepas de BAL a partir de las cuales seleccionó al azar ocho, en las que *incluyó* *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides* y *Weissella confusa* para evaluar su actividad antagónica contra *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* PTCC 1431 y *E. coli* ATCC 25922, considerados como patógenos; a través de lo cual evidenció que las cepas evaluadas muestran actividad antagónica, siendo mayor esta contra la cepa de *S. aureus*.

Uno de los aspectos fundamentales para la evaluación de microorganismos con potencial probiótico, es que, además de exhibir dicho potencial *in-vitro*, muestre capacidades tecnológicas que le permitan resistir las condiciones de procesamiento y almacenamiento del producto al que se pretende integrar como vehículo para su suministro; en ese contexto, un ejemplo de este tipo de estudios es el publicado por [Georgieva en 2009](#) en el cual evaluaron las propiedades tecnológicas de cepas de *Lactobacillus plantarum* candidatas a ser utilizadas como probióticos. En su estudio incluyeron ocho cepas de *L. plantarum* aisladas a partir de quesos búlgaros artesanales madurados y seleccionadas por sus propiedades de potencial probiótico. Los ensayos incluyeron evaluar la actividad de diferentes enzimas mediante las que observaron que, en general, las cepas exhibieron una elevada actividad aminopeptidasa y fosfatasa, en contraste con la actividad lipolítica que fue débil. Reportan también una baja actividad proteolítica para las cepas y las caracterizaron como variantes lentas con respecto a sus propiedades de coagulación. Las cepas fueron incluidas en la producción de leche fermentada con lo que observaron una buena capacidad de adaptación y supervivencia (mantenimiento de elevada viabilidad) durante pruebas de vida de anaquel extendida y tolerancia a 6 % de NaCl; también evaluaron la resistencia a conservadores utilizados comúnmente en productos lácteos, con lo que demostraron resistencia a propionato de calcio y sensibilidad a sorbato de potasio (0.5 a 1%) y nisina (0.02%).



El aprovechamiento de las BAL como probióticos no se acota solamente a su uso en humanos sino que también se han documentado diversos beneficios del suministro de BAL a diferentes especies animales incluidos ruminantes (Ghorbani et al. 2002, Krehbiel et al. 2003, Luan 2015, Kalebich y Cardoso 2017), en los que se ha reportado que su ecosistema microbiano intestinal puede incluir más de 600 especies microbianas conocidas (bacterias, protozoos y hongos), y al menos 42 microorganismos (aislados de dicha comunidad) están aprobados para su uso en la manipulación de biomasa, incluidas especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* y *Propionibacterium* (Alliance Animal Health 2009, Seo et al. 2010, Kalebich y Cardoso 2017). Los principales efectos demostrados sobre los beneficios de los probióticos en la alimentación del ganado destacan mejora en la eficiencia alimenticia (Beeman 1985, Kalebish y Cardoso 2017) y estimulación del sistema inmune (producción de varias interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa, interferones, inmunoglobulinas y aumenta la producción de células T y B) (Krehbiel et al. 2003, McAllister et al., 2011, Raabis et al. 2019). También en la producción de cerdos es común el uso de probióticos, principalmente con el objetivo de incrementar la productividad y desempeño de los cerdos, mitigar la incidencia de enfermedades, incrementar la calidad de los productos o reducir la cantidad de contaminantes que esta actividad genera (Barba-Vidal et al. 2019). Similarmente, el uso de probióticos en la producción de aves de engorda y postura ha mostrado efectos benéficos sobre la eficiencia en la alimentación, ganancia de peso y estimulación del sistema inmune del ave (Bai et al. 2013).

El objetivo del presente capítulo fue determinar el potencial probiótico de cepas de BAL aisladas a partir de queso Adobera artesanal a través de ensayos *in vitro*.

Estrategia metodológica

Selección de cepas

Se seleccionaron 31 cepas de la colección de bacterias ácido lácticas autóctonas de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco. Se incluyeron cepas de los siete géneros bacterianos encontrados durante el aislamiento (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Weisella*). Las cepas se recuperaron sobre placas de gelosa MRS y la biomasa fresca se utilizó para las evaluaciones.

Evaluación in vitro del potencial tecnológico y probiótico de BAL

Para la definir el perfil de potencial probiótico se evaluó la cinética de crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés en un modelo miniaturizado en microplacas (volumen de 200 microlitros) y evaluación mediante absorbancia a 550 y 660 nm. El perfil tecnológico-probiótico de las cepas incluyó la evaluación del crecimiento de cada cepa en medio MRS y resistencia a diferentes temperaturas (10, 30 y 45 °C), diferentes concentraciones de sal (2, 5 y 7% de NaCl) y diferentes valores de pH (2, 5 y 7) monitorizados a través de densidad óptica (Amarocho 2011, Sánchez y Tromps 2014). La tolerancia a sales biliares se determinó mediante el crecimiento de las cepas en medio MRS adicionado con taurocolato de sodio (0.3 y 1%).

La capacidad proteolítica de 14 de las cepas seleccionadas se evaluó mediante el uso del método de Cd-Nyh propuesto por Wick et al., (2004), a través de la inoculación (1×10^8 ufc/ml) de leche descremada estéril con cada una de las cepas y la determinación de la acumulación de aminoácidos libres (FAA) durante su fermentación. La cuantificación de aminoácidos libres (como indicador de proteólisis) se llevó a cabo mediante el uso de una curva estándar de leucina. La capacidad lipolítica de las 14 cepas se determinó en placas de gelosa nutritiva adicionado con 1% de nata añadida (aproximadamente 36% de materia grasa). La formación de halos alrededor del crecimiento es indicador de la degradación de grasa (Ramírez y Vélez 2016). El perfil probiótico se complementó con pruebas de inhibición de patógenos, tales como *Salmonella thiphymorium*, *Escherichia*

coli, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* asociada a la producción de bacteriocinas o sustancias inhibidoras. La producción de bacteriocinas se consideró positiva cuando, al inocular el microorganismo patógeno (1×10^8 ufc/ml) en presencia del sobrenadante libre de células (20 μ L) de un cultivo de 48 h de cada una de las cepas de BAL, presentó formación de zonas de inhibición o halos. También se consideró la capacidad de auto-agregación y adhesión a mucina de las cepas seleccionadas (Ahn et al., 2017; Maldonado et al., 2018).

Resultados y discusión

El crecimiento de diferentes BAL aisladas a partir de queso adobera artesanal se ilustra en la [Figura 5.1](#). Se consideraron diferentes condiciones de estrés a las que las cepas se pueden enfrentar cuando son utilizadas como probióticos, desde su ingesta hasta su implantación en el tracto gastrointestinal. En ese sentido, la bacteria debe ser capaz de tolerar a condiciones como acidez y la presencia de sales biliares, así como de contar con mecanismos de adherencia a mucosas y superficies intestinales ([Kirjavainen et al. 1998](#), [Knutton et al. 1989](#), [Jacobsen et al. 1999](#)). Se consideraron cepas tolerantes aquellas que desarrollaron curvas de crecimiento similares a las obtenidas bajo condiciones óptimas para el tipo de microorganismo, medianamente tolerantes aquellas que mostraron crecimiento con cambio en sus parámetros cinéticos (fases de adaptación extendidas, retardo en aparición de fase logarítmica, tiempos de duplicación, etc.) y no tolerantes aquellas que no desarrollaron crecimiento.

La tolerancia a acidez se evaluó mediante el crecimiento de las cepas a diferentes niveles de pH (2, 5 y 7). En general, solamente algunas cepas del género *Lactobacillus* mostraron buena tolerancia en los tres valores de pH considerados, además de una cepa de *Lactococcus lactis*. *Pediococcus* fue el género que menor tolerancia presentó ante condiciones de acidez (pH 2 y 5), mientras que algunas cepas de *Lactococcus* se desarrollaron mejor en valores bajos de pH respecto al crecimiento que exhibieron a pH 7.

Respecto a la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl, nuevamente algunas cepas de *Lactobacillus* mostraron de mediana a buena tolerancia ante concentraciones de hasta 7% de NaCl; no obstante, las cepas más halotolerantes correspondieron a los géneros *Enterococcus* y *Lactococcus*. Estas últimas también fueron las que mejor tolerancia a crecimiento a 20 °C, valor que se encuentra por debajo de la temperatura óptima de crecimiento para este tipo de microorganismos, aunque no mostraron buena adaptación y crecimiento a 45 °C, temperatura superior a la óptima. A 45 °C, algunas cepas de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* son las que mostraron curvas de crecimiento similares a la obtenida bajo condiciones óptimas de incubación.

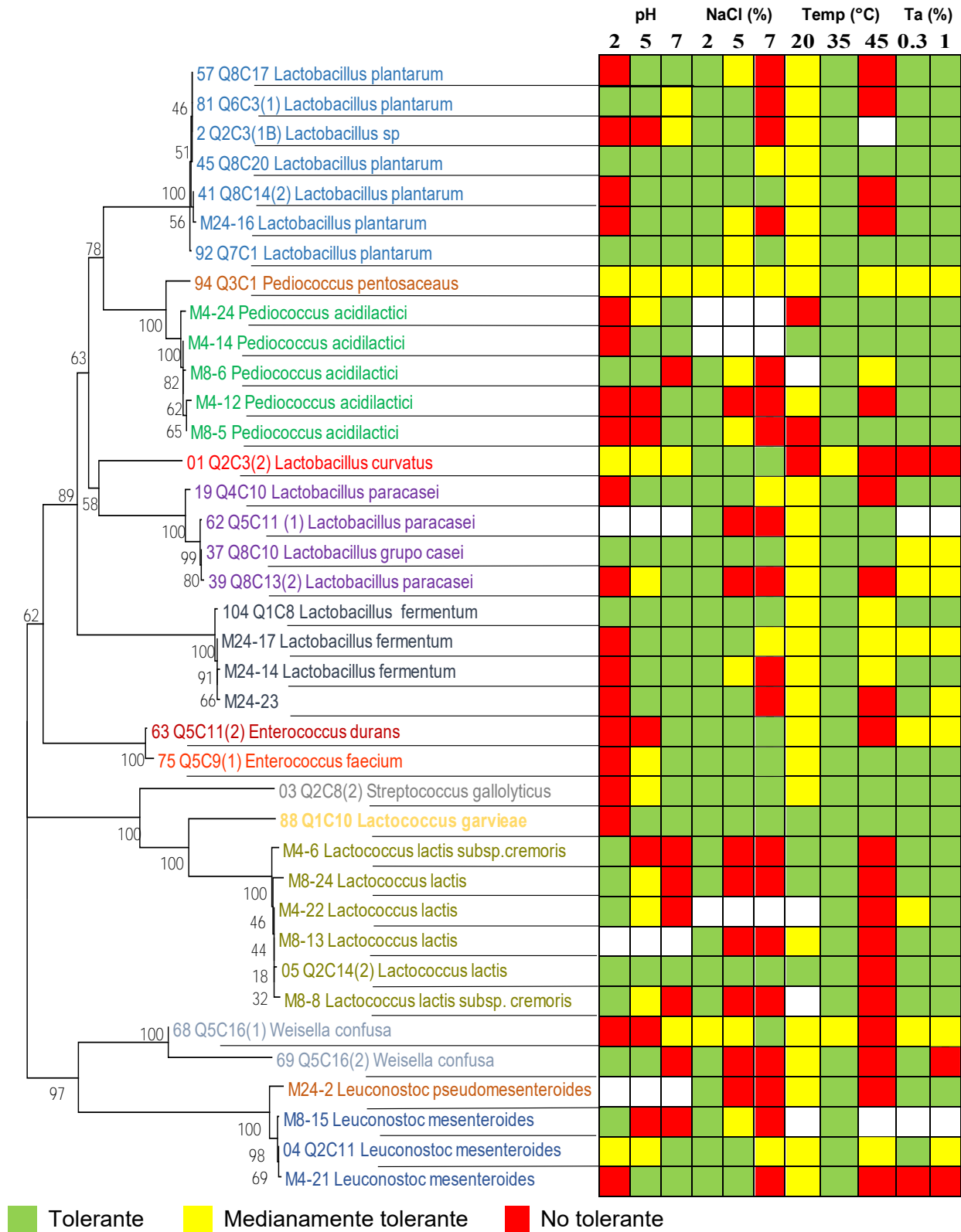


Figura 5.1 Crecimiento de BAL autóctonas de queso Adobera artesanal de los Altos de Jalisco bajo diferentes condiciones de estrés

Finalmente, la gran mayoría de las cepas mostró buena tolerancia a la presencia de sales biliares, tanto a concentración de 0.3% como de 1% de taurocolato de sodio; con excepción de *Lactobacillus curvatus*, *Weisella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*, que no exhibieron tolerancia a sales biliares.

Respecto a la capacidad de auto-agregación, una propiedad que las bacterias a utilizar como probiótico deben exhibir, puesto que, parece ser indispensable para garantizar la capacidad de adhesión de las cepas a células epiteliales o mucosas, osciló entre 16 y 70% de autoagregación, aunque es importante mencionar que no se observó autoagregación en un par de cepas evaluadas. Esto da paso a la evaluación de la capacidad de adhesión a mucina porcina, uno de los principales constituyentes de la mucosa intestinal.

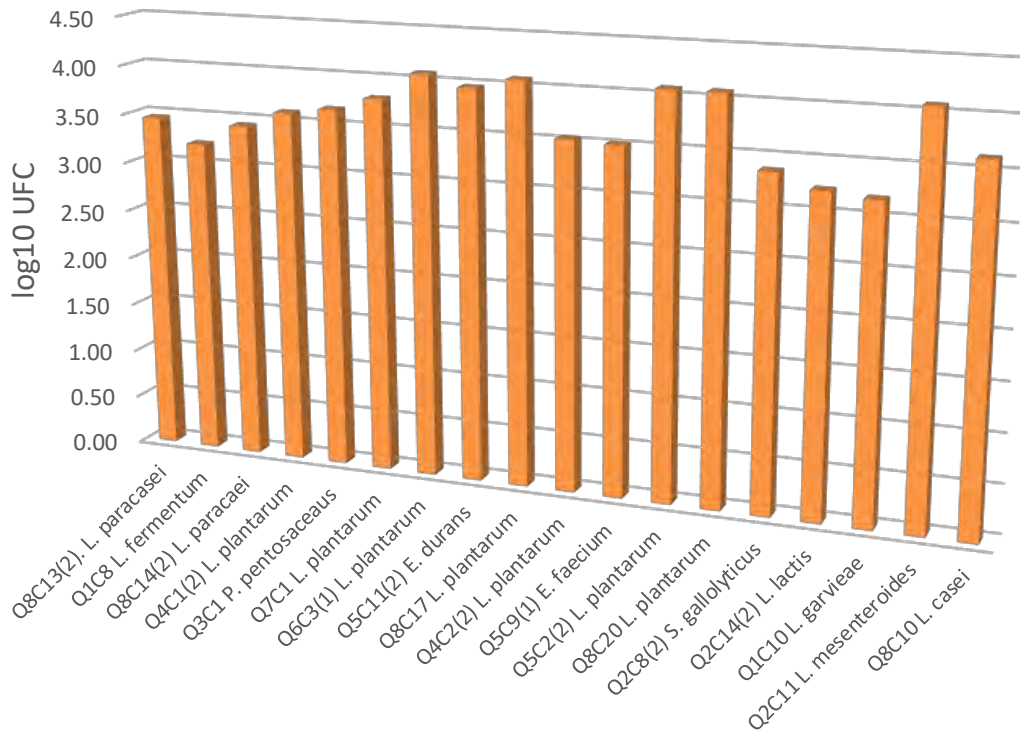


Figura 5.2 Adhesión a mucina porcina exhibida por bacterias ácido lácticas aisladas a partir de queso Adobera de los Altos de Jalisco. El resultado expresa la cantidad de bacterias (log₁₀ UFC) adheridas a partir de una suspensión bacteriana de 7.9 log₁₀ UFC/ml

Para esta propiedad, las cepas evaluadas exhibieron una buena capacidad de adhesión (Fig. 5.2), que osciló entre 3.2 y 4 log₁₀ UFC/cm² a partir de una suspensión bacteriana ajustada a una concentración aproximada de 7.9 log₁₀ UFC/ml y depositada sobre la mucina depositada en microplaca.

La acumulación de aminoácidos libres a través de la inoculación y fermentación por 24 horas de leche descremada estéril a 37 °C, se utilizó como un indicador de la capacidad proteolítica de las cepas de BAL. Los resultados (Fig. 5.3) mostraron que todas las cepas mostraron buena capacidad proteolítica, principalmente cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*.

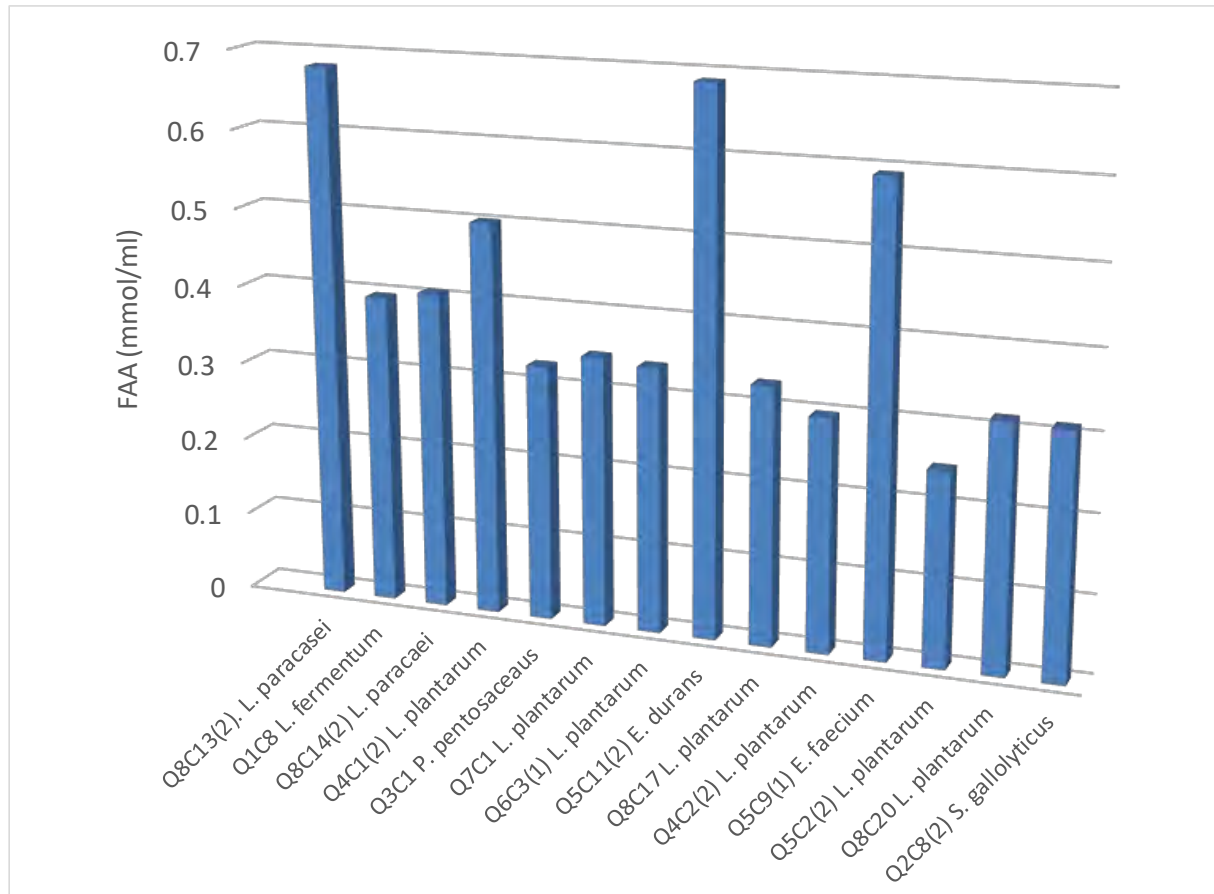


Figura 5.3 Capacidad proteolítica de cepas de BAL aisladas a partir de queso Adobera de los Altos de Jalisco, expresada como acumulación de aminoácidos libres durante la fermentación de leche descremada esteril

Finalmente se evaluó la capacidad de las BAL para producir bacteriocinas y/o compuestos que favorezcan la inhibición del crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (Fig. 5.4).

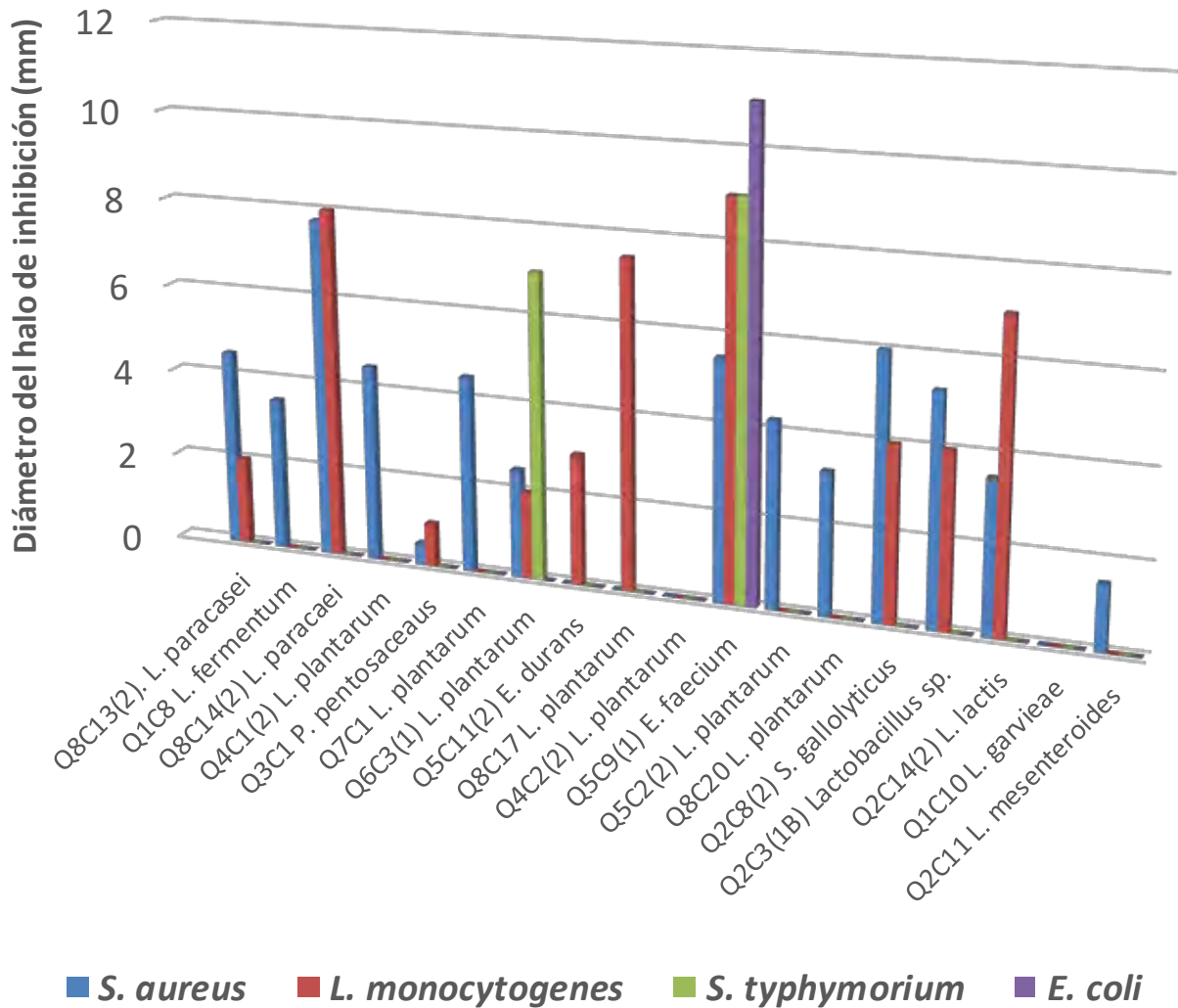


Figura 5.4 Inhibición de microorganismos patógenos mediante su crecimiento en presencia del sobrenadante libre de células de cultivo de BAL autóctonas de queso Adobera de los Altos de Jalisco

La mayoría de las cepas exhibió capacidad de inhibición sobre *Staphylococcus aureus*, efecto más marcado en cepas de *Lactobacillus*. No obstante, *Enterococcus faecium* Q5C9(1) fue la cepa que mayor espectro de inhibición mostró, con capacidad de inhibición sobre los cuatro microorganismos patógenos incluidos en el estudio (*S. aureus*,

L. monocytogenes, *E. coli* y *S. typhimorium*), lo que, sumado al comportamiento mostrado en las evaluaciones consideradas para determinar su perfil probiótico, la ubica como una de las cepas con mejor perfil para ser considerada como microorganismo potencialmente probiótico.

La evaluación *in vitro* demuestra que cepas de BAL aisladas de queso Adobera podrían tener la capacidad de sobrevivir condiciones encontradas a nivel del tracto gastrointestinal, además de adherirse y proliferar en el intestino. Desde un punto de vista biotecnológico, el comportamiento *in-vitro* de las cepas también ofrece información sobre las aptitudes tecnológicas de cada cepa, lo que puede ser aprovechado para acentuar características específicas del producto, mejorar su calidad e incluso diseño de nuevos productos, aplicaciones y procesos de fermentación. Diversos estudios se han orientado al aislamiento de este tipo de bacterias a partir de diferentes matrices (alimenticias y no alimenticias) y evaluar su desempeño tanto *in-vitro* como *in-vivo* para establecer su potencial probiótico. Por ejemplo, un estudio conducido en 2012 por [Monteagudo-Mera et al.](#), demostró que algunas cepas de *Lactococcus* que son comúnmente utilizadas como cultivo iniciador en diversas fermentaciones alimenticias, pueden además exhibir propiedades para ser consideradas microorganismos probióticos, incluida buena capacidad de adhesión a líneas celulares de carcinoma humano.

La forma en que se evalúan tanto el perfil como el efecto probiótico de los microorganismos se ha diversificado, y ha ido desde tener un perfil general del potencial probiótico ([Jacobsen et al. 1999](#)) hasta contar con evidencia de actividades específicas y el impacto que tiene su uso, como es en el caso del impacto que el uso de probióticos tiene sobre el perfil lipídico en adultos con hipercolesterolemia y se ha establecido que la ingesta de este tipo de microorganismos reduce los niveles de colesterol total y colesterol de lipoproteínas de baja densidad en pacientes con este padecimiento, además de que este efecto fue mayor a través del uso prolongado del probiótico y en pacientes jóvenes ([Rui Mo et al. 2019](#)).



La inclusión de estos probióticos en productos lácteos ha sido también estudiada, con orientación hacia identificar el impacto que su uso puede tener sobre las características del producto final que los contenga. En productos como queso crema reducido en grasa, por ejemplo, su uso en concomitancia con otros ingredientes funcionales, sugiere que mejora el sabor del producto, a través de una mayor acumulación de compuestos como cetonas y aldehídos (Ningtyas et al. 2019).

Los géneros bacterianos evaluados en este estudio, incluye géneros comúnmente estudiados y aprovechados como probióticos, como es el caso de *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Otros, por el contrario, como son *Weisella*, *Lactococcus* y *Pediococcus*, han sido menos explorados; no obstante, bajo la premisa de que el potencial probiótico es cepa-dependiente, algunas cepas de estos géneros también han sido reportadas como potencialmente probióticas.

Lactobacillus, a parte de ser el grupo de bacterias con más antigüedad desde su descubrimiento, es el más ampliamente utilizado como probiótico y, los beneficios que exhiben bacterias de éste género incluye el mantenimiento del balance de la microbiota intestinal durante la exposición a antibióticos, su uso como coadyuvante en el tratamiento de diarrea tipo infecciosa, intolerancia a la lactosa, alergias, cáncer y mejora de la respuesta inmune. Como tratamiento preventivo además puede evitar diarrea asociada al uso de antibióticos y *Clostridium difficile*, inflamación de intestino y enfermedad de Crohn (Hickson et al. 2007, Verna et al. 2010, Kechagia et al. 2013, Das et al. 2019).

Por su parte, *Enterococcus* es un género de bacterias reconocido por ser parte de la microbiota comensal tanto de humanos como animales y que comúnmente se encuentra en productos lácteos (principalmente queso). Ha sido ampliamente reconocido por su capacidad para producir bacteriocinas que inhiben la proliferación de bacterias, lo que podría explicar el espectro de inhibición de patógenos observado en este estudio. No obstante, este género bacteriano se considera como un patógeno oportunista y se ha asociado a algunas infecciones nosocomiales, por lo que algunos estudios se han enfocado a evaluar aspectos relacionados con la seguridad en su uso como probiótico o

cultivo iniciador, lo que ha demostrado en algunos casos que cepas de *Enterococcus* resultan inocuas y buenos candidatos a ser utilizados como probióticos (Ben Braïek et al. 2018). No obstante, el seguimiento en la investigación de cepas potencialmente probióticas es importante considerar aspectos relacionados con la seguridad para ser utilizados como probióticos, tanto para humanos como animales.

Weisella, un género menos explorado como probiótico, ha tomado relevancia, sobre todo para su uso como probiótico en la suplementación de animales. Por ejemplo, mediante ensayos *in vitro* se evaluaron cuatro cepas de *Weisella confusa* aisladas de heces equinas, con lo que se destacó la capacidad de las cepas para evitar el crecimiento de cuatro microorganismos patógenos (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pasterurella multocida*), además de una buena tasa de eliminación de radicales libres y resistencia a los antibióticos de uso en equinos más comunes, lo que soporta la hipótesis de que cepas de este género bacteriano podría exhibir cualidades para ser aprovechadas como probióticos (Xia et al. 2019).

Por su parte, *Lactococcus*, uno de los géneros más utilizados como cultivo iniciador para la elaboración de queso y otros derivados lácteos, ha sido considerado para su evaluación como probiótico. Los estudios son escasos y aún contradictorios, puesto que algunos resultados indican que cepas de *L. lactis* aisladas a partir de leche cruda y granos de kefir no cumplen con todos los requisitos para establecer un potencial probiótico (Yerlikaya 2018), mientras que cepas aisladas a partir de carpa común (*Cyprinus carpio* L.) mostraron características para ser consideradas como probióticos en acuicultura (Feng et al. 2019). Específicamente en este estudio, de las cepas de *Lactococcus lactis* evaluadas, al menos una cumple con buena parte de los requisitos para ser considerada como probiótico, aunque resulta importante reforzar los resultados con algunas otras evaluaciones como son determinar su capacidad acidificante y resistencia a antibióticos, sobre todo para establecer el perfil propio de la cepa y las aplicaciones potenciales de la misma.

Conclusiones

El queso Adobera de los Altos de Jalisco es una fuente importante de bacterias ácido-lácticas. El perfil probiótico de cepas de BAL autóctonas de queso Adobera de los altos de Jalisco reveló que algunas de estas bacterias muestran capacidades suficientes para ser consideradas como microorganismos potencialmente probióticos. Cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* mostraron mejor desempeño en las evaluaciones, tanto en lo referente a tolerar las diferentes condiciones de estrés (como fue lo exhibido por *Lactobacillus plantarum* Q8C20), como en lo que respecta a propiedades de adherencia como un indicador de la capacidad de colonizar mucosas gastrointestinales, actividad proteolítica y producción de bacteriocinas y sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos; sobre todo lo mostrado por los sobrenadantes de *Enterococcus faecium* Q5C9(1) que presentaron el espectro de inhibición más amplio. Los resultados sugieren que gran parte de las cepas evaluadas podrían ser aprovechadas como cultivos iniciadores para ser incluidas en la elaboración del queso Adobera y otros procesos de fermentación, así como para mejorar la calidad del producto, aumentar su valor agregado y funcionalidad, y protegerlo contra la proliferación de microorganismos indeseables.

Referencias

- Ahn H., Kim J. y Kim W. J. (2017) Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. Food Control 80:59-66. [10.1016/j.foodcont.2017.04.022](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.022).
- Alliance Animal Health. (2009) Direct Fed Microbial: Application and Usage. Boletín técnico. Archer Daniels Midland Company, Decatur, IL.
- Amorocho C. C. M. (2011) Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Tesis doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M. R., Arés I. y Aránzazu M. M. (2016) Prebiotics and Probiotics: An Assessment of Their Safety and Health Benefits. En Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics Bioactive Foods in Health Promotion (Ross W. R., Preedy V. R., eds.) Academic Press.
- Bai S. P., Wu A. M., Ding X. M., Lei Y., Bai J., Zhang K. Y. y Chio J. S. (2013) Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. Poultry Sci. 92(3):663-70. DOI: 10.3382/ps.2012-02813.
- Barba-Vidal E., Martín-Orúea S. M. y Castillejos L. (2019) Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. 223:84-96. DOI: 10.1016/j.livsci.2019.02.017.
- Beeman K. (1985) The effect of *Lactobacillus* spp on convalescing calves. Agri-practice 6:8-10.
- Ben Braïek O., Morandi S., Cremonesi P., Smaoui S., Hani K. y Ghraïri T. (2018) Biotechnological potential, probiotic and safety properties of newly isolated enterocin-producing *Enterococcus lactis* strains. LWT 92:361–370. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.045.
- Das D. J., Shankar A., Johnson J. B. y Thomas S. (2019) Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. Nutrition, 110567. DOI:10.1016/j.nut.2019.110567.
- De Melo P. V G., de Oliveira C. B., Magalhães J. A. I., Thomaz-Soccol V., Ricardo S. C. (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Biotechnol Adv. 36:2060–2076. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.003.
- Edalati E., Saneei B., Alizadeh M., Hosseini S. S., Zahedi B. A. y Taheri K. (2018) Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. New Microbe and New Infect. 27: 64–68. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.11.008.

- FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Feng J., Chang X., Zhang Y., Yan X., Zhang J. y Nie G. (2019) Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immun* 93:73-81. DOI:10.1016/j.fsi.2019.07.028
- Georgieva R., Iliev I., Haertle T., Chobert J. M., Ivanova I. y Danova S. (2009) Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int Dairy J.* 19:(696-702). DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.06.006.
- Ghorbani G. R., Morgavi D. P., Beauchemin K. A. y Leedl J. A. Z. (2002) Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J Anim Sci.* 80:1977–1985. DOI: [10.2527/2002.8071977x](https://doi.org/10.2527/2002.8071977x).
- Hickson M., D'Souza A. L., Muthu, N., Rogers, T. R., Want, S., Rajkumar, C., & Bulpitt, C. J. (2007). Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 335(7610):80. DOI:10.1136/bmj.39231.599815.55
- Jacobsen C. N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A. E., Møller P. L., Michaelsen K. F., Paerregaard A., Sandström B., Tvede M. y Jakobsen M. (1999) Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 65(11):4949-56.
- Kalebish C. C. y Cardoso F. C. (2017) Effects of Direct-Fed Microbials on Feed Intake, Milk Yield, Milk Composition, Feed Conversion, and Health Condition of Dairy Cows. En: *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (Ross W. R., Collier R. J. y Preedy V. R., eds) Academic Press. Pp 111-121.
- Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N. y Fakiri E. M. (2013) Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition* 1–7. DOI:10.5402/2013/481651
- Kirjavainen P. V., Ouwehand A. C., Isolauri E. y Salminen S. J. (1998) The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 167:185–189.
- Knutton S., Baldwin T., Williams P. H. y McNeish A. S. (1989) Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun* 57:1290–1298.



- Krehbiel C. R., Rust S. R., Zhang G. y Gilliland S. E. (2003) Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *J Anim Sci.* 81:E120–E132. DOI: 10.2527/2003.8114_suppl_2E120x.
- Lourens-Hattingh A., Viljoen B.C. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J.* 11(1–2):1–17. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00036-X
- Luan S. (2014) Effects of Nutritional Strategies on Rumen Environment and Performance in Dairy Cows (MS thesis). University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Maldonado N. C., Ficooseco C. A., Mansilla F. I., Melián C., Hébert E. M., Vignolo G. M. y Nader-Macías M. E. F. (2018) Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livestock Science* 212:99–110. DOI: [10.1016/j.livsci.2018.04.003](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.04.003).
- McAllister T. A., Beauchemin K. A., Alazzeah A. Y., Baah J., Teathe R. M. y Stanford K. (2011) Review: the use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Can J Anim Sci.* 91:1–19. DOI: 10.4141/cjas10047.
- Mo R., Zhang X. y Yang Y. (2019) Effect of probiotics on lipid profiles in hypercholesterolaemic adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicina Clínica* 152(12):473–481. DOI:10.1016/j.medcle.2018.09.013
- Monteagudo-Mera A., Rodríguez-Aparicio L., Rúa J., Martínez-Blanco H., Navasa N., García-Armesto M. R. y Ferrero M. Á. (2012) In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J Funct Foods* 4(2):531–541. DOI:10.1016/j.jff.2012.02.014
- Ningtyas D. W., Bhandari B., Bansal N. y Prakash S. (2019). Flavour profiles of functional reduced-fat cream cheese: Effects of β -glucan, phytosterols, and probiotic *L. rhamnosus*. *LWT* 105:16–22. DOI:10.1016/j.lwt.2019.01.063.
- Raabis S., Li W. y Cersosimo L. (2018) Effects and immune responses of probiotic treatment in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol.* 208:58-66. DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.12.006.
- Ramírez-López y Vélez-Ruiz J. F. (2016) Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información Tecnológica* 27(6):115-128. DOI:10.4067/S0718-07642016000600012.
- Sánchez L., Tromps J. 2014. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Comunicación corta. Rev. Salud Anim.* 36(2):124-129.
- Seo J. K., Kim S. W., Kim M. H., Upadhaya S. D., Kam D. K. y Ha J. K. (2010) Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian Australas J Anim Sci* 23:1657–1667. DOI: 10.5713/ajas.2010.r.08.



- Verna E. C. y Lucak S. (2010) Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Ther Adv Gastroenter* 3(5):307–319. DOI: 10.1177/1756283x10373814.
- Vinderola G., Burns P. y Reinheimer J. (2017) Probiotics in Nondairy Products. En: *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention* (Mariotti F., ed.) Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-803968-7.00044-7.
- Wick C., Nienaber U., Anggraeni O., Shellhammer T. H. y Courtney P. D. (2004) Texture, proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial cheddar cheeses treated with high pressure. *J Dairy Res* 71(1):107-15. DOI: [10.1017/s0022029903006587](https://doi.org/10.1017/s0022029903006587).
- Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H., 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer US, Boston, MA. DOI: [10.1007/978-1-4615-5817-0](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0).
- Xia Y., Qin S. y Shen Y. (2019) Probiotic potential of *Weissella* strains isolated from horse feces, a probable equine probiotic. *Microbial Path* 32:117-123. DOI:10.1016/j.micpath.2019.04.032.
- Yerlikaya O. (2018) Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *J Dairy Sci* 102(1):124-134. DOI:10.3168/jds.2018-14983

CAPITULO VI.

BIOTECNOLOGÍA Y BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS: APROVECHAMIENTO DE BAL AUTÓCTONAS DE QUESO ADOBERA ARTESANAL

Uso de bacterias ácido-lácticas para descontaminación de estiércol Porcino Mediante Ensilaje Experimental

Rev. Int. Contam. Ambie. 35 (1) 247-257, 2019
DOI: 10.20937/RICA.2019.35.01.18

José Martín Ruvalcaba-Gómez^{2,3}, Ramón Ignacio Arteaga-Garibay^{1*}, Gerardo Domínguez-Araujo³, Alberto Jorge Galindo-Barboza³, Gerardo Salazar-Gutiérrez³, Marcos Daniel Martínez-Peña¹, Raúl Jacobo Delgado-Macuil²

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad 400, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600

² Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla, km 1.5, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

³ Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad 2470, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, C.P. 47600.

† Los autores informan del sensible fallecimiento de Marcos Daniel Martínez Peña, ocurrido poco antes de la publicación de este artículo.

* Autor de correspondencia: arteaga.ramon@inifap.gob.mx

(Recibido junio 2017; aceptado abril 2018)

Palabras clave: ensilaje, cerdaza, fermentación ácido-láctica, descontaminación

Resumen

La actividad porcina genera diariamente una gran cantidad de residuos conformados por nutrientes y microorganismos que potencialmente contribuyen a la contaminación de agua, aire y suelos, y la subsecuente generación de olores desagradables. Diversas estrategias se han desarrollado para mitigar el efecto contaminante de las excretas porcinas y aprovechar sus nutrientes; tal es el caso del ensilaje, que consiste en la fermentación de la excreta. En este estudio se evaluó el efecto del ensilaje del estiércol porcino, adicionado con dos fuentes diferentes de carbohidratos y dos fuentes de bacterias ácido-lácticas, sobre la reducción de diferentes grupos de microorganismos. Durante el proceso se observó la disminución del pH (hasta 4.6) y la

carga microbiana, sobre todo para organismos coliformes (reducción mayor a 5 logaritmos) y hongos y levaduras, así como la eliminación total del grupo de enterococos; mientras que el contenido de BAL, principales responsables de la fermentación, permaneció constante. Los mejores resultados se observaron mediante el uso de sorgo como fuente de carbohidratos en combinación con suero de leche, sub-producto de la elaboración de queso, como fuente de bacterias ácido-lácticas, tanto en disminución de pH como en la reducción de algunos indicadores microbiológicos, incluidas las bacterias productoras de ácido sulfhídrico. Mediante el ensilaje del estiércol porcino se favorece la disminución del pH por acción de las bacterias ácido-lácticas a niveles que limitan la sobrevivencia de microorganismos asociados a contaminación fecal, y lo transforma en un producto seguro, desde la perspectiva microbiológica, para su manejo y posible aprovechamiento subsecuente.

Key words: Silage, pig manure, lactic-acid fermentation, decontamination.

Abstract

Swine production generates every day a large amount of residues, including nutrients and microorganisms, which potentially contribute to contamination of air, water and soil, and generation of unpleasant odors. Many strategies have been developed in order to mitigate the contaminant effect of swine manure and to take advantage of its nutrients and beneficial compounds; silage is an example of these, and consists in swine manure fermentation mainly under anaerobic conditions. The aim of this study was to assess the effect of applying a process of silage to swine manure added with two different sources of carbohydrates and two different sources of lactic-acid bacteria, under the reduction of different microbiological indicators. Through the process, it was observed the reduction of pH levels (until reaching 4.6) and microbial content, mainly for coliforms (reduction greater than 5 log), molds and yeasts; and total elimination of enterococci. On the other hand, significant decline was not reported for the lactic-acid bacteria content, main responsible of fermentation process. Best results were observed through using sorghum as a source of carbohydrates and cheese whey as a source of lactic-acid bacteria, for both, decrease of pH and reduction of some microbiological indicators, including bacteria that produce sulfuric acid. Therefore, silage process, applied to swine manure, induces the decrease

of pH for action of lactic-acid bacteria until limit the survival of bacteria associated with fecal contamination, making of swine a transformed and microbiologically safe residue for its handling and subsequent use.

Introducción

La producción de carne de cerdo en México es de aproximadamente 1 291 000 t al año y en su mayoría se concentra en los estados de Jalisco, Sonora, Guanajuato, Puebla, Yucatán y Michoacán (SAGARPA 2014). Asociado a la producción de carne, la actividad porcina genera diariamente una cantidad importante de desechos en sus unidades de producción, principalmente estiércol, cuyo manejo representa un gran reto para los productores. Se ha reportado que la excreción fecal en cerdos puede ser de hasta 1.35 kg de material fresco por cada kg de materia seca ingerida, con un promedio de 25% de contenido de materia seca y alrededor de 70% de materia orgánica (Martínez et al. 2004). No obstante, la cantidad y composición del estiércol porcino dependerá de factores como el fin zootécnico, edad de los animales, tipo de alimentación y condiciones de confinamiento (Sánchez y González 2005). Las excretas pueden contener una cantidad significativa de compuestos bioquímicos con posibles aplicaciones, incluidas la nutrición animal (Borges-Gómez et al. 2003, Bórquez et al. 2009, Bulkowska et al. 2012, Moset et al. 2014), que favorecen el mantenimiento y proliferación de una importante carga de microorganismos propios de este tipo de residuos.

La microbiota del estiércol incluye diversas especies, principalmente de los géneros *Escherichia*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, algunos hongos y levaduras, e incluso algunos virus (Sahlström et al. 2008, Masse et al. 2011, Zhang et al. 2011). La combinación de nutrientes y microorganismos en el estiércol porcino, además el deficiente manejo, ha provocado que la producción de cerdos contribuya con hasta un 13% a la emisión de gases y compuestos de efecto invernadero (GyCEI) a nivel mundial (707 000 t de gases como CO₂, CH₄ y NO₂ (Steinfeld et al. 2006, FAO 2013a, FAO 2013b, Philippe y Nicks 2015). En México, simultáneamente, se ha reportado que la actividad porcina genera alrededor de 16 000 t diarias de estiércol y la mayoría son arrojadas a tierras de cultivo, cauces de ríos y drenajes municipales (García



et al. 2010), lo que contribuye a la contaminación de mantos acuíferos y otros recursos naturales.

Con el objetivo de mitigar el daño ambiental que puede provocar la excreta porcina, se han realizado diferentes estudios para evaluar los efectos del uso de procesos orientados a la descontaminación de este residuo. Procesos como la fermentación, acidificación y pasteurización, han mostrado reducir la carga microbiana del estiércol porcino, además de que algunos de estos procesos favorecen la obtención de biogás y biofertilizantes. (Hiriart 1984, Caballero-Hernández et al. 2004, López et al. 2008, Moset et al. 2014). Una de las alternativas que ha resultado factible para el tratamiento del estiércol porcino es el proceso de ensilaje (Castellanos-Aceves et al. 2010, Galindo-Barboza et al. 2012).

Originalmente, el ensilaje se definió como la fermentación láctica de materiales vegetativos y fue desarrollado como un método de conservación de forrajes bajo condiciones de anaerobiosis (Hiriart 1984, Muck 2010). Mediante el ensilaje se controla la actividad microbiana para inducir la fermentación de carbohidratos por las bacterias ácido-lácticas (BAL), con o sin el uso de aditivos; lo que favorece las transformaciones bioquímicas para el aprovechamiento de los productos (Hiriart 1984, Muck 2010). El mayor efecto de conservación de los nutrientes mediante el ensilaje se logra a través de la disminución de pH, que puede reducir los valores hasta 4.5 - 5.0, lo que limita la sobrevivencia de microorganismos competidores de las BAL (Hiriart 1984, Muck 2010). El proceso de ensilaje no es exclusivo para materiales vegetales, debido a que cualquier producto con suficientes carbohidratos fermentables puede ser ensilado (Herrera et al. 2015).

Específicamente para el tratamiento de estiércol porcino, se ha adecuado el proceso de ensilaje y actualmente se sabe que el producto resultante puede ser aprovechado como ingrediente alternativo de bajo costo en la alimentación de animales (Castellanos-Aceves et al. 2010). Su uso en la suplementación de animales, como vacas en lactación o cerdos en producción, se ha hecho sin mostrar disminución de la productividad o calidad de los productos (Smith et al. 2005, Sahlström et al. 2008, , Ruvalcaba et al. 2011a, Ruvalcaba

et al. 2011b, Zhao et al. 2013). Sin embargo, resulta necesario ampliar los esquemas de evaluación para procesos como el ensilaje de excretas, principalmente para generar evidencias científicas sobre la calidad e inocuidad del producto que se obtiene, con la finalidad de hacer más eficiente su aprovechamiento y/o tratamientos posteriores.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del proceso de ensilaje sobre la reducción de la carga microbiana del estiércol porcino a través de la monitorización de diferentes grupos indicadores de microorganismos y cambios en el pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microsilos experimentales

Para el experimento se colectó estiércol fresco (menos de 24 horas) de cerdos en etapa de crecimiento-desarrollo, de una explotación porcina de tipo intensivo ubicada en el municipio de Tepatitlán de Morelos en Jalisco, el cual se utilizó para preparar los microsilos experimentales. En el estudio fueron considerados cuatro tratamientos y un grupo control; cada tratamiento (Cuadro 6.1) consistió en una combinación de estiércol fresco (85 % para tratamientos T1 y T2; 91.5 % para tratamientos T3 y T4), una fuente de BAL como promotores de la fermentación y un ingrediente con alto contenido de carbohidratos.

Tabla 6.1 Formulación de los silos experimentales

Ingrediente	Tratamiento				Control
	T1	T2	T3	T4	
	Proporción (%)¹				
Estiércol de cerdo	89.5	89.5	91.5	91.5	100
Sorgo molido	10	10	0	0	0
Melaza	0	0	8	8	0
Suero de quesería	0.5	0	0.5	0	0
Bio-sile™	0	0.5	0	0.5	0

¹Los porcentajes están calculados en base al peso final del microsililo en base húmeda.

El ingrediente rico en carbohidratos correspondió a 10 % peso/peso (p/p) de sorgo para los tratamientos T1 y T2 y, 8 % p/p de melaza con 71 – 82 % de azúcares (CONADESUCA



2016) para los tratamientos T3 y T4. La fuente de BAL consistió en un inóculo comercial denominado Bio-sile™ para los Tratamientos T2 y T4 (0.5 % p/p; *L. plantarum* y *P. pentosaceus*, 9×10^9 UFC/g; Hansen, U.S.A), mientras que la segunda consistió en suero de leche, obtenido como subproducto de la elaboración de queso artesanal (Tratamientos T1 y T3, 0.5 % peso/volumen). Paralelamente, a partir del suero de leche se recuperaron diferentes aislamientos bacterianos mediante discriminación morfológica colonial en medios de cultivo selectivos para su posterior crio-conservación, identificación y caracterización (información no incluida, artículo en proceso). Como control negativo se utilizó estiércol de cerdo sin la adición de una fuente de carbohidratos, ni de bacterias ácido-lácticas. Los microsilos fueron construidos en recipientes de polipropileno estériles de 2.5 L de capacidad con tapa hermética, en los cuales se depositaron las mezclas correspondientes a cada uno de los tratamientos. Para cada tratamiento se prepararon tres microsilos (repeticiones) y se mantuvieron incubados a 25 °C durante 21 días.

Toma de muestras

Las muestras del interior de cada uno de los microsilos, fueron tomadas diariamente para la determinación de pH y a los días 0, 10 y 21 de tratamiento para la evaluación microbiológica. Las muestras fueron colectadas en condiciones asépticas mediante el uso de sacabocados estériles para evitar la ruptura del sello superficial del microsililo y las condiciones del mismo.

Cambios en el pH de la excreta

Para la medición de pH se tomaron 10 g de muestra y se diluyeron en 50 ml de agua destilada estéril. El pH fue determinado a partir del sobrenadante obtenido por gravedad, a través del uso de un potenciómetro portátil marca Hanna® modelo HI 98127. La medición se llevó a cabo por duplicado (Sadzawka et al. 2005).

Evaluación microbiológica

A partir de diluciones decimales seriadas de las muestras en agua estéril, se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de bacterias mesofílicas aerobias (BMA), hongos y levaduras (HyL), enterococos (ENT), y bacterias ácido-lácticas (BAL). También se determinó la cuenta de organismos coliformes (pruebas presuntiva y confirmativa, OCTP y OCTC respectivamente), organismos coliformes fecales (OCF) y bacterias productoras de ácido sulfhídrico (BPAS) por la técnica del



número más probable (NMP/g). Además, se realizó la búsqueda de cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Pérez et al. 2013).

Análisis estadístico

El diseño experimental consistió en un experimento completamente al azar y los datos obtenidos de los análisis microbiológicos se transformaron a valores base \log_{10} . La matriz de datos fue analizada en el paquete estadístico SASTM ver. 9.3 (SAS Institute Inc. 2012). Se emplearon los procedimientos de: modelo general lineal (GLM), univariate y análisis de varianza (ANDEVA); se utilizó un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y se complementó el análisis de varianza con la comparación de medias entre tratamientos con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Adicionalmente, se efectuaron análisis de asociación (chi cuadrado) y correlación (Pearson) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ en paquete estadístico SPSS[®] (IBM[®] Corp. 2017).

Resultados y Discusión

Disminución del pH

Uno de los indicadores más simples para evaluar el proceso del ensilaje sobre el valor nutritivo de materiales con alto contenido de humedad, es el pH. En general el valor de pH bajo en ensilados es deseable, debido a que éste indica que ha ocurrido una fermentación con producción de ácido láctico (Herrera et al. 2015). En este estudio, los resultados mostraron que el proceso de ensilaje en todos los tratamientos favoreció la disminución del pH del estiércol (Fig. 6.1).

Al inicio del proceso, los valores de pH de los tratamientos T3 y T4 fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$) a los de los tratamientos T1, T2 y el control (5.77 ± 0.12 y 5.83 ± 0.06 vs 6.93 ± 0.06 , 7.03 ± 0.06 y 6.72 ± 0.05 respectivamente). En general, el pH disminuyó en los primeros 10 días del proceso de ensilaje, con lo que alcanzó valores de pH de 4.8 ± 0.07 para los cuatro tratamientos.

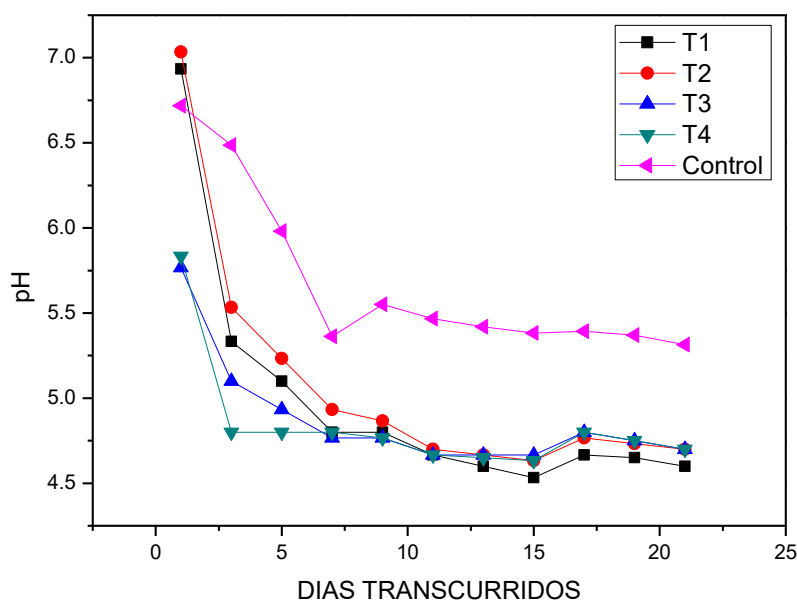


Figura 6.1 Valores de pH durante el proceso de ensilaje de cerdaza.

T1: Tratamiento 1 (Estiércol+sorgo+suero de quesería); T2: Tratamiento 2 (Estiércol+sorgo+cultivo iniciador); T3: Tratamiento 3 (Estiércol+melaza+suero de quesería); T4: Tratamiento 4 (Estiércol+melaza+cultivo iniciador); Control: Estiércol sin aditivos

A partir del onceavo día, la disminución del pH fue menor. Al final del experimento (día 21), el pH del grupo control se mantuvo superior ($\text{pH } 5.31 \pm 0.10$, $p < 0.05$) respecto a los demás tratamientos. Estadísticamente, el tratamiento T1 fue el que mayor disminución de pH registró ($\text{pH final de } 4.60 \pm 0.01$), lo que marcó una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al valor de pH de los tratamientos T2, T3 y T4 ($\text{pH de } 4.7 \pm 0.02$). Desde la perspectiva de pH, los niveles alcanzados indican que el proceso fue adecuado, debido a que se ha establecido previamente que un ensilado con humedad superior al 65 % que tiene valores de pH inferior a 4.8, es considerado un ensilado de buena calidad (Herrera et al. 2015).

Evaluación microbiológica

Al inicio del estudio, todos los tratamientos se encontraron en igualdad de condiciones referente al contenido de bacterias para la mayoría de los grupos indicadores incluidos. Los grupos en mayor abundancia al inicio del proceso fueron los ENT ($8.38 \pm 0.56 \log_{10}$ UFC/g) y BAL ($8.7 \pm 0.22 \log_{10}$ UFC/g), seguidos por los OCT y OCF ($6.7 \pm 0.32 \log_{10}$ NMP/g), BMA ($6.6 \pm 0.54 \log_{10}$ UFC/g) y las BPAS ($6.19 \pm 0.57 \log_{10}$ UFC/g) (Fig. 6.2, Cuadro 6.2). El indicador en menor proporción al inicio del experimento fue HyL ($3.61 \pm 0.46 \log_{10}$ UFC/g). Solo se registraron diferencias estadísticas entre tratamientos al inicio del proceso para los contenidos de ENT y BAL ($p < 0.05$).

Los efectos de la fermentación ácido-láctica se observaron desde el día 10 de la monitorización, debido a que en ese tiempo se registraron disminuciones importantes en el contenido de todos los grupos indicadores; en tanto que se mantuvo elevada la proporción de BAL (entre 6.5 y $7.5 \pm 0.31 \log_{10}$ UFC/g). El mayor efecto de disminución de carga microbiana se observó al final del proceso de ensilaje (día 21), donde la proporción de OCT y OCF se redujo hasta valores de entre 1 y $2 \log_{10}$ NMP/g. Mientras que los ENT habían llegado a niveles por debajo del límite de detección de los métodos utilizados. Los contenidos de BMA, HyL, BPAS y BAL al día 21, presentaron diferencias con respecto al contenido al inicio del proceso de ensilaje ($p < 0.05$), con disminuciones de entre 1 y $3 \log_{10}$ UFC/g para todos los tratamientos. Por su parte, el tratamiento T2 fue el que presentó menor proporción de HyL y BPAS al día 21.

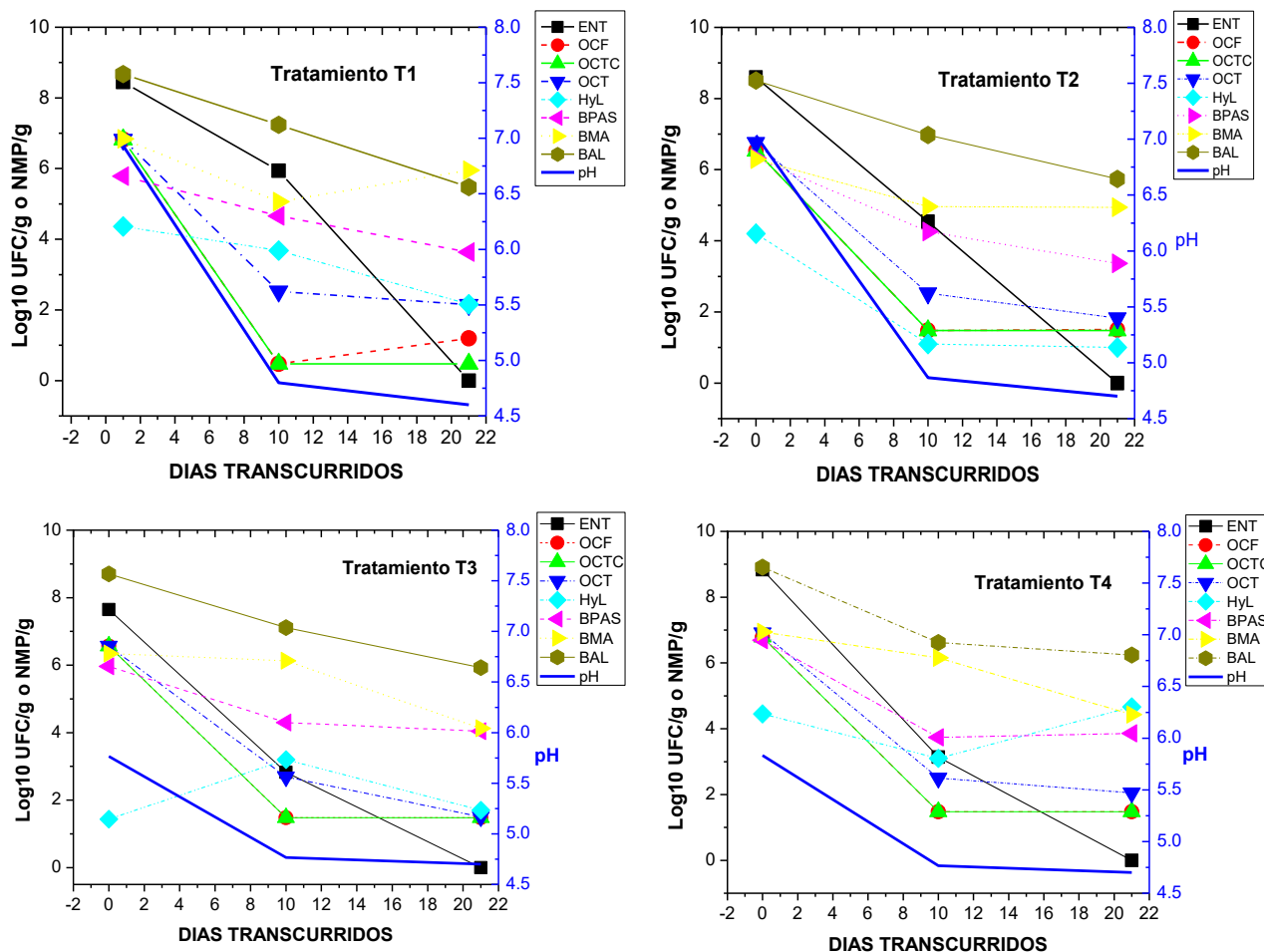


Figura 6.2 Comportamiento microbiológico del ensilado de estiércol porcino con diferentes formulaciones.

Tratamiento T1: Estiércol+sorgo+suero de quesería; Tratamiento T2: Estiércol+sorgo+cultivo iniciador; Tratamiento T3: Estiércol+melaza+suero de quesería; Tratamiento T4: Estiércol+melaza+cultivo iniciador. (OCT, OCF) Organismos coliformes totales y fecales; (H y L) Hongos y Levaduras; (ENT) Enterococos; (BPAS) Bacterias productoras de ácido-sulfhídrico; (BMA) Bacterias Mesófilas Aerobias; (BAL) Bacterias ácido-lácticas.

En términos de reducción total del contenido de bacterias, las BMA presentaron el menor nivel de reducción, y en promedio quedaron en niveles de entre 4 y 5 ± 0.89 log₁₀ UFC/g. No obstante, las BMA no podría considerarse como determinante de la inocuidad del ensilado, debido a que involucra una gama amplia de géneros bacterianos tanto aerobios como anaerobios facultativos y obligados. Niveles mayores de reducción fueron observados para OCT y OCF debido a que, al final del proceso de ensilaje, los OCT se redujeron a niveles alrededor de los 2 ± 0.35 log₁₀ NMP/g, sin mostrar diferencias

significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Por otra parte, para OCF se observó mayor reducción en el tratamiento T1 en relación al resto de los tratamientos ($p < 0.05$), con lo que se disminuyó al nivel de $0.6 \log_{10}$ NMP/g en comparación a $1.49 \log_{10}$ NMP/g para el resto de los tratamientos.

Tabla 6.2 Determinación de diferentes grupos indicadores de microorganismos durante el ensilaje de excretas porcinas.

Tratamiento	BMA ¹	H y L ¹	OCT ²	OCF ²	ENT ¹	BPAS ²	BAL ¹
	Concentración Inicial (\log_{10} UFC/g o NMP/g)						
T1	6.84 ^b	4.36 ^a	6.82 ^a	6.82 ^a	8.45 ^{a,b}	5.78 ^a	8.67 ^{a,b}
	± 0.17	± 0.32	± 0.38	± 0.38	± 0.16	± 0.51	± 0.28
T2	6.29 ^b	4.20 ^{a,b}	6.75 ^a	6.53 ^a	8.59 ^{a,b}	6.32 ^a	8.51 ^b
	± 0.87	± 0.17	± 0.49	± 0.45	± 0.38	± 0.75	± 0.08
T3	6.35 ^b	4.30 ^a	6.57 ^a	6.57 ^a	7.65 ^b	5.96 ^a	8.70 ^{a,b}
	± 0.54	± 1.5	± 0.16	± 0.16	± 0.57	± 0.37	± 0.09
T4	6.94 ^b	4.45 ^a	6.92 ^a	6.79 ^a	8.84 ^a	6.70 ^a	8.92 ^a
	± 0.08	± 0.23	± 0.22	± 0.22	± 0.12	± 0.33	± 0.22
Control	8.71 ^a	3.45 ^b	7.04 ^a	7.04 ^a	***	***	7.83 ^c
	± 0.25	± 0.05	± 0.0	± 0.0			± 0.03
Tratamiento	Concentración final (\log_{10} UFC/g o NMP/g)						
T1	5.95 ^a	3.24 ^a	2.15 ^a	1.25 ^b	0.00 ^a	3.63 ^{b,c}	5.48 ^c
	± 0.75	± 0.33	± 0.17	± 0.62		± 0.0	± 0.02
T2	4.94 ^{a,b}	1.00 ^a	1.83 ^a	1.52 ^a	0.00 ^a	3.36 ^c	5.74 ^{b,c}
	± 0.17	± 1.73	± 0.23	± 0.05		± 0.0	± 0.10
T3	4.99 ^{a,b}	1.70 ^a	1.52 ^a	1.49 ^a	0.00 ^a	4.04 ^a	5.93 ^{a,b,c}
	± 1.51	± 2.94	± 0.05	± 0.0		± 0.12	± 0.01
T4	4.43 ^{b,c}	4.66 ^a	2.06 ^a	1.49 ^a	0.00 ^a	3.86 ^{a,b}	6.24 ^a
	± 0.23	± 0.15	± 0.50	± 0.0		± 0.19	± 0.37
Control	3.56 ^c	2.11 ^a	1.49 ^a	1.49 ^a	***	***	6.04 ^{a,b}
	± 0.03	± 0.09	± 0.0	± 0.0			± 0.13

Los resultados están expresados en \log_{10} de ¹UFC o ²NMP de cada uno de los indicadores microbiológicos. ^{a, b} Medias dentro de la misma columna que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ***Información no disponible. (OCT, OCF) Organismos coliformes totales y fecales; (H y L) Hongos y Levaduras; (ENT) Enterococos; (BPAS) Bacterias productoras de ácido-sulfhídrico; (BMA) Bacterias Mesófilas Aerobias; (BAL) Bacterias ácido-lácticas.

Algo notable en todos los tratamientos es la eliminación completa de los ENT, que alcanzaron niveles no determinables al final del proceso. En contraste, las BPAS se mantuvieron presentes hasta el final del proceso, pero con reducciones considerables en las determinaciones. Este grupo de bacterias se redujo más en los tratamientos T1 y T2 en relación a lo determinado para los tratamientos T3 y T4 ($p < 0.05$). El medio de cultivo utilizado para BPAS fue medio leche-fierro, para determinar el fenómeno “fermentación tormentosa” (fermentación de la leche y fractura del cuajo), que es utilizado como prueba presuntiva para especies del género *Clostridium*, que está asociado a la producción de olores indeseables característicos del estiércol (Navarro et al. 2009). Bacterias del género *Clostridium* se han reportado como parte de la microbiota del estiércol porcino y que se caracterizan por ser anaerobios obligados, esporulados, con crecimientos en temperaturas de entre 30 y 37 °C a pH de 6.5 a 7 (Zhu 2000), lo que dificulta su eliminación. Sin embargo, la reducción determinada en el presente estudio para BPAS, podría ser un factor clave en la eliminación de malos olores, debido a que se ha reportado que las bacterias de este grupo producen compuestos complejos que contribuyen al olor pestilente característico del estiércol porcino (Zhu 2000).

Además, la hidrólisis de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos asociadas al proceso de fermentación ácido-láctica (Hansen y Schieberle 2005), se puede relacionar con cambios percibidos en el olor de la excreta durante el proceso de ensilaje, que fue menos desagradable al olfato al final del proceso. Para confirmar los cambios en las características sensoriales del estiércol, es necesario realizar estudios que incluyan la medición de compuestos asociados al olor, como es el análisis de compuestos volátiles, entre otros. Es importante mencionar que los niveles de reducción del contenido de bacterias en los tratamientos incluidos, son comparables con las reducciones reportadas mediante la aplicación de otro tipo de tratamientos. Masse et al. 2011, a través de digestión anaerobia a 24 °C, reportan reducciones de entre 2.6 y 2.9 \log_{10} tanto para OCF como para *Salmonella* respectivamente, a partir del día 7 de tratamiento y con reducciones totales a los 28 días. Sin embargo, los autores de dicha referencia reportan reducciones poco significativas para *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* spp. con

este tratamiento (entre 0 y 0.8 log₁₀); en contraste con lo obtenido en el presente estudio, donde se observó la eliminación completa de los ENT.

Otro tratamiento comparable en niveles de reducción de cuentas bacterianas en estiércol es la pasteurización. [Sahlström et al. \(2008\)](#) reportan que para eliminar los enterococos en residuos biológicos utilizados para la producción de biogás, es necesario aplicar pasteurización a 70 °C durante 30 min, con lo que además se elimina en su totalidad OCT y OCF. No obstante, a pesar de la intensidad del tratamiento, los autores reportan conteos de más de 4 log₁₀ UFC/g para *C. perfringens* posterior a la aplicación del tratamiento. Los resultados obtenidos también son comparables, e incluso superan a algunos reportes, en los que se evalúa el efecto de la acidificación a temperatura ambiente de estiércol o el uso de bio-filtros sobre la reducción del contenido de bacterias ([De la Torre et al. 2000](#), [Sahlström et al. 2008](#), [Zhang et al. 2011](#), [McCarthy et al. 2015](#)).

En contraste, sobre la presencia de BAL en todos los tratamientos, no se observó reducción significativa y al día 21, la cantidad de estos microorganismos se mantuvo en el orden de los 6 log₁₀ UFC/g. Es importante mencionar que en los tratamientos T3 y T4 se determinaron las mayores concentraciones de BAL al final del proceso, en comparación con los tratamientos T1 y T2 ($p < 0.05$). El grupo de las BAL incluye un conjunto amplio de géneros relacionados por sus características tanto morfológicas como fisiológicas, y cuya actividad principal es la producción de ácido como resultado de la fermentación de carbohidratos, por lo que son consideradas como determinantes en los ensilados ([Axelsson 2004](#)). Diversos factores, como el contenido y tipo de carbohidratos y concentración de materia seca, influyen en la prevalencia de las BAL durante la fermentación de los silos, asociado además a las características propias de estas bacterias como la osmotolerancia y su diversidad metabólica ([Woolford 1984](#), [McDonald et al. 1991](#), [Oude Elferink et al. 1999](#)). Lo observado en este estudio coincide con el comportamiento típico de las BAL en ensilados, que incluye un aumento en su concentración durante las etapas iniciales del proceso, para posteriormente disminuir a medida que el pH desciende y se limita la disponibilidad de nutrientes ([Kim et al. 2016](#), [Ni et al. 2017](#)).

Para ensilados de producción, se ha reportado que los géneros de BAL predominantes son *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, que en su mayoría son bacterias anaerobias facultativas y mesófilas, con la capacidad de acidificar el medio a niveles de pH de entre 4 y 5 (Oude et al. 1999). Adicionalmente, se ha establecido que el proceso de ensilaje de materiales vegetativos debe incluir cuatro fases principales diferenciadas: aeróbica, de fermentación, estable y de deterioro (Weinberg y Muck 1996, Merry et al. 1997). Las tres primeras fases corresponden a una disminución importante en los valores de pH, reducción de indicadores microbiológicos y aumento en la acidez, mientras que en la etapa final se deben mantener los niveles de BAL y de acidez, para poder así realizar la apertura del silo (Weinberg y Muck 1996, Merry et al. 1997). En el presente estudio fue posible diferenciar las cuatro fases del proceso de ensilaje, a efecto de los cambios en el pH que, a su vez, favorecieron la disminución de los indicadores microbiológicos incluidos.

Referente a la búsqueda de microorganismos patógenos, es importante señalar que, en el desarrollo experimental, las determinaciones fueron negativas para aislados o cepas patógenas de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

Asociación de los componentes del ensilado con la disminución de la carga microbiana

Se determinó el efecto de la fuente de carbohidratos (FC) y la fuente de BAL (FI) en la disminución de los diferentes indicadores microbiológicos (Cuadro 6.3). El descenso del pH es deseable en los procesos de ensilaje, y en ese contexto, se observó que, en los tratamientos con sorgo y suero de leche (tratamiento T1), hubo niveles más bajos de pH en comparación a lo observado en los tratamientos con melaza y/o con el cultivo iniciador comercial ($p < 0.05$). Específicamente con el uso de sorgo (tratamientos T1 y T2) en contraste con el uso de melaza (tratamientos T3 y T4), se observó una mayor disminución en la cantidad de H y L, debido a que el contenido de este grupo de microorganismos al final del proceso fue menor en los tratamientos con sorgo como fuente de carbohidratos. El mismo comportamiento en el contenido de H y L se observó para los tratamientos que

incluyeron suero como fuente adicional de BAL, en relación a los que incluyeron el cultivo iniciador.

Tabla 6.3 Efecto de la fuente de carbohidratos (FC) y la fuente de bal (FI) sobre la reducción del pH Y bacterias durante el ensilaje de estiércol porcino

FC/FI	Indicador microbiológico							pH
	BMA ¹	H y L ¹	OCT ²	OCF ²	ENT ¹	BPAS ²	BAL ¹	
	Concentración Inicial (log ₁₀ UFC/g o NMP/g)							
Sorgo/Suero (T1)	6.84 ^b	4.36 ^a	6.82 ^a	6.82 ^a	8.45 ^{a,b}	5.78 ^a	8.67 ^{a,b}	6.93 ^a
	± 0.17	± 0.32	± 0.38	± 0.38	± 0.16	± 0.51	± 0.28	± 0.06
Sorgo/Biosile (T2)	6.29 ^b	4.20 ^{a,b}	6.75 ^a	6.53 ^a	8.59 ^{a,b}	6.32 ^a	8.51 ^b	7.03 ^a
	± 0.87	± 0.17	± 0.49	± 0.45	± 0.38	± 0.75	± 0.08	± 0.06
Melaza/Suero (T3)	6.35 ^b	4.30 ^a	6.57 ^a	6.57 ^a	7.65 ^b	5.96 ^a	8.70 ^{a,b}	5.83 ^b
	± 0.54	± 1.5	± 0.16	± 0.16	± 0.57	± 0.37	± 0.09	± 0.12
Melaza/Biosile (T4)	6.94 ^b	4.45 ^a	6.92 ^a	6.79 ^a	8.84 ^a	6.70 ^a	8.92 ^a	5.83 ^b
	± 0.08	± 0.23	± 0.22	± 0.22	± 0.12	± 0.33	± 0.22	± 0.06
Control	8.71 ^a	3.45 ^b	7.04 ^a	7.04 ^a	***	***	7.83 ^c	6.95 ^a
	± 0.25	± 0.05	± 0.0	± 0.0			± 0.03	± 0.19
Concentración Final (log ₁₀ UFC/g o NMP/g)								
FC								
Sorgo (T1,T2)	5.45 ^a	1.89 ^a	1.99 ^a	1.38 ^a	0 ^a	3.48 ^b	5.61 ^b	4.65 ^c
	± 0.74	± 1.74	± 0.25	± 0.43		± 0.15	± 0.16	± 0.55
Melaza (T3, T4)	4.66 ^b	2.80 ^a	1.77 ^a	1.49 ^a	0 ^a	3.95 ^a	6.08 ^a	4.70 ^b
	± 0.98	± 2.47	± 0.44	± 0.0		± 0.18	± 0.29	± 0.0
Control	3.56 ^c	2.11 ^a	1.49 ^a	1.49 ^a	***	***	6.04 ^{a,b}	5.30 ^a
	± 0.03	± 0.09	± 0.0	± 0.0			± 0.13	± 0.02
FI								
Suero (T1, T3)	5.57 ^a	1.62 ^a	1.82 ^a	1.36 ^a	0 ^a	3.84 ^a	5.70 ^b	4.65 ^c
	± 1.46	± 2.22	± 0.37	± 0.42		± 0.23	± 0.25	± 0.06
Bio-sile™ (T2, T4)	4.67 ^b	2.83 ^a	1.95 ^a	1.50 ^a	0 ^a	3.61 ^b	5.99 ^{a,b}	4.70 ^b
	± 0.33	± 2.29	± 0.37	± 0.03		± 0.30	± 0.37	± 0.0
Control	3.56 ^c	2.11 ^a	1.49 ^a	1.49 ^a	***	***	6.04 ^{a,b}	5.30 ^a
	± 0.03	± 0.09	± 0.0	± 0.0			± 0.13	± 0.02

Los resultados están expresados en log₁₀ de ¹UFC o ²NMP de cada uno de los indicadores microbiológicos. ^{a,b} Medias dentro de la misma columna que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ***Información no disponible. (OCT, OCF) Organismos coliformes totales y fecales; (H y L) Hongos y Levaduras; (ENT) Enterococos; (BPAS) Bacterias productoras de ácido-sulfhídrico; (BMA) Bacterias Mesófilas Aerobias; (BAL) Bacterias ácido-lácticas.

Por su parte, la FC parece no ser determinante para la reducción y/o eliminación de OCT, OCF y ENT, debido a que las reducciones observadas para estos indicadores fueron

independientes de la FC e incluso de la FI. En contraste, tanto la FC como la FI tuvieron efecto sobre la reducción de las BPAS, ya que menor contenido de este grupo de bacterias se observó en los tratamientos con sorgo en relación a los que incluyeron melaza. De igual manera, se observó mayor disminución de las BPAS en los tratamientos con suero obtenido de quesería en comparación con los que incluyeron el cultivo iniciador comercial ($p < 0.05$). Las mayores reducciones de los grupos indicadores fueron observadas en los tratamientos con sorgo como FC respecto a los tratamientos con melaza; este resultado podría estar relacionado con el hecho de que el sorgo podría aumentar el contenido de materia seca en el ensilado y genera una mezcla más homogénea.

A diferencia del uso sorgo, el uso de melaza, cuya viscosidad la vuelve un material más difícil para su homogeneización durante el preparado, genera mezclas heterogéneas y de difícil manejo (Titterton y Barreba 2001). Los resultados obtenidos mostraron que el suero proveniente de quesería fue mejor como FI en relación al uso de cultivo iniciador para la disminución del pH y control de algunos indicadores microbiológicos (Cuadro 6.3). Este resultado podría estar asociado a una mayor diversidad de BAL en el suero, lo que favorecería mayor acumulación de ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y sustancias diversas que producen estas bacterias (Parra 2010). Con respecto al grado de relación entre variables, a través del análisis de chi cuadrado (X^2), se observaron relaciones significativas ($p < 0.05$) entre el pH de los microsilos y el contenido de algunos grupos de microorganismos, como fueron H y L ($X^2 = 479.9$, GL = 340), OCF ($X^2 = 123.7$, GL = 84), ENT ($X^2 = 253.7$, GL = 160), BAL ($X^2 = 740.5$, GL = 663) y BPAS ($X^2 = 194.7$, GL = 144).

De manera similar, a través del análisis de correlación, se corroboró que la disminución de algunos de los grupos indicadores está correlacionada significativamente ($p < 0.05$) con la disminución del pH; incluido el contenido de BMA ($\rho = 0.429$), OCT ($\rho = 0.850$), OCF ($\rho = 0.820$), ENT ($\rho = 0.667$) y BPAS ($\rho = 0.500$). Por lo tanto, se puede inferir que el pH es una de las variables determinantes para la reducción de la carga microbiana de la excreta porcina. La disminución del pH en la excreta se puede relacionar con la



presencia de las BAL (principales responsables de la fermentación), que, aunque disminuyeron junto con el pH ($P = 0.514$, $p < 0.05$), al final del proceso fue el grupo de mayor abundancia en relación al resto de los grupos indicadores evaluados.

Los resultados sugieren, por lo tanto, que es importante para el ensilaje de excretas porcinas mantener una abundancia relativa alta de BAL para lograr la reducción del pH y limitar la sobrevivencia de microorganismos no deseados.

Conclusiones

El uso de bacterias ácido-lácticas y una fuente de carbohidratos, como promotores para el establecimiento del ensilaje, resultó una estrategia efectiva para reducir la carga microbiana del estiércol porcino. Los resultados se asociaron principalmente a la disminución del pH como factor determinante y que, a su vez, se relacionó directamente con la cantidad de BAL presentes en el proceso, que además se favoreció con la inclusión de sorgo como fuente alterna de carbohidratos. La disminución de la carga microbiana del estiércol podría contribuir a la descontaminación de las excretas porcinas con fines de inclusión en un esquema de aprovechamiento y manejo integrado de residuos.

Referencias

- Axelsson L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. y Ouwehand A., Ed.). Marcel Dekker, Nueva York, EUA. 1-67. DOI: 10.1201/9780824752033.ch1
- Borges G.L., Soria F.M. y Ruz F.N. (2003). Contenido de macronutrientes en sustratos de bagazo de henequén y excreta porcina y su efecto en el desarrollo de plántulas de papaya. Revista Chapingo serie Horticultura 9 (2), 291-304.
- Bórquez J.L., González M.S.S., Pinos R.J.M., Domínguez I. y Bárcena J.R. (2009). Feeding value of ensiling fresh cattle manure with molasses or bakery by-products in lambs. Livest. Sci. 122 (2-3), 276-280. DOI: 10.1016/j.livsci.2008.09.009
- Bulkowska K., Pokoj T., Klimiuk, E. y Gusiatin Z.M. (2012). Optimization of anaerobic digestion of a mixture of *Zea mays* and *Miscanthus sacchariflorus* silages with various pig manure dosages. Bioresour. Technol. 125, 208-216. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.078
- Caballero H.A.I., Castrejón P.F., Martínez G.R., Ángeles C.S., Pérez R.M. y Buntinx S.E. (2004). Survival and viability of *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* in ensiled swine faeces. Bioresour. Technol. 94 (2), 137-42. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.12.008
- Castellanos A.A., Salazar G.G., Hernández M.P., Domínguez A.G. y Barrera C.G. (2010). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación animal. Folleto para productores. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México, 21 pp.
- CONADESUCA (2016). Melazas de caña de azúcar y su uso en la fabricación de dietas para ganado. Consejo Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. Nota informativa, México, D. F. , México, 9 pp.
- De la Torre A.I., Jimenez J.A., Carballo M., Fernandez C., Roset J. y Muñoz M.J. (2000). Ecotoxicological evaluation of pig slurry. Chemosphere 41 (10), 1629-1635. DOI: 10.1016/S0045-6535(00)00038-2
- FAO (2013a). Greenhouse gas emissions from pig and chicken supply chains – A global life cycle assessment. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación

y la Agricultura, Roma, Italia. [en línea]

<http://www.fao.org/docrep/018/i3460e/i3460e00.htm> 06/04/2017

FAO (2013b). Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains – A global life cycle assessment. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia. [en línea]

<http://www.fao.org/docrep/018/i3461e/i3461e00.htm> 06/04/2017

Galindo B.A.J., Domínguez A.G., Salazar G.G., Sánchez G.F.J. y Avalos C.M.A. (2012). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación animal. Memorias. Vamos al campo. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, octubre, 2012. 77 pp. Formato impreso.

García A., León R., Míreles S., Castro J.P., García A.A., Roa J.J. y Guerrero L.A. (2010). Contaminación ambiental en explotaciones porcinas mexicanas e incumplimiento de la norma ambiental. Revista Computadorizada de Producción Porcina 17 (3), 243-246.

Hansen A., y Schieberle P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. Trends Food Sci. Technol. 16 (1-3), 85–94. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.03.007

Herrera C.J., Naranjo J.N., Almaraz A.N., Uribe S.N., y Rosas M.I. (2015). El ensilado. Proceso, manipulación y uso del ensilaje. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F., México. 114 pp.

Hiriart L.M. (1984). Ensilaje, composición química-calidad fermentativa-valor nutritivo. Investigación y progreso agropecuario Carillanca 3 (1-4), 28-30.

Kim J.S., Lee Y.H., Kim Y.I., Ahmadi F., Oh Y.K., Park J.M. y Kwak W.S. (2016). Effect of microbial inoculant or molasses in fermentative quality and aerobic stability of sawdust-based spent mushroom substrate. Bioresour. Technol. 216, 188-195. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.056

López Y., Arece J., León E., Aróstica N. y Ojeda F. (2008). Efecto de la inclusión de un ensilaje mixto en el comportamiento productivo de ovejas pelibuey en pastoreo. Pastos y Forrajes 31 (1), 73-82.

- Martínez V., García M.D. y Ly J. (2004). Estimados de excreción fecal de cerdos como material de ingreso en biodigestor y para composta. Revista computadorizada de producción porcina 11, 283-289.
- Masse D., Gilbert Y. y Topp E. (2011). Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. Bioresour. technol. 102 (2), 641-646. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.08.020
- McCarthy G., Lawlor P.G., Carney K.N., Zhan X., Gutierrez M. y Gardiner G.E. (2015). An investigation into the removal of *Salmonella* and enteric indicator bacteria from the separated liquid fraction of raw or anaerobically digested pig manure using novel on-farm woodchip biofilters. Sci. Total. Environ. 514, 140-146. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.036
- McDonald P., Henderson A.R. y Heron S.J.E. (1991). The biochemistry of silage. 2 ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, Reino Unido. 340 pp.
- Merry R.J., Lowes K.F. y Winters A. (1997). Current and future approaches to biocontrol in silage. Memorias. 8th Int. Symposium forage conservation Brno. Research Institute of Animal Nutrition Ltd., Pohorelice, República Checa, 21 de septiembre al 01 de octubre, 1997. 17-27.
- Moset V., Bertolini E., Cerisuelo A., Cambra M., Olmos A. y Cambra-Lopez M. (2014). Start-up strategies for thermophilic anaerobic digestion of pig manure. Energy 74, 389-395. DOI: 10.1016/j.energy.2014.07.003
- Muck R.E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. Revista Brasileira de Zootecnia 39, 183-191. DOI: 10.1590/S1516-35982010001300021
- Navarro H.V., Olea R.M.A. y Torres V.M.R. (2009). *Clostridium perfringens* en alimentos cárnicos. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. 176 pp.
- Ni K., Wang F., Zhu B., Yang J., Zhou G., Pan Y. y Zhong J. (2017). Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage, Bioresour. technol. 238, 706-715. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.04.055
- Oude Elferink S.J.W.H., Driehuis F., Gottschal J.C. y Spoelstra S.F. (1999). Silage fermentation processes and their manipulation. Memorias. FAO Electronic

- Conference on Tropical Silage. FAO. [en línea]
<http://www.fao.org/docrep/005/X8486E/x8486e09.htm> 20/02/2017
- Parra H.R.A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Rev. Bio. Agro 8 (1), 93-105.
- Pérez U.M., Amaro R.A. y Castro C.N. (2013). Manual integrado de la normatividad y métodos de detección y medición de organismos microbiológicos en alimentos como vegetales y frutas frescas, productos del mar y cárnicos de animales terrestres. El Marqués, Querétaro, México. Centro Nacional de Metrología. Secretaría de Economía. México. 244 pp.
- Philippe F.X. y Nicks B. (2015). Review on greenhouse gas emissions from pig houses: production of carbon dioxide, methane and nitrous oxide by animals and manure. Agr. Ecosyst. Environ. 199, 10-25. DOI: 10.1016/j.agee.2014.08.015
- Ruvalcaba G.J.M., Domínguez A.G., Salazar G.G., Arias C.L.E., Castellanos A.A., Hernández M.P., Romero J.J.H. y Ruiz A.C.R. (2011a). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación de vacas en lactación y su efecto sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. Memorias. XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, León, Guanajuato, México. 12 al 14 de octubre, 2011. 184 pp. Formato impreso.
- Ruvalcaba G.J.M., Domínguez A.G., Salazar G.G., Arias C.L.E., Hernández M.P., Castellanos A.A. y Romero J.J.H. (2011b). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación de vacas lecheras y su efecto sobre las características higiénico-sanitarias de la leche. Memorias. XIII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. Universidad de Guadalajara, Puerto Vallarta, Jalisco, México. 03 al 05 de noviembre, 2011. 113-116
- SIAP (2014). Resumen de la producción pecuaria en México. Servicio de información agroalimentaria y pesquera [en línea]. <https://www.gob.mx/siap> 28/06/15
- Sadzawka R. A., Carrasco R. M. A., Grez Z. R. y Mora G.M.L. (2005). Métodos de análisis de compost. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas N° 30, Santiago, Chile, 142 pp.
- Sahlström L., Bagge E., Emmoth E., Holmqvist A., Danielsson-Tham M.L. y Albiñ A. (2008). A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat

- treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresour. technol.* 99 (16), 7859-7865. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.071
- Sánchez M. y Gonzalez J.L. (2005). The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresour. technol.* 96 (10), 1117-1123. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.10.002
- Smith S.R., Lang N.L., Cheung K.H. y Spanoudaki K. (2005). Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Manag.* 25 (4), 417-425. DOI: 10.1016/j.wasman.2005.02.010
- Steinfeld H., Gerber P., Wassenaar T., Castel V., Rosales C. y de Haan C. (2006). Livestock's long shadow: environmental issues and options. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. [en línea] <http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.HTM> 20/01/2017
- Titterton M. y Barreba F.B. (2001). Ensilaje de gramíneas y leguminosas en los trópicos. Memorias Uso de ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura 1 de septiembre al 15 de diciembre, 1999 [en línea] <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s06.htm> 20/01/2017
- Weinberg Z.G. y Muck R.E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 53-68. DOI: 10.1016/0168-6445(96)00025-3
- Woolford M.K. (1984). The silage Fermentation. Vol. 14. Microbiological series. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Zhang D., Yuan X., Guo P., Suo Y., Wang X., Wang W. y Cui Z. (2011). Microbial population dynamics and changes in main nutrients during the acidification process of pig manures. *J. Environ. Sci. (China)* 23 (3), 497-505. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60434-2
- Zhao H.Y., Li J., Liu J.J., Lü Y.C., Wang X.F. y Cui Z. (2013). Microbial community dynamics during biogas slurry and cow manure compost. *J. Integr. Agr.* 12 (6), 1087-1097. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60488-8



Zhu J. (2000). A review of microbiology in swine manure odor control. *Agric. Ecosyst. Environ.* 78, 93-106. DOI: 10.1016/S0167-8809(99)00116-4

ANEXOS.

PUBLICACIONES ASOCIADAS

ANEXO 1. Publicación en revista científica indexada








International Journal of
Dairy Technology

SDT Society of Dairy Technology

doi: 10.1111/1471-0307.12676

ORIGINAL RESEARCH

Texture, physicochemical and sensory properties of artisanal Adobera cheese from Los Altos de Jalisco, a genuine Mexican cheese

JOSÉ M RUVALCABA-GÓMEZ,^{1,2}  HÉCTOR RUIZ-ESPINOSA,³ 
RAMÓN I ARTEAGA-GARIBAY,⁴  MARLON ROJAS-LÓPEZ,¹ 
GENARO G AMADOR-ESPEJO,⁵  LUIS M ANAYA-ESPARZA⁶  and
RAÚL J DELGADO-MACUIL^{1*} 

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala 90700, ²Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Av. Biodiversidad #2470, Tepetitlán de Morelos, Jalisco C.P. 47600, ³Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Edificio 106H, Av. Sn. Claudio y 18 sur, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla 72570, ⁴Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Boulevard de la biodiversidad #400, Tepetitlán de Morelos, Jalisco C.P. 47600, ⁵Cátedras CONACYT-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala 90700, and ⁶Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Av. Rafael Casillas Aceves 1200, Tepetitlán de Morelos, Jalisco 47600, Mexico

Physicochemical and sensory properties of Adobera, a genuine, understudied Mexican raw-milk cheese, were explored by analysing commercial samples from different manufacturers and seasons. Composition-wise, Adobera could be considered a fresh cheese with a high moisture content (42.5%), although its relatively low water activity (0.953) and pH (5.14) and high free amino acid content (0.46 mmol/g, dry basis) could indicate otherwise. Instrumental texture corresponded to that of a semifirm cheese, while its colour was whitish-to-ivory. Both texture and composition were significantly affected by sampling season and cheese composition, while some attributes of sensory acceptability significantly varied with brand.

Keywords Mexican cheese, Texture profile, Chemical composition, Raw milk.

INTRODUCTION

Around 343 000 tons of cheese are produced annually in Mexico (SAGARPA 2016). Over 40 varieties have been categorised as artisanal, several of which are produced with raw, nonstandardised milk (Cervantes and Villegas de Gante 2012). Highly acceptable sensory-wise, these cheeses are frequently manufactured by micro- and small businesses located in rural communities through processes with low degree of technification (Pomeón and Cervantes 2010; Villegas de Gante and Cervantes 2011). As a result, cheese safety could be compromised, and quality features could be difficult to control, as cheese composition may vary from batch to batch and with the manufacturing season.

Important efforts for characterising and preserving Mexican cheeses have been carried out by local authorities, organisations of artisanal cheesemakers and research groups (Cervantes *et al.* 2008; Grass *et al.* 2013; Solís *et al.* 2013; Aldrete *et al.* 2014; Grass and Cesín 2014; Ruvalcaba *et al.* 2014; Villegas de Gante *et al.* 2014). Some successful cases stand out, as the identity of some cheeses has been protected through collective marks (e.g., Cotija cheese) (Yescas 2013). However, the information available on most genuine artisan Mexican cheeses is either limited or nonexistent; thus, research on what makes each cheese unique is paramount to help establish desirable physicochemical features, standard making procedures, and, in the end, regulations (Gonzalez *et al.* 2016). So far,

*Author for correspondence. E-mail: rdelgadom@ipn.mx

© 2019 Society of Dairy Technology

ANEXO 2. Publicación en revista científica indexada.

Rev. Int. Contam. Ambie. 35 (1) 247-257, 2019
DOI: 10.20937/RICA.2019.35.01.18

USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA DESCONTAMINACIÓN DE ESTIÉRCOL PORCINO MEDIANTE ENSILAJE EXPERIMENTAL

José Martín RUVALCABA-GÓMEZ^{2,3}, Ramón Ignacio ARTEAGA-GARIBAY^{1*},
Gerardo DOMÍNGUEZ-ARAÚJO³, Alberto Jorge GALINDO-BARBOZA³,
Gerardo SALAZAR-GUTIÉRREZ³, Marcos Daniel MARTÍNEZ-PEÑA^{1†} y
Raúl Jacobo DELGADO-MACUIL²

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad 400, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600

² Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla, km 1.5, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

³ Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad 2470, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, C.P. 47600.

[†] Los autores informan del sensible fallecimiento de Marcos Daniel Martínez Peña, ocurrido poco antes de la publicación de este artículo.

* Autor de correspondencia: arteaga.ramon@inifap.gob.mx

(Recibido junio 2017; aceptado abril 2018)

Palabras clave: ensilaje, cerdaza, fermentación ácido-láctica, descontaminación

RESUMEN

La actividad porcina genera diariamente una gran cantidad de residuos conformados por nutrientes y microorganismos que potencialmente contribuyen a la contaminación de agua, aire y suelos, y la subsecuente generación de olores desagradables. Diversas estrategias se han desarrollado para mitigar el efecto contaminante de las excretas porcinas y aprovechar sus nutrientes; tal es el caso del ensilaje, que consiste en la fermentación de las excretas. En este estudio se evaluó el efecto del ensilaje del estiércol porcino adicionado con dos fuentes diferentes de carbohidratos y dos fuentes de bacterias ácido lácticas, sobre la reducción de diferentes grupos de microorganismos. Durante el proceso se observó la disminución del pH (hasta 4.6) y la carga microbiana, sobre todo para organismos coliformes (reducción mayor a 5 logaritmos) y hongos y levaduras, así como la eliminación total del grupo de enterococos; mientras que el contenido de bacterias ácido lácticas, principales responsables de la fermentación, permaneció constante. Los mejores resultados se observaron mediante el uso de sorgo como fuente de carbohidratos en combinación con suero de leche, subproducto de la elaboración de queso, como fuente de bacterias ácido lácticas, tanto en disminución del pH como en la reducción de algunos indicadores microbiológicos, incluidas las bacterias productoras de ácido sulfhídrico. Mediante el ensilaje del estiércol porcino se favorece la disminución del pH por acción de las bacterias ácido lácticas a niveles que limitan la sobrevivencia de microorganismos asociados a contaminación fecal, y lo transforman en un producto seguro, desde la perspectiva microbiológica, para su manejo y posible aprovechamiento subsecuente.

Key words: silage, pig manure, lactic-acid fermentation, decontamination

ANEXO 3. Capítulo de libro

Investigaciones en Ciencia e Inocuidad de Alimentos

Exploración del perfil de inocuidad microbiológica de queso adobera elaborado artesanalmente

^{1,3}Ruvalcaba Gómez, J. M., ²Arteaga Garibay, R. I., ¹Delgado Macuil, R. J., ³Villaseñor González, Fernando, ³Villanueva García, M., ³Montes Ocegüera, L. R.
¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México. Tel: (248) 4870765. INIFAP: ²Centro Nacional de Recursos Genéticos. Boulevard de la biodiversidad 400, Rancho las Cruces, 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. ³Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, Av. Biodiversidad 400, Tepatitlán, Jalisco, México. arteaga.ramon@inifap.gob.mx

Palabras clave: Queso adobera, inocuidad, lácteos

Introducción

En México se tienen identificados cerca de 40 tipos de quesos catalogados como genuinos, de los cuales, al menos 17 se elaboran de manera artesanal incluidos los quesos Adobera, Oaxaca, asadero, de poro, Cotija, entre otros; y su producción generalmente se asocia y mantiene en pequeñas cuencas o regiones especializadas en la producción de queso [1]. Estos quesos son elaborados por micro, pequeña y medianas industrias, en muchas ocasiones ubicadas en rancherías y pequeños pueblos, a través de procesos rústicos y con deficiente control de calidad, pero desempeñan un papel fundamental en la gastronomía y economía regional y en algunos casos, nacional [2]. Las principales problemáticas que enfrentan los quesos mexicanos genuinos, son variabilidad en calidad, incluyendo aspectos relacionados con su composición, inocuidad microbiológica y características sensoriales; altos costos de producción por falta de tecnología que eficiente los procesos, problemas de comercialización por los volúmenes de producción y falta de estrategia de mercado, y finalmente incumplimiento de normatividad vigente aplicable, sobretudo relacionada con aspectos sanitarios [3]. Particularmente, el queso Adobera de los Altos de Jalisco, que es un queso fresco elaborado en su mayoría con leche cruda de vaca, de pH bajo y elevado contenido de humedad, pero con características fundentes; ha logrado mantenerse en el mercado, por el aumento en los volúmenes de producción y el área de distribución [4]. Sin embargo se ha señalado que uno de los principales problemas que enfrenta este queso es que, al elaborarse con leche cruda, sumado a la deficiente implementación de prácticas adecuadas de manufactura, podría favorecer la incidencia de microorganismos patógenos, ya que en estudios previos se ha reportado incidencia de este tipo de microorganismos en este queso [5]. Por otra parte también se ha señalado que el pH podría ser un factor determinante para la eliminación de patógenos en queso adobera, sobre todo en quesos con valores de pH 5 o inferiores [5]. En ese sentido, es importante garantizar la inocuidad de este tipo de productos y en general de los alimentos destinados a consumo humano, por lo que se han diseñado herramientas aplicables a los procesos de elaboración de alimentos orientados a lograr ese objetivo. Específicamente para queso adobera, algunos productores han realizado esfuerzos por producirlo bajo un esquema que incluya un proceso de pasteurización de la leche utilizada, no obstante, debido a las implicaciones que la pasteurización involucra [6], y la carencia un cultivo iniciador específico para este tipo de queso, los quesos producidos bajo dicho esquema muestran perfiles de textura y fisicoquímicos distantes del queso elaborado artesanalmente [7]; lo que confirma la necesidad de investigación orientada a identificar los puntos críticos del proceso y del producto que funcionen como base para el planteamiento de desarrollos tecnológicos que permitan mejorar su calidad y aumentar su competitividad. El objetivo del presente estudio fue conocer la inocuidad microbiológica de muestras de queso

ANEXO 4. Manuscrito para someterse a: Journal of microbiological methods.

Viability and membrane potential of lactic-acid bacteria during cryopreservation

José Martín Ruvalcaba-Gómez ^{a,c}, Raúl Jacobo Delgado-Macuil ^a, Carlos Iván Cruz-Cárdenas ^b,
Ramón Ignacio Arteaga-Garibay ^{b*}.

^a Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, CP 90700, México.

^b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Recursos Genéticos, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, CP 47600, México.

^c Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, CP 47600, México.

* Corresponding author. Tel. +52 800 088 22 22.

E-mail addresses: arteaga.ramon@inifap.gob.mx (R. I. Arteaga-Garibay).
ruvalcaba.josemartin@inifap.gob.mx (J. M. Ruvalcaba-Gómez). rdelgadom@ipn.mx (R. J. Delgado-Macuil).

ABSTRACT

Lactic-acid bacteria (LAB) comprises a group of microorganisms responsible of the development of sensory and chemical characteristics in several food and fermented products; for this reason, validated protocols and procedures for their long-term preservation, and methodologies aimed to assess its viability and integrity without compromise its integrity and technological properties are paramount. This study was aimed to determine the effect of cryopreservation of LAB, using thioglycolate broth and glycerol, on their viability, membrane integrity and kinetics. Sixteen LAB were isolated from artisanal cheese samples and genetically identified. 11 strains were selected (including *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Lactococcus*) and included in the cryopreservation assay. The initial average concentration of the bacterial suspensions was 6.89 log₁₀ CFU ml⁻¹; increasing to 8.9 log₁₀ CFU ml⁻¹ 21 days later and slightly reduced at day 42 post-preservation (less than one logarithm). Around 77 % of the cells kept their membrane potential 180 days after their preservation and showed normal Kinetic parameters, keeping normal adaptation times (Lag phase) and Log phases (9 hours' average), before to achieved stationary phase. We concluded that the preservation proposed protocol resulted in a good alternative to long-term preservation of different genera of LAB. Besides, the use of flow cytometry allowed both enumeration of LAB and assess their membrane integrity.

Key words: Flow cytometry, Thioglycolate, culture collections, cheese microbiota.

USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA DESCONTAMINACIÓN DE ESTIÉRCOL PORCINO MEDIANTE ENSILAJE EXPERIMENTAL

José Martín RUVALCABA-GÓMEZ^{2,3}, Ramón Ignacio ARTEAGA-GARIBAY^{1*},
Gerardo DOMÍNGUEZ-ARAUJO³, Alberto Jorge GALINDO-BARBOZA³,
Gerardo SALAZAR-GUTIÉRREZ³, Marcos Daniel MARTÍNEZ-PEÑA^{1†} y
Raúl Jacobo DELGADO-MACUIL²

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad 400, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C.P. 47600

² Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla, km 1.5, Tlaxcala, México. C.P. 90700.

³ Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad 2470, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, C.P. 47600.

[†] Los autores informan del sensible fallecimiento de Marcos Daniel Martínez Peña, ocurrido poco antes de la publicación de este artículo.

*Autor de correspondencia: arteaga.ramon@inifap.gob.mx

(Recibido junio 2017; aceptado abril 2018)

Palabras clave: ensilaje, cerdaza, fermentación ácido-láctica, descontaminación

RESUMEN

La actividad porcina genera diariamente una gran cantidad de residuos conformados por nutrientes y microorganismos que potencialmente contribuyen a la contaminación de agua, aire y suelos, y la subsecuente generación de olores desagradables. Diversas estrategias se han desarrollado para mitigar el efecto contaminante de las excretas porcinas y aprovechar sus nutrientes; tal es el caso del ensilaje, que consiste en la fermentación de las excretas. En este estudio se evaluó el efecto del ensilaje del estiércol porcino adicionado con dos fuentes diferentes de carbohidratos y dos fuentes de bacterias ácido lácticas, sobre la reducción de diferentes grupos de microorganismos. Durante el proceso se observó la disminución del pH (hasta 4.6) y la carga microbiana, sobre todo para organismos coliformes (reducción mayor a 5 logaritmos) y hongos y levaduras, así como la eliminación total del grupo de enterococos; mientras que el contenido de bacterias ácido lácticas, principales responsables de la fermentación, permaneció constante. Los mejores resultados se observaron mediante el uso de sorgo como fuente de carbohidratos en combinación con suero de leche, subproducto de la elaboración de queso, como fuente de bacterias ácido lácticas, tanto en disminución del pH como en la reducción de algunos indicadores microbiológicos, incluidas las bacterias productoras de ácido sulfhídrico. Mediante el ensilaje del estiércol porcino se favorece la disminución del pH por acción de las bacterias ácido lácticas a niveles que limitan la sobrevivencia de microorganismos asociados a contaminación fecal, y lo transforman en un producto seguro, desde la perspectiva microbiológica, para su manejo y posible aprovechamiento subsecuente.

Key words: silage, pig manure, lactic-acid fermentation, decontamination

ABSTRACT

Swine production generates every day a large amount of residues, including nutrients and microorganisms, which potentially contribute to contamination of air, water and soil, and generation of unpleasant odors. Many strategies have been developed in order to mitigate the contaminant effect of swine manure and to take advantage of its nutrients and beneficial compounds; silage is an example of these, and consists in swine manure fermentation mainly under anaerobic conditions. The aim of this study was to assess the effect of applying a process of silage to swine manure added with two different sources of carbohydrates and two different sources of lactic-acid bacteria, under the reduction of different microbiological indicators. Through the process, it was observed the reduction of pH levels (until reaching 4.6) and microbial content, mainly for coliforms (reduction greater than 5 log), molds and yeasts, and total elimination of enterococci. On the other hand, significant decline was not reported for the lactic-acid bacteria content, main responsible of fermentation process. Best results were observed through using sorghum as a source of carbohydrates and cheese whey as a source of lactic-acid bacteria, for both, decrease of pH and reduction of some microbiological indicators, including bacteria that produce sulfuric acid. Therefore, silage process, applied to swine manure, induces the decrease of pH for action of lactic-acid bacteria until limit the survival of bacteria associated with fecal contamination, making of swine a transformed and microbiologically safe residue for its handling and subsequent use.

INTRODUCCIÓN

La producción de carne de cerdo en México es de aproximadamente 1 291 000 t al año y en su mayoría se concentra en los estados de Jalisco, Sonora, Guanajuato, Puebla, Yucatán y Michoacán (SIAP 2014).

Asociado a la producción de carne, la actividad porcina genera diariamente una cantidad importante de desechos en sus unidades de producción, principalmente estiércol, cuyo manejo representa un gran reto para los productores.

Se ha reportado que la excreción fecal en cerdos puede ser de hasta 1.35 kg de material fresco por cada kg de materia seca ingerida, con un promedio de 25 % de contenido de materia seca y alrededor de 70 % de materia orgánica (Martínez et al. 2004).

No obstante, la cantidad y composición del estiércol porcino dependerá de factores como el fin zootécnico, edad de los animales, tipo de alimentación y condiciones de confinamiento (Sánchez y González 2005).

Las excretas pueden contener una cantidad significativa de compuestos bioquímicos con posibles aplicaciones, incluida la nutrición animal (Borges-Gómez et al. 2003, Bórquez et al. 2009, Bulkowska et al. 2012, Moset et al. 2014), que favorecen el mantenimiento y proliferación de una importante carga de microorganismos propios de este tipo de residuos.

La microbiota del estiércol incluye diversas especies, principalmente de los géneros *Escherichia*,

Enterococcus, *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, algunos hongos y levaduras, e incluso algunos virus (Sahlström et al. 2008, Masse et al. 2011, Zhang et al. 2011).

La combinación de nutrientes y microorganismos en el estiércol porcino, además de su manejo deficiente, ha provocado que la producción de cerdos contribuya con hasta un 13 % a la emisión de gases y compuestos de efecto invernadero (GyCEI) a nivel mundial (707 000 t de gases como CO₂, CH₄ y NO₂) (Steinfeld et al. 2006, FAO 2013a, FAO 2013b, Philippe y Nicks 2015).

En México se ha reportado que la actividad porcina genera alrededor de 16 000 t diarias de estiércol y la mayoría son arrojadas a tierras de cultivo, cauces de ríos y drenajes municipales (García et al. 2010), lo que contribuye a la contaminación de mantos acuíferos y otros recursos naturales.

Con el objetivo de mitigar el daño ambiental que puede provocar la excreta porcina, se han realizado diferentes estudios para evaluar los efectos del uso de procesos orientados a la descontaminación de este residuo.

Procesos como la fermentación, acidificación y pasteurización, han mostrado reducir la carga microbiana del estiércol porcino, además de que algunos de estos procesos favorecen la obtención de biogás y biofertilizantes. (Hiriart 1984, Caballero-Hernández et al. 2004, López et al. 2008, Moset et al. 2014).

Una de las alternativas que ha resultado factible para el tratamiento del estiércol porcino es el proceso

de ensilaje (Castellanos-Aceves et al. 2010, Galindo-Barboza et al. 2012).

Originalmente el ensilaje se definió como la fermentación láctica de materiales vegetales y fue desarrollado como un método de conservación de forrajes bajo condiciones de anaerobiosis (Hiriart 1984, Muck 2010).

Mediante el ensilaje se controla la actividad microbiana para inducir la fermentación de carbohidratos por las bacterias ácido lácticas (BAL), con o sin el uso de aditivos, lo que favorece las transformaciones bioquímicas para el aprovechamiento de los productos (Hiriart 1984, Muck 2010).

El mayor efecto de conservación de los nutrientes mediante el ensilaje se logra a través de la disminución del pH, que puede reducir los valores hasta 4.5 o 5.0, lo que limita la sobrevivencia de microorganismos competidores de las BAL (Hiriart 1984, Muck 2010).

El proceso de ensilaje no es exclusivo para materiales vegetales, ya que cualquier producto con suficientes carbohidratos fermentables puede ser ensilado (Herrera et al. 2015).

Específicamente, para el tratamiento de estiércol porcino, se ha adecuado el proceso de ensilaje y actualmente se sabe que el producto resultante puede ser aprovechado como ingrediente alternativo de bajo costo en la alimentación de animales (Castellanos-Aceves et al. 2010).

Su uso en la suplementación de animales, como vacas en lactación o cerdos en producción, se ha hecho sin mostrar disminución de la productividad o calidad de los productos (Smith et al. 2005, Sahlström et al. 2008, Ruvalcaba et al. 2011a, Ruvalcaba et al. 2011b, Zhao et al. 2013).

Sin embargo, resulta necesario ampliar los esquemas de evaluación para procesos como el ensilaje de excretas, principalmente para generar evidencias científicas sobre la calidad e inocuidad del producto que se obtiene, con la finalidad de hacer más eficiente su aprovechamiento o tratamientos posteriores.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del proceso de ensilaje sobre la reducción de la carga microbiana del estiércol porcino a través del monitoreo de diferentes grupos indicadores de microorganismos y cambios en el pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microsilos experimentales

Para el experimento se colectó estiércol fresco (menos de 24 horas) de cerdos en etapa de crecimiento y desarrollo, de una explotación porcina de

tipo intensivo ubicada en el municipio de Tepatitlán de Morelos en Jalisco, el cual se utilizó para preparar los microsilos experimentales.

En el estudio fueron considerados cuatro tratamientos y un grupo testigo; cada tratamiento (**Cuadro I**) consistió en una combinación de estiércol fresco (85 % para tratamientos T1 y T2; 91.5 % para tratamientos T3 y T4), una fuente de BAL como promotores de la fermentación y un ingrediente con alto contenido de carbohidratos.

CUADRO I. FORMULACIÓN DE LOS SILOS EXPERIMENTALES

Ingrediente	Tratamiento				
	T1	T2	T3	T4	Testigo
	Proporción (%) ¹				
Estiércol de cerdo	89.5	89.5	91.5	91.5	100
Sorgo molido	10	10	0	0	0
Melaza	0	0	8	8	0
Suero de queso	0.5	0	0.5	0	0
Bio-sile™	0	0.5	0	0.5	0

¹Los porcentajes están calculados con base en el peso final del microsilos en base húmeda

El ingrediente rico en carbohidratos correspondió a 10 % peso/peso (p/p) de sorgo para los tratamientos T1 y T2 y, 8 % p/p de melaza con 50 - 60 % de azúcares (CONADESUCA 2016) para los tratamientos T3 y T4.

La fuente de BAL consistió en un inóculo comercial denominado Bio-sile™ para los tratamientos T2 y T4 (0.5 % p/p; *Lactobacillus plantarum* y *Pedococcus pentosaceus*, 9×10^9 UFC/g; Hansen, EUA), mientras que la segunda consistió en suero de leche, obtenido como subproducto de la elaboración de queso artesanal (tratamientos T1 y T3, 0.5 % peso/volumen).

Paralelamente, a partir del suero de leche se recuperaron diferentes aislamientos bacterianos mediante discriminación morfológica colonial en medios de cultivo selectivos para su posterior crioconservación, identificación y caracterización (información no incluida, artículo en proceso).

Como testigo negativo se utilizó estiércol de cerdo sin la adición de una fuente de carbohidratos, ni de bacterias ácido lácticas.

Los microsilos fueron construidos en recipientes de polipropileno estériles de 2.5 L de capacidad con tapa hermética, en los cuales se depositaron las mezclas correspondientes a cada uno de los tratamientos.

Para cada tratamiento se prepararon tres microsilos (repeticiones) y se mantuvieron incubados a 25 °C durante 21 días.

Toma de muestras

Las muestras del interior de cada uno de los microsilos fueron tomadas diariamente para la determinación del pH y a los días 0, 10 y 21 del tratamiento para la evaluación microbiológica.

Las muestras fueron colectadas en condiciones asépticas mediante el uso de sacabocados estériles para evitar la ruptura del sello superficial del microsililo y las condiciones del mismo.

Cambios en el pH de la excreta

Para la medición del pH se tomaron 10 g de muestra y se diluyeron en 50 mL de agua destilada estéril. El pH fue determinado a partir del sobrenadante obtenido por gravedad, utilizando un potenciómetro portátil marca Hanna® modelo HI 98127. La medición se llevó a cabo por duplicado (Sadzawka et al. 2005).

Evaluación microbiológica

Las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras (HyL), enterococos (ENT) y BAL se determinaron a partir de diluciones decimales seriadas de las muestras en agua estéril.

También se determinó la cuenta de organismos coliformes (pruebas presuntiva y confirmativa, OCTP y OCTC respectivamente), organismos coliformes fecales (OCF) y bacterias productoras de ácido sulfhídrico (BPAS) por la técnica del número más probable (NMP/g). Además, se realizó la búsqueda de cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Pérez et al. 2013).

Análisis estadístico

El diseño experimental consistió en un experimento completamente al azar y los datos obtenidos de los análisis microbiológicos se transformaron a valores base \log_{10} . La matriz de datos fue analizada en el paquete estadístico SASTM ver. 9.3 (SAS 2012).

Se emplearon los procedimientos de: modelo general lineal (GLM), univariado y análisis de varianza (ANDEVA); se utilizó un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y se complementó el análisis de varianza con la comparación de medias entre tratamientos con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Adicionalmente se efectuaron análisis de asociación (chi cuadrado) y correlación (Pearson) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ en paquete estadístico SPSS®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Disminución del pH

Uno de los indicadores más simples para evaluar el proceso del ensilaje sobre el valor nutritivo de materiales con alto contenido de humedad es el pH. En general un valor de pH bajo en ensilados es deseable, debido a que este indica que ha ocurrido una fermentación con producción de ácido láctico (Herrera et al. 2015).

En este estudio, los resultados mostraron que el proceso de ensilaje en todos los tratamientos favoreció la disminución del pH del estiércol (**Fig. 1**).

Al inicio del proceso los valores de pH de los tratamientos T3 y T4 fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$) a los de los tratamientos T1, T2 y el testigo (5.77 ± 0.12 y 5.83 ± 0.06 vs 6.93 ± 0.06 , 7.03 ± 0.06 y 6.72 ± 0.05 , respectivamente).

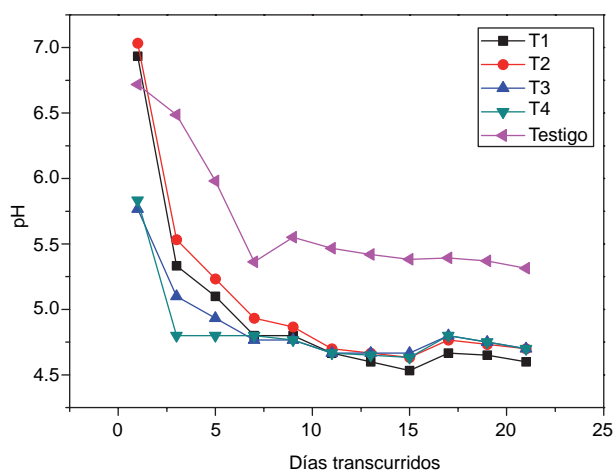


Fig. 1. Valores de pH durante el proceso de ensilaje de estiércol porcino. T1: Tratamiento 1 (Estiércol+sorgo+siero de quesería); T2: Tratamiento 2 (Estiércol+sorgo+cultivo iniciador); T3: Tratamiento 3 (Estiércol+melaza+siero de quesería); T4: Tratamiento 4 (Estiércol+melaza+cultivo iniciador); Testigo: Estiércol sin aditivos

En general, el pH disminuyó en los primeros 10 días del proceso de ensilaje, con lo que alcanzó valores de 4.8 ± 0.07 para los cuatro tratamientos. A partir del onceavo día, la disminución del pH fue menor.

Al final del experimento (día 21), el pH del grupo testigo se mantuvo superior ($\text{pH } 5.31 \pm 0.10$, $p < 0.05$) respecto a los demás tratamientos.

Estadísticamente, el tratamiento T1 fue el que mayor disminución de pH registró (pH final de 4.60 ± 0.01), lo que marcó una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al valor del pH de los tratamientos T2, T3 y T4 (pH de 4.7 ± 0.02).

Desde la perspectiva del pH, los niveles alcanzados indican que el proceso fue adecuado, debido a que se ha establecido previamente que un ensilado con humedad superior al 65 % que tiene valores de pH inferior a 4.8, es considerado un ensilado de buena calidad (Herrera et al. 2015).

Evaluación microbiológica

Al inicio del estudio todos los tratamientos se encontraron en igualdad de condiciones referente al contenido de bacterias para la mayoría de los grupos indicadores incluidos.

Los grupos en mayor abundancia al inicio del proceso fueron los ENT ($8.38 \pm 0.56 \log_{10}$ UFC/g) y BAL ($8.7 \pm 0.22 \log_{10}$ UFC/g), seguidos por los OCT y OCF ($6.7 \pm 0.32 \log_{10}$ NMP/g), BMA ($6.6 \pm 0.54 \log_{10}$ UFC/g) y las BPAS ($6.19 \pm 0.57 \log_{10}$ UFC/g) (Fig. 2, Cuadro II).

El indicador en menor proporción al inicio del experimento fue HyL ($3.61 \pm 0.46 \log_{10}$ UFC/g). Sólo se registraron diferencias estadísticas entre tratamientos al inicio del proceso para los contenidos de ENT y BAL ($p < 0.05$).

Los efectos de la fermentación ácido láctica se observaron desde el día 10 del monitoreo, debido a que en ese tiempo se registraron disminuciones importantes en el contenido de todos los grupos indicadores; en tanto que se mantuvo elevada la proporción de BAL (entre 6.5 y $7.5 \pm 0.31 \log_{10}$ UFC/g).

El mayor efecto de disminución de la carga microbiana se observó al final del proceso de ensilaje (día 21), donde la proporción de OCT y OCF se redujo hasta valores de entre 1 y $2 \log_{10}$ NMP/g. Mientras que los ENT habían llegado a niveles por debajo del límite de detección de los métodos utilizados.

Al día 21 los contenidos de BMA, HyL, BPAS y BAL presentaron diferencias significativas con respecto al contenido registrado al inicio del proceso de ensilaje ($p < 0.05$), con disminuciones de entre 1 y $3 \log_{10}$ UFC/g para todos los tratamientos. Por su parte, el tratamiento T2 fue el que presentó menor proporción de HyL y BPAS al día 21.

En términos de reducción total del contenido de bacterias, las BMA presentaron el menor nivel de reducción y en promedio quedaron en niveles de entre 4 y $5 \pm 0.89 \log_{10}$ UFC/g.

No obstante, las BMA no podrían considerarse como determinante de la inocuidad del ensilado, debido a que involucran una gama amplia de géneros bacterianos tanto aerobios como anaerobios facultativos y obligados.

Niveles mayores de reducción fueron observados para OCT y OCF debido a que al final del proceso de ensilaje, los OCT se redujeron a niveles alrededor de los $2 \pm 0.35 \log_{10}$ NMP/g, sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

Por otra parte, para OCF se observó mayor reducción en el tratamiento T1 en relación al resto de los

CUADRO II. DETERMINACIÓN DE DIFERENTES GRUPOS INDICADORES DE MICROORGANISMOS DURANTE EL ENSILAJE DE EXCRETAS PORCINAS

Tratamiento	BMA ¹	HyL ¹	OCT ²	OCF ²	ENT ¹	BPAS ²	BAL ¹
	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g o NMP/g)						
T1	$6.84^b \pm 0.17$	$4.36^a \pm 0.32$	$6.82^a \pm 0.38$	$6.82^a \pm 0.38$	$8.45^{a,b} \pm 0.16$	$5.78^a \pm 0.51$	$8.67^{a,b} \pm 0.28$
T2	$6.29^b \pm 0.87$	$4.20^{a,b} \pm 0.17$	$6.75^a \pm 0.49$	$6.53^a \pm 0.45$	$8.59^{a,b} \pm 0.38$	$6.32^a \pm 0.75$	$8.51^b \pm 0.08$
T3	$6.35^b \pm 0.54$	$4.30^a \pm 1.5$	$6.57^a \pm 0.16$	$6.57^a \pm 0.16$	$7.65^b \pm 0.57$	$5.96^a \pm 0.37$	$8.70^{a,b} \pm 0.09$
T4	$6.94^b \pm 0.08$	$4.45^a \pm 0.23$	$6.92^a \pm 0.22$	$6.79^a \pm 0.22$	$8.84^a \pm 0.12$	$6.70^a \pm 0.33$	$8.92^a \pm 0.22$
Testigo	$8.71^a \pm 0.25$	$3.45^b \pm 0.05$	$7.04^a \pm 0.0$	$7.04^a \pm 0.0$	***	***	$7.83^c \pm 0.03$
Tratamiento	Concentración final (\log_{10} UFC/g o NMP/g)						
T1	$5.95^a \pm 0.75$	$3.24^a \pm 0.33$	$2.15^a \pm 0.17$	$1.25^b \pm 0.62$	0.00^a	$3.63^{b,c} \pm 0.0$	$5.48^c \pm 0.02$
T2	$4.94^{a,b} \pm 0.17$	$1.00^a \pm 1.73$	$1.83^a \pm 0.23$	$1.52^a \pm 0.05$	0.00^a	$3.36^c \pm 0.0$	$5.74^{b,c} \pm 0.10$
T3	$4.99^{a,b} \pm 1.51$	$1.70^a \pm 2.94$	$1.52^a \pm 0.05$	$1.49^a \pm 0.0$	0.00^a	$4.04^a \pm 0.12$	$5.93^{a,b,c} \pm 0.01$
T4	$4.43^{b,c} \pm 0.23$	$4.66^a \pm 0.15$	$2.06^a \pm 0.50$	$1.49^a \pm 0.0$	0.00^a	$3.86^{a,b} \pm 0.19$	$6.24^a \pm 0.37$
Testigo	$3.56^c \pm 0.03$	$2.11^a \pm 0.09$	$1.49^a \pm 0.0$	$1.49^a \pm 0.0$	***	***	$6.04^{a,b} \pm 0.13$

Los resultados están expresados en \log_{10} de ¹UFC o ²NMP de cada uno de los indicadores microbiológicos. ^{a, b} Medias dentro de la misma columna que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ***Información no disponible. (OCT, OCF) Organismos coliformes totales y fecales; (H y L) Hongos y Levaduras; (ENT) Enterococos; (BPAS) Bacterias productoras de ácido sulfhídrico; (BMA) Bacterias mesófilas Aerobias; (BAL) Bacterias ácido lácticas

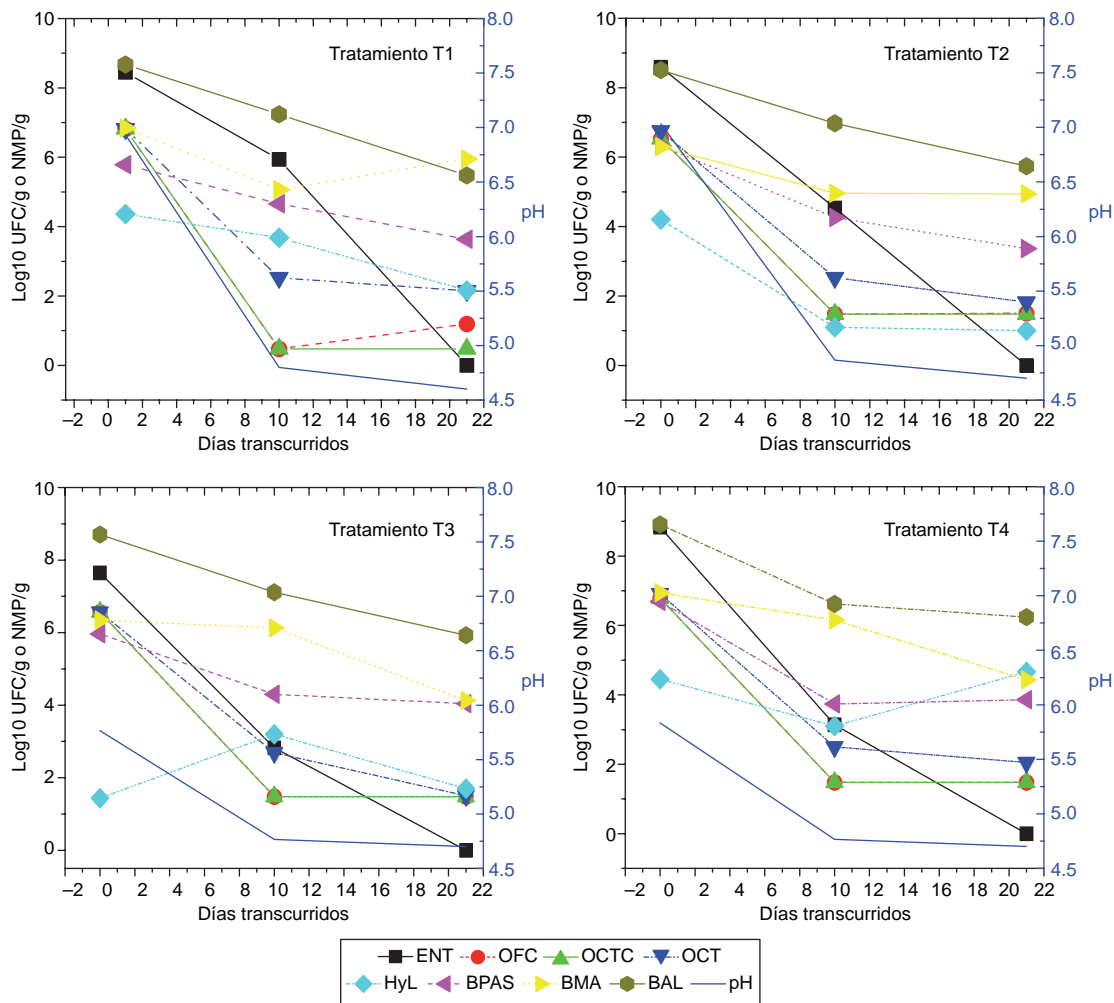


Fig. 2. Comportamiento microbiológico del ensilado de estiércol porcino con diferentes formulaciones. Tratamiento T1: Estiércol+sorgo+suero de queso; Tratamiento T2: Estiércol+sorgo+cultivo iniciador; Tratamiento T3: Estiércol+melaza+suero de quesería; Tratamiento T4: Estiércol+melaza+cultivo iniciador. (OCT, OFC) Organismos coliformes totales y fecales; (H y L) Hongos y levaduras; (ENT) Enterococos; (BPAS) Bacterias productoras de ácido sulfhídrico; (BMA) Bacterias mesófilas aerobias; (BAL) Bacterias ácido lácticas

tratamientos ($p < 0.05$), con lo que se disminuyó al nivel de $0.6 \log_{10}$ NMP/g en comparación con $1.49 \log_{10}$ NMP/g para el resto de los tratamientos.

En contraste, las BPAS se mantuvieron presentes hasta el final del proceso, pero con reducciones considerables en las determinaciones. Este grupo de bacterias se redujo más en los tratamientos T1 y T2 en relación a lo determinado para los tratamientos T3 y T4 ($p < 0.05$).

El medio de cultivo utilizado para BPAS fue medio leche fierro, para determinar el fenómeno “fermentación tormentosa” (fermentación de la leche y fractura del cuajo), que es utilizado como prueba presuntiva para especies del género *Clostridium*,

que está asociado a la producción de olores indeseables característicos del estiércol (Navarro et al. 2009).

Las bacterias del género *Clostridium* se han reportado como parte de la microbiota del estiércol porcino y se caracterizan por ser anaerobios obligados, esporulados, con crecimientos a temperaturas de entre 30 y 37 °C a pH de 6.5 a 7 (Zhu 2000), lo que dificulta su eliminación.

Sin embargo, la reducción determinada en el presente estudio para BPAS podría ser un factor clave en la eliminación de malos olores.

Además, la hidrólisis de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos asociadas al proceso de fermentación

ácido láctica (Hansen y Schieberle 2005), se puede relacionar con cambios percibidos en el olor de la excreta durante el proceso de ensilaje, que fue menos desagradable al olfato al final del proceso.

Para confirmar los cambios en las características sensoriales del estiércol, es necesario realizar estudios que incluyan la medición de compuestos asociados al olor, como es el análisis de compuestos volátiles, entre otros.

Es importante mencionar que los niveles de reducción del contenido de bacterias en los tratamientos incluidos son comparables con las reducciones reportadas mediante la aplicación de otro tipo de tratamientos.

Masse et al. (2001), a través de digestión anaerobia a 24 °C, reportan reducciones de entre 2.6 y 2.9 log₁₀ tanto para OCF como para *Salmonella* respectivamente, a partir del día 7 de tratamiento y con reducciones totales a los 28 días.

Sin embargo, los autores de dicha referencia reportan reducciones poco significativas para *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* spp. con este tratamiento (entre 0 y 0.8 log₁₀); en contraste con lo obtenido en el presente estudio, donde se observó la eliminación completa de los ENT.

Otro tratamiento comparable en niveles de reducción de cuentas bacterianas en estiércol es la pasteurización.

Sahlström et al. (2008) reportan que para eliminar los enterococos en residuos biológicos utilizados para la producción de biogás, es necesario aplicar pasteurización a 70 °C durante 30 min, con lo que además se elimina en su totalidad OCT y OCF.

No obstante, a pesar de la intensidad del tratamiento, los autores reportan conteos de más de 4 log₁₀ UFC/g para *C. perfringens* posterior a la aplicación del tratamiento.

Los resultados obtenidos en esta investigación también son comparables, e incluso superan a algunos reportes, en los que se evalúa el efecto de la acidificación a temperatura ambiente de estiércol o el uso de biofiltros sobre la reducción del contenido de bacterias (De la Torre et al. 2000, Sahlström et al. 2008, Zhang et al. 2011, McCarthy et al. 2015).

En contraste, sobre la presencia de BAL en todos los tratamientos, no se observó reducción significativa y al día 21, la cantidad de estos microorganismos se mantuvo en el orden de los 6 log₁₀ UFC/g.

Es importante mencionar que en los tratamientos T3 y T4 se determinaron las mayores concentraciones de BAL al final del proceso, en comparación con los tratamientos T1 y T2 (p < 0.05).

El grupo de las BAL incluye un conjunto amplio de géneros relacionados por sus características tanto morfológicas como fisiológicas, y cuya actividad principal es la producción de ácido como resultado de la fermentación de carbohidratos, por lo que son consideradas como determinantes en los ensilados (Axelsson 2004).

Diversos factores, como el contenido y tipo de carbohidratos y concentración de materia seca, influyen en la prevalencia de las BAL durante la fermentación de los silos, asociado además a las características propias de estas bacterias como la osmotolerancia y su diversidad metabólica (Woolford 1984, McDonald et al. 1991, Oude Elferink et al. 1999).

Lo observado en este estudio coincide con el comportamiento típico de las BAL en ensilados, que incluye un aumento en su concentración durante las etapas iniciales del proceso, para posteriormente disminuir a medida que el pH desciende y se limita la disponibilidad de nutrientes (Kim et al. 2016, Ni et al. 2017).

Para ensilados de producción se ha reportado que los géneros de BAL predominantes son *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* que, en su mayoría, son bacterias anaerobias facultativas y mesófilas, con la capacidad de acidificar el medio a niveles de pH de entre 4 y 5 (Oude et al. 1999).

Adicionalmente, se ha establecido que el proceso de ensilaje de materiales vegetales debe incluir cuatro fases principales diferenciadas: aeróbica, de fermentación, estable y de deterioro (Weinberg y Muck 1996, Merry et al. 1997).

Las tres primeras fases corresponden a una disminución importante en los valores del pH, reducción de indicadores microbiológicos y aumento en la acidez, mientras que en la etapa final se deben mantener los niveles de BAL y de acidez, para poder así realizar la apertura del silo (Weinberg y Muck 1996, Merry et al. 1997).

En el presente estudio fue posible diferenciar las cuatro fases del proceso de ensilaje, a efecto de los cambios en el pH que, a su vez, favorecieron la disminución de los indicadores microbiológicos incluidos.

Referente a la búsqueda de microorganismos patógenos, es importante señalar que en el desarrollo experimental las determinaciones fueron negativas para aislados o cepas patógenas de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

Asociación de los componentes del ensilado con la disminución de la carga microbiana

Se determinó el efecto de la fuente de carbohidratos (FC) y la fuente de BAL (FI) en la disminución

de los diferentes indicadores microbiológicos (**Cuadro III**).

El descenso del pH es deseable en los procesos de ensilaje y, en ese contexto, se observó que en los tratamientos con sorgo y suero de leche (tratamiento T1), hubo niveles más bajos de pH en comparación con lo observado en los tratamientos con melaza o con el cultivo iniciador comercial ($p < 0.05$).

Específicamente con el uso de sorgo (tratamientos T1 y T2) en contraste con el uso de melaza (tratamientos T3 y T4), se observó una mayor disminución en la cantidad de HyL, debido a que el contenido de este grupo de microorganismos al final del proceso fue menor en los tratamientos con sorgo como fuente de carbohidratos.

El mismo comportamiento en el contenido de HyL se observó para los tratamientos que incluyeron suero como fuente adicional de BAL, en relación con los que incluyeron el cultivo iniciador.

Por su parte, la FC parece no ser determinante para la reducción o eliminación de OCT, OCF y ENT, debido a que las reducciones observadas para estos indicadores fueron independientes de la FC e incluso de la FI.

En contraste, tanto la FC como la FI tuvieron efecto sobre la reducción de las BPAS, ya que menor contenido de este grupo de bacterias se observó en los tratamientos con sorgo en relación con los que incluyeron melaza.

De igual manera se observó mayor disminución de las BPAS en los tratamientos con suero obtenido de queso en comparación con los que incluyeron el cultivo iniciador comercial ($p < 0.05$).

Las mayores reducciones de los grupos indicadores fueron observadas en los tratamientos con sorgo como FC respecto a los tratamientos con melaza; este resultado podría estar relacionado con el hecho de que el sorgo podría aumentar el contenido de materia seca en el ensilado y generar una mezcla más homogénea.

A diferencia del uso sorgo, el de melaza, cuya viscosidad la vuelve un material más difícil para su homogeneización durante el preparado, genera mezclas heterogéneas y de difícil manejo (Titterton y Barreba 2001).

Los resultados obtenidos mostraron que el suero proveniente de queso fue mejor como FI en relación al uso de cultivo iniciador para la disminución del pH y control de algunos indicadores microbiológicos (**Cuadro III**).

CUADRO III. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS (FC) Y LA FUENTE DE BAL (FI) SOBRE LA REDUCCIÓN DEL pH Y BACTERIAS DURANTE EL ENSILAJE DE ESTIERCOL PORCINO

	Indicador microbiológico							
	BMA ¹	HyL ¹	OCT ²	OCF ²	ENT ¹	BPAS ²	BAL ¹	pH
Concentración Inicial (log10 UFC/g o NMP/g)								
FC/FI								
Sorgo/Suero (T1)	6.84 ^b ± 0.17	4.36 ^a ± 0.32	6.82 ^a ± 0.38	6.82 ^a ± 0.38	8.45 ^{a,b} ± 0.16	5.78 ^a ± 0.51	8.67 ^{a,b} ± 0.28	6.93 ^a ± 0.06
Sorgo/Biosile (T2)	6.29 ^b ± 0.87	4.20 ^{a,b} ± 0.17	6.75 ^a ± 0.49	6.53 ^a ± 0.45	8.59 ^{a,b} ± 0.38	6.32 ^a ± 0.75	8.51 ^b ± 0.08	7.03 ^a ± 0.06
Melaza/Suero (T3)	6.35 ^b ± 0.54	4.30 ^a ± 1.5	6.57 ^a ± 0.16	6.57 ^a ± 0.16	7.65 ^b ± 0.57	5.96 ^a ± 0.37	8.70 ^{a,b} ± 0.09	5.83 ^b ± 0.12
Melaza/Biosile (T4)	6.94 ^b ± 0.08	4.45 ^a ± 0.23	6.92 ^a ± 0.22	6.79 ^a ± 0.22	8.84 ^a ± 0.12	6.70 ^a ± 0.33	8.92 ^a ± 0.22	5.83 ^b ± 0.06
Testigo	8.71 ^a ± 0.25	3.45 ^b ± 0.05	7.04 ^a ± 0.0	7.04 ^a ± 0.0	***	***	7.83 ^c ± 0.03	6.95 ^a ± 0.19
Concentración final (log10 UFC/g o NMP/g)								
FC								
Sorgo (T1,T2)	5.45 ^a ± 0.74	1.89 ^a ± 1.74	1.99 ^a ± 0.25	1.38 ^a ± 0.43	0 ^a	3.48 ^b ± 0.15	5.61 ^b ± 0.16	4.65 ^c ± 0.55
Melaza (T3, T4)	4.66 ^b ± 0.98	2.80 ^a ± 2.47	1.77 ^a ± 0.44	1.49 ^a ± 0.0	0 ^a	3.95 ^a ± 0.18	6.08 ^a ± 0.29	4.70 ^b ± 0.0
Testigo	3.56 ^c ± 0.03	2.11 ^a ± 0.09	1.49 ^a ± 0.0	1.49 ^a ± 0.0	***	***	6.04 ^{a,b} ± 0.13	5.30 ^a ± 0.02
FI								
Suero (T1, T3)	5.57 ^a ± 1.46	1.62 ^a ± 2.22	1.82 ^a ± 0.37	1.36 ^a ± 0.42	0 ^a	3.84 ^a ± 0.23	5.70 ^b ± 0.25	4.65 ^c ± 0.06
Bio-sile TM (T2, T4)	4.67 ^b ± 0.33	2.83 ^a ± 2.29	1.95 ^a ± 0.37	1.50 ^a ± 0.03	0 ^a	3.61 ^b ± 0.30	5.99 ^{a,b} ± 0.37	4.70 ^b ± 0.0
Testigo	3.56 ^c ± 0.03	2.11 ^a ± 0.09	1.49 ^a ± 0.0	1.49 ^a ± 0.0	***	***	6.04 ^{a,b} ± 0.13	5.30 ^a ± 0.02

Los resultados están expresados en log10 de ¹UFC o ²NMP de cada uno de los indicadores microbiológicos. ^{a, b} Medias dentro de la misma columna que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ***Información no disponible. (OCT, OCF) Organismos coliformes totales y fecales; (HyL) Hongos y Levaduras; (ENT) Enterococos; (BPAS) Bacterias productoras de ácidosulfúrico; (BMA) Bacterias mesófilas Aerobias; (BAL) Bacterias ácido lácticas.

Este resultado podría estar asociado a una mayor diversidad de BAL en el suero, lo que favorecería mayor acumulación de ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y sustancias diversas que producen estas bacterias (Parra 2010).

Con respecto al grado de relación entre variables, a través del análisis de chi cuadrado (X^2), se observaron relaciones significativas ($p < 0.05$) entre el pH de los microsilos y el contenido de algunos grupos de microorganismos como HyL, OCF, ENT, BAL y BPAS

De manera similar, a través del análisis de correlación, se corroboró que la disminución de algunos de los grupos indicadores está correlacionada significativamente ($p < 0.05$) con la disminución del pH, incluido el contenido de BMA ($\rho = 0.429$), OCT ($\rho = 0.850$), OCF ($\rho = 0.820$), ENT ($\rho = 0.667$) y BPAS ($\rho = 0.500$).

Por lo tanto, se puede inferir que el pH es una de las variables determinantes para la reducción de la carga microbiana de la excreta porcina.

La disminución del pH en la excreta se puede relacionar con la presencia de las BAL (principales responsables de la fermentación), que, aunque disminuyeron junto con el pH ($P = 0.514$, $p < 0.05$), al final del proceso fue el grupo de mayor abundancia en relación con el resto de los grupos indicadores evaluados.

Los resultados sugieren, por lo tanto, que es importante para el ensilaje de excretas porcinas mantener una abundancia relativa alta de BAL para lograr la reducción del pH y limitar la sobrevivencia de microorganismos no deseados.

CONCLUSIONES

El uso de bacterias ácido lácticas y una fuente de carbohidratos, como promotores para el establecimiento del ensilaje, resultó una estrategia efectiva para reducir la carga microbiana del estiércol porcino.

Los resultados se asociaron principalmente a la disminución del pH como factor determinante y que, a su vez, se relacionó directamente con la cantidad de BAL presentes en el proceso, que además se favoreció con la inclusión de sorgo como fuente alterna de carbohidratos.

La disminución de la carga microbiana del estiércol podría contribuir a la descontaminación de las excretas porcinas con fines de inclusión en un esquema de aprovechamiento y manejo integrado de residuos.

REFERENCIAS








- Axelsson L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (S. Salminen, A.V. Wright y A. Ouwehand, Eds.). Marcel Dekker, Nueva York, EUA, pp. 1-66.
DOI: 10.1201/9780824752033.ch1
- Borges G.L., Soria F.M. y Ruz F.N. (2003). Contenido de macronutrientes en sustratos de bagazo de henequén y excreta porcina y su efecto en el desarrollo de plántulas de papaya. Revista Chapingo serie Horticultura 9 (2), 291-304.
- Bórquez J.L., González M.S.S., Pinos R.J.M., Domínguez I. y Bárcena J.R. (2009). Feeding value of ensiling fresh cattle manure with molasses or bakery by-products in lambs. Livest. Sci. 122 (2-3), 276-280.
DOI: 10.1016/j.livsci.2008.09.009
- Bulkowska K., Pokoj T., Klimiuk E. y Gusiatiń Z.M. (2012). Optimization of anaerobic digestion of a mixture of *Zea mays* and *Miscanthus sacchariflorus* silages with various pig manure dosages. Bioresour. Technol. 125, 208-216. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.078
- Caballero H.A.I., Castrejón P.F., Martínez G.R., Ángeles C.S., Pérez R.M. y Buntin S.E. (2004). Survival and viability of *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* in ensiled swine faeces. Bioresour. Technol. 94 (2), 137-142.
DOI: 10.1016/j.biortech.2003.12.008
- Castellanos A.A., Salazar G.G., Hernández M.P., Domínguez A.G. y Barrera C.G. (2010). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación animal. Folleto para productores. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Tepatlán de Morelos, Jalisco, México, 21 pp.
- CONADESUCA (2016). Melazas de caña de azúcar y su uso en la fabricación de dietas para ganado. Consejo Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. Nota informativa, México, D. F., México, 9 pp.
- de la Torre A.I., Jiménez J.A., Carballo M., Fernández C., Roset J. y Muñoz M.J. (2000). Ecotoxicological evaluation of pig slurry. Chemosphere 41 (10), 1629-1635.
DOI: 10.1016/S0045-6535(00)00038-2
- FAO (2013a). Greenhouse gas emissions from pig and chicken supply chains – A global life cycle assessment. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia. [en línea] <http://www.fao.org/docrep/018/i3460e/i3460e00.htm> 06/04/2017
- FAO (2013b). Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains – A global life cycle assessment. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia. [en línea] <http://www.fao.org/docrep/018/i3461e/i3461e00.htm> 06/04/2017

- Galindo B.A.J., Domínguez A.G., Salazar G.G., Sánchez G.F.J. y Avalos C.M.A. (2012). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación animal. Memorias. Vamos al campo 2012. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, 19 de octubre, 2012, pp. 57-62.
- García A., León R., Míreles S., Castro J.P., García A.A., Roa J.J. y Guerrero L.A. (2010). Contaminación ambiental en explotaciones porcinas mexicanas e incumplimiento de la norma ambiental. Revista Computadorizada de Producción Porcina 17 (3), 243-246.
- Hansen A. y Schieberle P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. Trends Food Sci. Technol. 16 (1-3), 85-94.
DOI: 10.1016/j.tifs.2004.03.007
- Herrera C.J., Naranjo J.N., Almaraz A.N., Uribe S.N., y Rosas M.I. (2015). El ensilado. Proceso, manipulación y uso del ensilaje. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F., México, 114 pp.
- Hiriart L.M. (1984). Ensilaje, composición química, calidad fermentativa, valor nutritivo. Investigación y progreso agropecuario. Carillanca 3 (1-4), 28-30.
- Kim J.S., Lee Y.H., Kim Y.I., Ahmadi F., Oh Y.K., Park J.M. y Kwak W.S. (2016). Effect of microbial inoculant or molasses in fermentative quality and aerobic stability of sawdust-based spent mushroom substrate. Bioresour. Technol. 216, 188-195.
DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.056
- López Y., Arece J., León E., Aróstica N. y Ojeda F. (2008). Efecto de la inclusión de un ensilaje mixto en el comportamiento productivo de ovejas pelibuey en pastoreo. Pastos y Forrajes 31 (1), 73-82.
- Martínez V., García M.D. y Ly J. (2004). Estimados de excreción fecal de cerdos como material de ingreso en biodigestor y para composta. Revista Computadorizada de Producción Porcina 11, 283-289.
- Masse D., Gilbert Y. y Topp E. (2011). Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. Bioresour. Technol. 102 (2), 641-646.
DOI: 10.1016/j.biortech.2010.08.020
- McCarthy G., Lawlor P.G., Carney K.N., Zhan X., Gutierrez M. y Gardiner G.E. (2015). An investigation into the removal of *Salmonella* and enteric indicator bacteria from the separated liquid fraction of raw or anaerobically digested pig manure using novel on-farm woodchip biofilters. Sci. Total. Environ. 514, 140-146.
DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.036
- McDonald P., Henderson A.R. y Heron S.J.E. (1991). The biochemistry of silage. 2 ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, Reino Unido, 340 pp.
- Merry R.J., Lowes K.F. y Winters A. (1997). Current and future approaches to biocontrol in silage. Memorias. 8th Int. Symposium forage conservation, Brno. Research Institute of Animal Nutrition Ltd., Pohorelice, República Checa, 21 de septiembre al 1 de octubre, 1997, pp. 17-27.
- Moset V., Bertolini E., Cerisuelo A., Cambra M., Olmos A. y Cambra-López M. (2014). Start-up strategies for thermophilic anaerobic digestion of pig manure. Energy 74, 389-395. DOI: 10.1016/j.energy.2014.07.003
- Muck R.E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. Revista Brasileira de Zootecnia 39, 183-191. DOI: 10.1590/S1516-35982010001300021
- Navarro H.V., Olea R.M.A. y Torres V.M.R. (2009). *Clostridium perfringens* en alimentos cárnicos. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México, 176 pp.
- Ni K., Wang F., Zhu B., Yang J., Zhou G., Pan Y. y Zhong J. (2017). Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. Bioresour. Technol. 238, 706-715. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.04.055
- Oude S.J.W.H., Driehuis F., Gottschal J.C. y Spoelstra S.F. (1999). Silage fermentation processes and their manipulation. Memorias. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Electronic conference on tropical silage. 1 de septiembre al 15 de diciembre, 1999. [en línea] <http://www.fao.org/docrep/005/X8486E/x8486e09.htm> 20/02/2017
- Parra H.R.A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Rev. Bio. Agro 8 (1), 93-105.
- Pérez U.M., Amaro R.A. y Castro C.N. (2013). Manual integrado de la normatividad y métodos de detección y medición de organismos microbiológicos en alimentos como vegetales y frutas frescas, productos del mar y cárnicos de animales terrestres. Centro Nacional de Metrología, El Marqués, Querétaro, México, 244 pp.
- Philippe F.X. y Nicks B. (2015). Review on greenhouse gas emissions from pig houses: production of carbon dioxide, methane and nitrous oxide by animals and manure. Agr. Ecosyst. Environ. 199, 10-25. DOI: 10.1016/j.agee.2014.08.015
- Ruvalcaba G.J.M., Domínguez A.G., Salazar G.G., Arias C.L.E., Castellanos A.A., Hernández M.P., Romero J.J.H. y Ruiz A.C.R. (2011a). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación de vacas en lactación y su efecto sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. Memorias. XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, León, Guanajuato, México. 12 al 14 de octubre, 2011, pp. 184.
- Ruvalcaba G.J.M., Domínguez A.G., Salazar G.G., Arias C.L.E., Hernández M.P., Castellanos A.A. y Romero J.J.H. (2011b). Uso de ensilado de cerdaza en la alimentación de vacas lecheras y su efecto sobre las características higiénico-sanitarias de la leche. Memorias.

- XIII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. Universidad de Guadalajara, Puerto Vallarta, Jalisco, México. 3 al 5 de noviembre, 2011, pp. 113-116.
- Sadzawka R. A., Carrasco R. M. A., Grez Z. R. y Mora G. M.L. (2005). Métodos de análisis de compost. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas N° 30, Santiago, Chile, 142 pp.
- Sahlström L., Bagge E., Emmoth E., Holmqvist A., Danielsson-Tham M.L. y Albiñ A. (2008). A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 99 (16), 7859-7865. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.071
- Sánchez M. y González J.L. (2005). The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresour. Technol.* 96 (10), 1117-1123. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.10.002
- SIAP (2014). Resumen de la producción pecuaria en México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [en línea]. <https://www.gob.mx/siap/28/06/15>
- Smith S.R., Lang N.L., Cheung K.H. y Spanoudaki K. (2005). Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Manag.* 25 (4), 417-425. DOI: 10.1016/j.wasman.2005.02.010
- Steinfeld H., Gerber P., Wassenaar T., Castel V., Rosales C. y de Haan C. (2006). Livestock's long shadow: environmental issues and options. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [en línea] <http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.HTM> 20/01/2017
- Titterton M. y Barreba F.B. (2001). Ensilaje de gramíneas y leguminosas en los trópicos. Memorias. Uso de ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Conferencia electrónica sobre el ensilaje en los trópicos. 1 de septiembre al 15 de diciembre, 1999 [en línea]. <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s06.htm> 20/01/2017
- Weinberg Z.G. y Muck R.E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19 (1), 53-68. DOI: 10.1016/0168-6445(96)00025-3
- Woolford M.K. (1984). The silage fermentation. Vol. 14. Microbiological series. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EUA, 350 pp.
- Zhang D., Yuan X., Guo P., Suo Y., Wang X., Wang W. y Cui Z. (2011). Microbial population dynamics and changes in main nutrients during the acidification process of pig manures. *J. Environ. Sci.* 23 (3), 497-505. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60434-2
- Zhao H.Y., Li J., Liu J.J., Lü Y.C., Wang X.F. y Cui Z. (2013). Microbial community dynamics during biogas slurry and cow manure compost. *J. Integr. Agr.* 12 (6), 1087-1097. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60488-8
- Zhu J. (2000). A review of microbiology in swine manure odor control. *Agric. Ecosyst. Environ.* 78, 93-106. DOI: 10.1016/S0167-8809(99)00116-4

ORIGINAL
RESEARCH

Texture, physicochemical and sensory properties of artisanal Adobera cheese from Los Altos de Jalisco, a genuine Mexican cheese

JOSÉ M RUVALCABA-GÓMEZ,^{1,2}  HÉCTOR RUIZ-ESPINOSA,³ 
RAMÓN I ARTEAGA-GARIBAY,⁴  MARLON ROJAS-LÓPEZ,¹ 
GENARO G AMADOR-ESPEJO,⁵  LUIS M ANAYA-ESPARZA⁶  and
RAÚL J DELGADO-MACUIL^{1*} 

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala 90700, ²Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Av. Biodiversidad #2470, Tepatitlán de Morelos, Jalisco C.P. 47600, ³Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Edificio 106H, Av. Sn. Claudio y 18 sur, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Puebla 72570, ⁴Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Boulevard de la biodiversidad #400, Tepatitlán de Morelos, Jalisco C.P. 47600, ⁵Cátedras CONACYT-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala 90700, and ⁶Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Av. Rafael Casillas Aceves 1200, Tepatitlán de Morelos, Jalisco 47600, Mexico

Physicochemical and sensory properties of Adobera, a genuine, understudied Mexican raw-milk cheese, were explored by analysing commercial samples from different manufacturers and seasons. Composition-wise, Adobera could be considered a fresh cheese with a high moisture content (42.5%), although its relatively low water activity (0.953) and pH (5.14) and high free amino acid content (0.46 mmol/g, dry basis) could indicate otherwise. Instrumental texture corresponded to that of a semifirm cheese, while its colour was whitish-to-ivory. Both texture and composition were significantly affected by sampling season and cheese composition, while some attributes of sensory acceptability significantly varied with brand.

Keywords Mexican cheese, Texture profile, Chemical composition, Raw milk.

INTRODUCTION

Around 343 000 tons of cheese are produced annually in Mexico (SAGARPA 2016). Over 40 varieties have been categorised as artisanal, several of which are produced with raw, nonstandardised milk (Cervantes and Villegas de Gante 2012). Highly acceptable sensory-wise, these cheeses are frequently manufactured by micro- and small businesses located in rural communities through processes with low degree of technification (Pomeón and Cervantes 2010; Villegas de Gante and Cervantes 2011). As a result, cheese safety could be compromised, and quality features could be difficult to control, as cheese composition may vary from batch to batch and with the manufacturing season.

Important efforts for characterising and preserving Mexican cheeses have been carried out by local authorities, organisations of artisanal cheesemakers and research groups (Cervantes *et al.* 2008; Grass *et al.* 2013; Solís *et al.* 2013; Aldrete *et al.* 2014; Grass and Cesín 2014; Ruvalcaba *et al.* 2014; Villegas de Gante *et al.* 2014). Some successful cases stand out, as the identity of some cheeses has been protected through collective marks (e.g., Cotija cheese) (Yescas 2013). However, the information available on most genuine artisan Mexican cheeses is either limited or nonexistent; thus, research on what makes each cheese unique is paramount to help establish desirable physicochemical features, standard making procedures, and, in the end, regulations (Gonzalez *et al.* 2016). So far,

*Author for
correspondence. E-mail:
rdelgadam@ipn.mx

most of the available reports on artisanal Mexican cheeses are mainly focused on describing their microbiota or in testing their microbial quality, either for showing their microbiological safety (Palacios 2006; Romero *et al.* 2009; Cervantes *et al.* 2013) or oriented towards the development of protocols to improve cheese quality (Flores *et al.* 2011; Caro *et al.* 2013; Castro *et al.* 2013; Aldrete *et al.* 2014). Reports documenting the historical context, evolution, geographical distribution and peculiarities of specific Mexican cheese varieties abound (Villegas de Gante and Cervantes 2011; Cervantes and Villegas de Gante 2012; Grass *et al.* 2013; Grass and Cesín 2014; Yescas 2013). However, studies on Adobera cheese are scarce and mainly oriented to evaluate its microbiological safety (Torres *et al.* 2012; Ruvalcaba *et al.* 2016; Ruvalcaba *et al.* 2017). This cheese is mostly produced in the municipalities of Los Altos de Jalisco, a region with humid, subtropical climate and one of the biggest milk producer regions in Mexico (Cervantes *et al.* 2016). A fresh to lightly ripened type of *Pasta Filata* cheese, Adobera (Figure 1), is made from raw Holstein cow milk and acidified by its native lactic acid bacteria (LAB). Adobera cheese production protocol (Figure 2) comprises the following operations: raw milk reception, standardisation to 3% milk fat (not frequently made), rennet coagulation (1:10 000 rennet:milk ratio), cutting of coagulum (it used to be performed using wooden shovel but recently it has been replaced by stainless steel lyres), stirring (to brake the coagulum and promote syneresis) and removal of whey. A crucial step to produce Adobera cheese is cheddaring (18–24 h at room temperature or under refrigeration at 4–7 °C), which causes a drastic decrease in pH. Finally, acidified curd is salted (1–2% NaCl), milled, moulded (using moulds made of stainless steel, plastic or, to a lesser extent, wood) and pressed (usually with screw press) for 1–7 h. After the elaboration process, cheese is lightly ripened for up to 96 h and then packed in polyethylene plastic film, labelled and kept at 4 °C until distributed or sold (Cervantes *et al.* 2008; Villegas de Gante *et al.* 2014). The final product exhibits a whitish-to-yellowish colour, a grainy paste that becomes firmer when slightly aged, and, because of its low pH, melts upon heating (Cervantes *et al.* 2008; Cervantes and Villegas de Gante 2012). Recently, Murugesan *et al.* (2018) identified melting and nonmelting Adobera cheese varieties providing information on both bacterial (*Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) and fungal (*Saccharomyces* sp., *Scheffersomyces* sp., *Galactomyces* sp.) communities found on them; proteobacteria from the genus *Marinomonas* sp. were also abundant, especially in the nonmelting type. Cheese composition was also reported, ranging from 39.24 to 44.28%, 38.86 to 47.72% and 34.81 to 39.12% for moisture, fat in dry matter and protein in dry matter, respectively. However, no data on cheese pH and other important physicochemical parameters were given. As authenticity has become a major food trend,

Adobera cheese consumption and marketing area have been increasing in recent times (Cervantes *et al.* 2016). Consequently, it is essential to identify key physicochemical features of raw-milk cheeses as a preliminary step towards developing safer pasteurised alternatives. Thus, this study was aimed to depict the gross composition, free amino acid (FAA) content as a ripening index, instrumental colour, texture profile, water activity, sensory acceptability and pH of commercial raw-milk Adobera cheeses from Los Altos de Jalisco region, analysing possible seasonal and brand differences.

MATERIALS AND METHODS

Cheese samples were obtained from five cheese factories from Los Altos de Jalisco region. Only factories manufacturing raw-milk cheeses, containing no food additives and prepared according to the traditional procedure described above (Cervantes *et al.* 2008; Villegas de Gante *et al.* 2014) were selected. As cheese characteristics could be subjected to seasonal variations, sample collection was done in both dry (November to May) and rainy (June to October) seasons. Cheese samples from three different processing batches were randomly selected from each manufacturer and kept under refrigeration (4 °C) for no longer than 48 h until used.

Cheese composition

Gross composition was determined in duplicate on 3–4 days ripened Adobera cheeses. Moisture (oven drying at 102 ± 1 °C), fat (Gerber method) and protein (Kjeldahl method) contents were analysed according to standard methods (Wehr and Frank 2004).

Free amino acid content

Free amino acid content of Adobera cheese samples was determined as a proteolysis indicator measuring their colorimetric reaction with the Cd-ninhydrin reagent (Wick *et al.* 2004). Reaction mixtures were deposited in microtiter plates and measured in a Multiscan™ FC spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 490 nm; FAA concentration was calculated from the absorbance values based on a calibration curve prepared with a standard leucine (Leu) solution. Samples were analysed with duplicates and results were expressed as mmol of Leu per g of moisture-free cheese.

pH

Cheese pH was measured with a Denver™ B-10 potentiometer (Denver instrument, NY) equipped with a previously calibrated flat-tip electrode. Ten grams of finely grated Adobera cheese was mixed with 20 mL of distilled water and pH measurements were made in duplicate from the supernatant.



Figure 1 Artisanal Adobera cheese from Los Altos de Jalisco, México. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Water activity

Samples of each cheese (10 g) were finely grated and used to determine water activity (A_w) in duplicate using a previously calibrated Aqualab™ Series 3 dew-point hygrometer (Decagon, Pullman, WA) (AOAC 1996).

Cheese surface colour analysis

Tristimulus colour was determined in 4×5 cm rectangular cheese sections using a Colorflex EZ (HunterLab™, Reston, VA, USA) colorimeter in the Hunter L , a , b colour space (where L = brightness, a = red–green, b = blue–yellow), with a D65 illuminant and 10° observer angle. Four measurements of each cheese piece were collected, two corresponding to its rind and two from its internal section. Hue angle and chroma values were calculated as the inverse tangent of b^*/a^* ratio and as $(a^2 + b^2)^{1/2}$, respectively (Wadhvani and McMahon 2012).

Texture profile analysis

Texture profile analysis of cheese was carried out in a TA.XT Plus™ texturometer (Stable MicroSystem Ltd., Surrey, UK) using cylindrical samples (2.0 cm high and 1.6 cm diameter). Samples were compressed twice at 50% height with a 2.4 cm diameter cylindrical probe at 3 mm/s, with a 5 s delay between compressions. Hardness, cohesiveness, springiness and resilience values were calculated from the corresponding force vs distance curves, while chewiness was calculated as the product of hardness, cohesiveness and springiness with the software of the device (Texture Exponent 32) (Delgado *et al.* 2011).

Sensory evaluation

In order to obtain basic information about the sensory characteristics of Adobera cheese, a consumer acceptability test was conducted. Commercial Adobera cheese samples from rainy season were obtained from the same cheese factories and evaluated. All cheeses had been ripened for 3 days at the time of evaluation. Visual impression, tactile texture, aroma, taste, buccal texture and overall impression of

Adobera cheese were evaluated using a nonstructured 9-cm hedonic scale (0 = dislike extremely, 9 = like extremely). (Pedrero and Pangborn 1997; Stone *et al.* 2012; Civille and Carr 2015). The evaluation was conducted in four rounds (1 randomised sample per round) with 28 untrained panellists including both students and staff members from our institution and cheesemakers (men and women, age range of 20–45 years). All panellists were preselected as regular (at least weakly) Adobera cheese consumers. Each round, the panellist received a wedge-shaped cheese portion for visual evaluation and four cubic-shaped portions (1.5 cm³) for tactile texture, aroma, taste and buccal texture evaluation; cheese samples were tempered at 25 °C for 1-h prior to evaluation in individual booths using white fluorescent light. Unsalted crackers and water were provided for mouth rinsing between samples.

Statistical analysis

A general linear model (GLM) analysis followed by Tukey's pairwise mean comparisons ($P < 0.05$) was conducted on collected data in SAS™ 9.0 statistical package (SAS Institute Inc., NC, USA) to assess brand and seasonal differences between cheese samples. A correlation procedure was performed to identify associations between cheese attributes. Sensory data were analysed by one-way ANOVA test with Tukey's test for pairwise comparisons ($P < 0.05$) using the same statistical software. The graphs obtained from the texture profile analysis of the cheeses were analysed in Origin® ver. 8.0 software (OriginLab, Northampton, MA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Adobera cheese is a staple of the central-western Mexican cuisine; Villegas de Gante *et al.* (2014) reported that cheesemakers in this region processed an average daily volume of 4700 L of milk, mostly used for Adobera cheese production, with yields ranging from 9 to 12 g/100 g of milk. Cheeses used in this study came from both small to medium

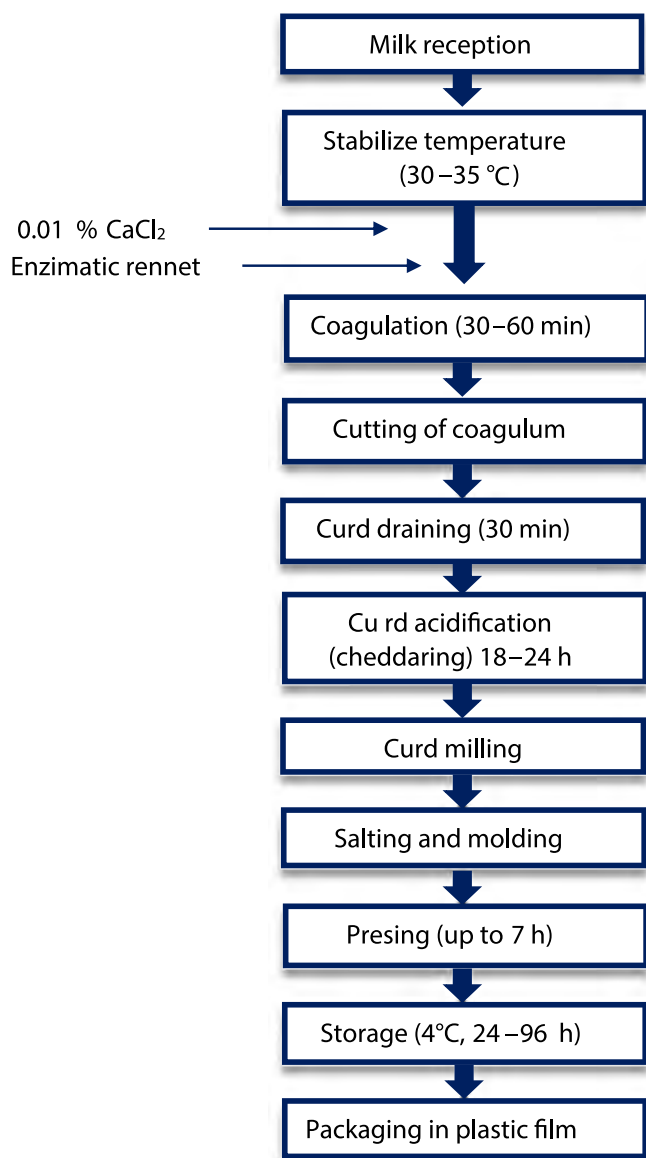


Figure 2 Generalized flow chart of artisanal Adobera cheese from Los Altos de Jalisco production. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

scale production sites using average milk volumes between 200 L and 35 000 L daily. The making procedure followed for preparing all sampled cheeses in the five chosen sites was very similar and complied with the standard protocol previously described (Cervantes *et al.* 2008; Villegas de Gante *et al.* 2014). The reported shelf life of the cheeses used ranged from 15 to 40 days. Although quality controls are not always implemented, most producers confirmed that they quantified fat, protein and moisture contents, freezing point and somatic cell count upon receipt on the milk used to produce cheese; besides, milk was checked for absence of antibiotics (data not shown).

Cheese composition

Composition data and physicochemical properties of sampled Adobera cheeses from both dry and rainy seasons are shown in Table 1. According to the results, Adobera cheese could be defined as a semihard, unripened/fresh cheese, based on its moisture content on a fat-free basis (MFFB, 66%) (CODEX STAN 283-1978). Fat and moisture were the most variable components in cheese samples, ranging from 36.43% to 49.21%, and 37.73% to 48.35%, respectively. Significant differences ($P < 0.05$) in fat content were observed between brands; however, there was no significant difference in the average content of this parameter between seasons. Meanwhile, average moisture content in cheese was significantly ($P < 0.05$) higher in dry season cheeses; cheeses from brand 5 stood out as the difference in moisture content between dry and rainy seasons on cheese was close to 8%. Besides, significant differences between the brands in cheese composition were observed ($P < 0.05$). Differences in cheese composition between brands might be attributed to slight modifications in the cheesemaking protocol (including curd cutting time and rate and extent of syneresis) or seasonal variations in cheese milk composition.

Dry season samples exhibited significantly ($P < 0.05$) higher average pH values (5.18) than those of rainy season samples (5.09); the pH of the sampled cheeses ranged from 5.05 to 5.36 and from 4.93 to 5.21 in dry and rainy seasons, respectively; however, only cheeses from brand 1 showed significant pH differences between seasons. The pH in raw-milk cheese depends on several factors, including milk microbiota and cheese composition (which is greatly affected by variations in the making procedure). In Mexico, raw milk usually comes from small-scale, family-owned farms, (grass-fed cattle supplemented mainly with cutting-forages, corn silage and grain-based concentrates in the stable); the prevalence of inadequate hygiene practices during milk production has been proven to negatively affect milk quality microbial wise (Cervantes *et al.* 2001; Ruvalcaba *et al.* 2011). During the rainy season, an increase in humidity and average temperature favours microbial proliferation; thus, lower pH values are usually expected. In most cheese types, remaining lactose in curd cheese is converted to lactic and other organic acids, and the lactic acid:milk buffering compounds ratio determine cheese pH. Acid production rate has an additional effect on cheese pH, as it could enhance syneresis during curd handling and pressing, resulting in greater losses of moisture and colloidal calcium phosphate (Walstra *et al.* 2006). Variations in artisanal cheese pH may also be related to a more heterogeneous bacterial population in raw milk compared to pasteurised cheese milk, and, consequently, with a greater exogenous proteolytic and lipolytic activity, mostly attributed to native LAB. Low pH values (especially below 5.0) in artisanal cheeses might be a useful factor for pathogen control (Torres *et al.* 2012; Ruvalcaba *et al.* 2018).

Table 1 Physicochemical composition of different artisan Adobera cheese brands from Los Altos de Jalisco*

Brand	Season	Protein [†] (% wt/wt)	Fat [†] (% wt/wt)	Water content			
				(%, wt/wt)	Water activity	pH	FAA [†] (mmol/g)
1	Dry	33.42 ^{a,B} (±4.17)	42.74 ^{b,B} (±4.86)	42.15 ^{a,B} (±1.99)	0.968 ^{a,A} (±0.004)	5.36 ^{a,A} (±0.09)	0.36 ^{b,C} (±0.11)
	Rainy	34.81 ^{a,A} (±3.72)	44.09 ^{a,A} (±2.98)	40.89 ^{a,B} (±3.21)	0.941 ^{b,C} (±0.005)	5.18 ^{b,A,B} (±0.05)	0.45 ^{a,A,B} (±0.28)
2	Dry	30.64 ^{b,A,B} (±0.04)	36.43 ^{b,C} (±2.468)	48.35 ^{a,A} (±1.16)	0.954 ^{a,A,B} (±0.007)	5.06 ^{a,B} (±0.04)	0.53 ^{a,A} (±0.17)
	Rainy	35.61 ^{a,A} (±3.06)	40.43 ^{a,A} (±6.44)	47.47 ^{b,A} (±2.37)	0.953 ^{a,A} (±0.003)	5.01 ^{a,B,C} (±0.11)	0.57 ^{a,A} (±0.37)
3	Dry	30.06 ^{a,B} (±6.33)	42.81 ^{a,B} (±1.62)	44.37 ^{a,B} (±1.31)	0.969 ^{a,A} (±0.002)	5.18 ^{a,B} (±0.04)	0.37 ^{a,B,C} (±0.12)
	Rainy	36.82 ^{a,B} (±2.34)	41.51 ^{a,A} (±5.07)	41.78 ^{a,B} (±3.79)	0.947 ^{b,A,B} (±0.002)	5.21 ^{a,A} (±0.09)	0.38 ^{a,B} (±0.16)
4	Dry	36.45 ^{a,B} (±5.91)	49.21 ^A (±2.47)	45.50 ^{A,B} (±3.95)	0.947 ^B (±0.001)	5.05 ^B (±0.01)	0.32 ^C (±0.11)
	Rainy	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	Dry	39.25 ^{a,A} (±3.12)	43.84 ^{a,B} (±1.78)	45.52 ^{a,A,B} (±0.88)	0.955 ^{a,A,B} (±0.009)	5.20 ^{a,A,B} (±0.04)	0.46 ^{b,A,B} (±0.11)
	Rainy	37.57 ^{b,A} (±1.92)	41.36 ^{a,A} (±0.57)	37.73 ^{b,B} (±0.01)	0.945 ^{a,B,C} (±0.003)	4.93 ^{b,C} (±0.08)	0.63 ^{a,A,B} (±0.31)
Dry season		34.25 ^a (±5.77)	42.27 ^a (±4.71)	45.13 ^a (±2.86)	0.958 ^a (±0.009)	5.18 ^a (±0.13)	0.42 ^b (±0.15)
Rainy season		35.92 ^a (±2.87)	41.71 ^a (±4.82)	43.32 ^b (±4.44)	0.947 ^b (±0.005)	5.09 ^b (±0.14)	0.50 ^a (±0.29)
Average composition		34.96 (±3.40)	42.49 (±3.14)	43.75 (±2.07)	0.953 (±0.004)	5.14 (±0.06)	0.46 (±0.22)

^{a,b}Means between seasons of each brand with different superscripts are different ($P < 0.05$). ^{A,B,C}Brands in the same season with different superscripts are different ($P < 0.05$). NA: Data not available. *Values reported as a percentage on the dry basis. [†]Results are expressed as mean standard deviation.

As it happened with pH, dry season samples displayed significantly ($P < 0.05$) higher average Aw values (0.958) than those of rainy season samples (0.947), with only brands 1 and 3 exhibiting seasonal variations. As raw-milk cheese consumption could represent a health hazard, factors such as pH and Aw, along with LAB competition, are of key importance for controlling pathogen survival in lightly ripened cheeses such as Adobera. Differences in Aw and, to a lesser degree, pH between rainy and dry seasons cheeses could be related to their salt and FAA content. While salt content in directly salted cheeses such as Adobera is mostly affected by pressing, changes in FAA concentration arises from variations in native and exogenous enzymatic activity usually affected by cheese ripening conditions and microbiota which, in turn, can be influenced by environmental seasonality.

Free amino acid content in cheese is used as an indicator of proteolysis induced by native milk enzymes (including plasmin and cathepsin D), coagulant agent (like chymosin and other microbial proteinases commonly used) and cheese microbiota (Kelly *et al.* 2006; Law and Tamime 2010). As shown in Table 1, rainy season cheeses for all brands exhibited a higher FAA content than their dry-season counterparts, although the difference between means was only significant ($P < 0.05$) for brands 1 and 5. The average FAA content for dry season cheeses was 0.42 mmol/g vs 0.54 mmol/g cheese (dry basis) for rainy season cheeses. Because of its artisanal process and the milk used, a high incidence of both starter and nonstarter LAB and several

contaminant microorganisms could directly contribute to FAA content in Adobera cheese by increasing microbial contribution to peptidolysis and proteolysis. As previously stated, seasonality may affect cheese proteolysis rate because of a higher average environmental temperature and humidity. Modifications in this hydrolytic reaction could modify quality characteristics of the final product, as proteolysis is considered the most complex and important primary biochemical change affecting texture and flavour formation in cheese (O'Brien *et al.* 2017). Free amino acid concentrations resemble those recently reported by Sulejmani and Hayaloglu (2017) for an artisanal, white-brined, raw-milk cheese when lightly ripened (0.4 mg Leu/g cheese). Although Adobera cheese is only slightly aged, some peculiarities of its making procedure, including the prolonged curd acidification, and its high humidity content are factors that favour the FAA accumulation, reaching relatively high levels of proteolysis, which could be associated with its characteristic intense flavour.

Texture Profile Analysis (TPA)

Texture profiles of Adobera cheese samples are shown in Table 2. Significant differences ($P < 0.05$) in cheese texture attributes were found between sampling seasons for all attributes evaluated; in general, dry season cheeses were harder and more elastic, resilient and cohesive than their rainy-season counterparts; in consequence, chewiness, the overall work required for the double compression, was also higher in dry season cheeses. Besides, all texture parameters

Table 2 Texture profile analysis of different artisan Adobera cheese brands from Los Altos de Jalisco, Mexico*

Brand	Season	Hardness (kg)	Cohesiveness (–)	Springiness (–)	Chewiness(kg)	Resilience (–)
1	Dry	1.76 ^{a,A} (±0.42)	0.58 ^{a,A} (±0.03)	0.76 ^{a,A} (±0.06)	0.77 ^{a,A} (±0.23)	0.22 ^{a,A,B} (±0.02)
	Rainy	1.62 ^{a,A} (±0.21)	0.32 ^{b,B} (±0.10)	0.56 ^{b,A} (±0.08)	0.31 ^{b,A} (±0.17)	0.13 ^{b,A} (±0.04)
2	Dry	1.60 ^{a,A,B} (±0.40)	0.41 ^{a,B} (±0.07)	0.69 ^{a,B} (±0.10)	0.47 ^{a,B} (±0.20)	0.27 ^{a,A} (±0.16)
	Rainy	1.15 ^{b,B,C} (±0.36)	0.40 ^{a,A} (±0.07)	0.58 ^{b,A} (±0.06)	0.28 ^{b,A} (±0.12)	0.15 ^{a,A} (±0.03)
3	Dry	0.86 ^{a,C} (±0.39)	0.57 ^{a,A} (±0.14)	0.70 ^{a,B} (±0.12)	0.32 ^{a,B,C} (±0.16)	0.23 ^{a,A,B} (±0.07)
	Rainy	0.85 ^{a,C} (±0.22)	0.39 ^{b,A,B} (±0.06)	0.61 ^{b,A} (±0.04)	0.20 ^{b,A,B} (±0.04)	0.15 ^{b,A} (±0.03)
4	Dry	1.93 ^A (±0.40)	0.57 ^A (±0.03)	0.77 ^A (±0.15)	0.91 ^A (±0.37)	0.24 ^{A,B} (±0.02)
	Rainy	NA	NA	NA	NA	NA
5	Dry	1.14 ^{a,B,C} (±0.27)	0.38 ^{a,B} (±0.05)	0.52 ^{a,B} (±0.08)	0.23 ^{a,C} (±0.10)	0.23 ^{a,B} (±0.03)
	Rainy	1.40 ^{a,A,B} (±0.22)	0.15 ^{b,C} (±0.02)	0.38 ^{b,B} (±0.06)	0.08 ^{b,B} (±0.02)	0.08 ^{b,B} (±0.01)
Dry season		1.43 ^a (±0.54)	0.50 ^a (±0.12)	0.68 ^a (±0.22)	0.51 ^a (±0.40)	0.22 ^a (±0.09)
Rainy season		1.20 ^b (±0.38)	0.33 ^b (±0.17)	0.55 ^b (±0.11)	0.22 ^b (±0.13)	0.13 ^b (±0.05)
Average texture		1.37 (±0.32)	0.43 (±0.08)	0.62 (±0.07)	0.39 (±0.14)	0.18 (±0.06)

^{a,b}Means between seasons of each brand with different superscripts are different ($P < 0.05$). ^{A,B,C}Brands in the same season with different superscripts are different ($P < 0.05$). NA: Data not available. *Values reported as a percentage on the dry basis. Results are expressed as mean standard deviation.

exhibit significant ($P < 0.05$) differences between brands, cheese hardness values ranged from 0.86 to 1.93 kg and 0.85 to 1.62 kg; cohesiveness ranged from 0.38 to 0.58 and 0.15 to 0.40, and springiness ranged from 0.52 to 0.77 and 0.38 to 0.58 for dry season and rainy season cheeses, respectively. Such differences could be related to variations in cheese composition, as it has been proven elsewhere. Álvarez *et al.* (2007) reported both positive and negative correlations between goat cheese chemical composition and selected instrumental texture parameters; hardness was reported to be positively correlated to fat and negatively to water content and on the contrary, both cohesiveness and springiness were positively correlated to water content and negatively correlated with both fat and protein contents. The authors considered that as water content augmented, the force exerted by the internal cheese bonds was stronger thus increasing cheese cohesiveness. Seasonal differences between Adobera cheese samples could be strongly associated with differences in cheese milk composition and milking and handling practices, which in turn affect Adobera cheese composition. Similarly, Lawlor *et al.* (2001) reported significant correlations between cheese texture and composition attributes; for example, protein content in cheese positively correlated with firmness and chewiness but negatively with gumminess, while water content in cheese was positively correlated to chewiness, but negatively with gumminess. Fat content was reported to negatively affect gumminess and chewiness values. Some other components in the cheese such as calcium and ash can favour attributes such as firmness, gumminess and chewiness, while pH also exhibited a negative correlation with firmness and chewiness scores. In this study, through correlation analysis, we

observed that some texture attributes, including chewiness, springiness and resilience, could be defined by FAA content ($P < 0.05$), while FAA was correlated with water content in the cheese ($P < 0.05$). Water content also exhibited correlations with colour profile of the cheese, negatively impacting on the *L*, *a* and *b* scores, and consequently on chroma values, but positively on the hue values of colour ($P < 0.05$). Positive correlations were also observed between pH and cohesiveness, springiness and resilience of cheese samples. In that context, we previously observed, for Adobera cheese, that LAB content had a positive effect in pH reduction, correlated to a higher FAA concentration while playing an important role on the sensory profile of cheese; thus, LAB content showed a negative correlation with gumminess, resilience and FAA content; meanwhile, FAA was negatively correlated with pH, resilience, gumminess, chewiness and hardness in Adobera cheese (Ruvalcaba *et al.* 2016); which strengthens the hypothesis of pH as determinant for Adobera cheese control quality. Cheese pH also controls the dissolution rate of colloidal calcium phosphate (CCP) from the casein micelles.

Cheese colour

Colour scores for Adobera cheese samples are shown in Table 3. Rainy season Adobera cheeses were brighter and yellower than cheeses from the dry season; average hue scores were 81° to 83° for dry and rainy season cheeses, respectively; meanwhile, chroma for rainy season cheeses was higher than those of dry season. Hue values close to 90° in cheese indicates that it possesses an ivory to a yellowish colour. Correlation values shown that fat content in cheese was negatively correlated with luminosity (*L**) scores

Table 3 Colour values of different artisan Adobera cheese brands from Los Altos de Jalisco, Mexico*

Brand	Season	L	a	b	Colour ($^{\circ}$ hue)	Chroma
1	Dry	84.51 ^{a,B} (± 1.37)	2.59 ^{b,A} (± 0.49)	19.29 ^{b,B} (± 1.52)	82.36 ^{a,B} (± 1.37)	19.47 ^{a,B} (± 1.53)
	Rainy	84.93 ^{a,C} (± 0.49)	4.90 ^{a,A} (± 2.03)	25.66 ^{a,A} (± 1.50)	79.21 ^{b,B} (± 4.45)	26.19 ^{b,A} (± 1.48)
2	Dry	89.46 ^{a,A} (± 0.70)	1.44 ^{b,B} (± 0.13)	16.74 ^{b,C} (± 1.78)	85.03 ^{a,A} (± 0.87)	16.80 ^{a,C} (± 1.77)
	Rainy	89.19 ^{a,A,B} (± 0.65)	2.50 ^{a,B} (± 0.18)	19.66 ^{a,B} (± 1.55)	82.73 ^{b,A} (± 0.44)	19.82 ^{b,B} (± 1.55)
3	Dry	89.02 ^{b,A} (± 0.95)	2.53 ^{b,A} (± 0.37)	15.86 ^{b,C} (± 1.47)	80.90 ^{a,C} (± 1.44)	16.06 ^{a,C} (± 1.48)
	Rainy	90.05 ^{a,A} (± 0.70)	3.30 ^{a,B} (± 0.24)	20.18 ^{a,B} (± 0.71)	80.72 ^{b,A} (± 0.55)	20.45 ^{b,B} (± 0.72)
4	Dry	84.47 ^B (± 1.23)	2.55 ^A (± 0.37)	21.77 ^A (0.77)	83.31 ^B (± 1.06)	21.92 ^A (± 0.75)
	Rainy	NA	NA	NA	NA	NA
5	Dry	90.08 ^{a,A} (± 0.69)	1.73 ^{b,B} (± 0.17)	15.05 ^{b,C} (± 1.06)	83.44 ^{a,B} (± 0.69)	15.15 ^{a,C} (± 1.06)
	Rainy	88.77 ^{b,B} (± 2.09)	2.89 ^{a,B} (± 0.09)	17.74 ^{a,C} (± 0.86)	80.73 ^{b,A,B} (± 0.50)	17.97 ^{b,C} (± 0.85)
Dry season		87.78 ^a (± 2.62)	2.13 ^b (± 0.59)	17.42 ^b (± 2.69)	83.00 ^a (± 1.79)	17.56 ^a (± 2.70)
Rainy season		88.51 ^b (± 2.14)	3.30 ^a (± 1.23)	20.63 ^a (± 2.93)	81.02 ^b (± 2.32)	20.91 ^b (± 3.05)
Average		88.09 (± 2.38)	2.62 (± 0.91)	18.77 (± 2.81)	82.17 (± 2.05)	19.24 (± 2.88)

^{a,b}Means between seasons of each brand with different superscripts are different ($P < 0.05$). ^{A,B,C}Brands in the same season with different superscripts are different ($P < 0.05$). NA: Data not available.*Values reported as a percentage on the dry basis. Results are expressed as mean standard deviation.

and water content could negatively affect red and green (a^*), and yellow and blue (b^*) proportions and therefore, hue and chroma scores ($P < 0.05$). Slight differences found between brands and seasons could also be associated with higher carotene contents in diets of dairy cows (Hernández *et al.* 2010). Moreover, cheese colour could also be influenced by the integrity of casein particles in cheese and the extent of proteolysis; these parameters, that have also been proven to affect other cheese quality features such as body, texture and melt/stretch, are influenced by both physico-chemical features (ionic strength) and making procedure/ripening characteristics, such as pH development and temperature (Singh *et al.* 2003; Gómez *et al.* 2015). In overall, cheese colour is a key parameter that helps define cheese traits, thus aiding to differentiate Adobera from other cheese varieties.

Sensory analysis

Acceptability test results (Figure 3, Table 4) showed significant differences between cheese brands for appearance and taste ($P < 0.05$), but not for tactile impression, aroma, texture and overall impression. The observed average scores for all the attributes ranged from 5.2 to 7.2. Cheese 2 obtained a significantly higher score for appearance and the highest mean scores for tactile impression, aroma, texture and overall impression meanwhile cheese brand number 1 obtained the best mean score for taste. Correlation analysis (Figure 4) showed that appearance was mainly positive correlated ($r \geq 0.75$) to colour, cohesiveness, chewiness, resilience, water content, water activity and overall impression; tactil impression was positively correlated to colour, fat, water activity, FAA and appearance;

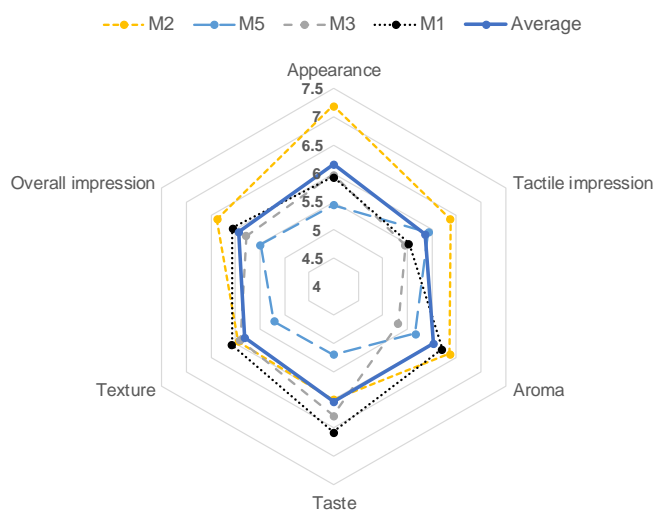


Figure 3 Mean scores of sensory acceptability test of different artisanal Adobera cheese brands from Los Altos de Jalisco, Mexico. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

but negatively with pH. Cheese aroma was also positively correlated to chewiness and overall impression but negatively with protein content. Meanwhile, cheese taste positively correlated with chroma scores, cohesiveness, springiness, chewiness, resilience, fat, pH and texture; but negatively with protein and FAA content. Perceived texture was positively correlated to instrumental cohesiveness, springiness, chewiness and resilience values, as well as to water content and pH, but negatively with protein and FAA content. Finally, correlation analysis showed that overall impression of cheese is mainly influenced by

Table 4 Sensory acceptability for different artisan Adobera cheese Brand from Los Altos de Jalisco

Attributes	Cheese sample			
	M1	M2	M3	M5
Appearance	5.9±2.0 ^b	7.2±1.3 ^a	6.0±1.9 ^b	5.4±2.1 ^b
Tactile impression	5.5±2.0 ^a	6.4±2.2 ^a	5.5±2.3 ^a	5.9±2.0 ^a
Aroma	6.2±1.9 ^a	6.4±1.8 ^a	5.3±2.1 ^a	5.7±2.0 ^a
Taste	6.6±1.9 ^a	6.0±1.8 ^{a,b}	6.3±1.8 ^{a,b}	5.2±2.2 ^b
Texture	6.1±2.1 ^a	5.9±1.5 ^a	5.9±2.2 ^a	5.2±2.2 ^a
Overall impression	6.1±1.4 ^a	6.4±1.2 ^a	5.8±1.6 ^a	5.5±1.7 ^a

^{a,b}Different superscript letters in the same line indicate significant differences between means ($P < 0.05$).

cohesiveness, springiness, chewiness, resilience, water content, appearance, aroma and texture; but can be negatively affected by protein content.

CONCLUSIONS

Quality attributes of Adobera cheese, an artisanal Mexican cheese, could be affected by small variations in the make procedure and seasonality. Adobera can be described as a yellowish to ivory semihard, unripened/fresh cheese. Both texture and composition of Adobera cheese were influenced by season. Rainy season cheeses exhibited lower pH values in comparison to those produced during the dry season, resulting in a decrease in proteolysis extent and the scores of most instrumental texture attributes (hardness, cohesiveness, springiness, chewiness and resilience). Acceptability test showed important similarities in sensory impressions of different Adobera cheese brands, with only appearance and taste exhibiting significant differences. The characterisation of Adobera cheese attributes will help to better define their most sought-after features and the standardised manufacturing procedure needed to develop them.

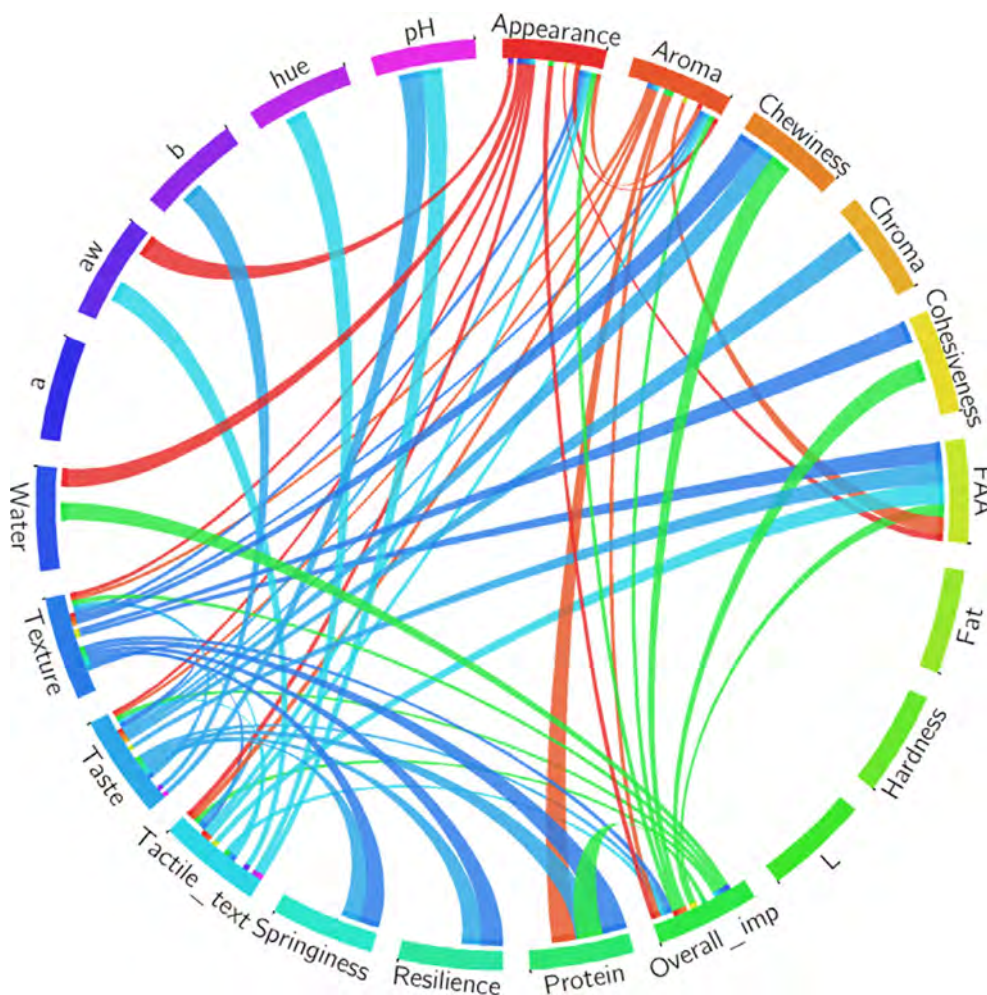


Figure 4 Schematic representation of Pearson correlations between sensory attributes of artisanal Adobera cheese with its texture and composition. Correlations ($r \geq 0.75$) are represented by bonds. Stronger correlations are represented by thicker bonds (Created with: Circos Table Viewer v0.63-9). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the participant Adobera cheese producers from Los Altos de Jalisco that took part in the project, their facilities for sampling and providing key information on the cheese process. We would also like to thank staff and students of the Food Engineering Laboratory at BUAP for their support in complementary cheese analyses. Author Ruvalcaba acknowledges the National Council of Science and Technology (CONACYT) from Mexico for its support through the National Scholarship Program.

REFERENCES

- Aldrete T T A, Escobar R M C, Tamplin M L and Hernández I M (2014) High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology* **44** 136–141.
- Álvarez S, Rodríguez V, Ruiz M E and Fresno M (2007) Correlaciones de Textura y colour instrumental con la composición química de queso de cabra canarios. *Archivos de Zootecnia* **56** 663–666.
- AOAC International (1996) *Official Methods of Analysis*. 16th edn, 135 pp. Arlington, TX: AOAC International.
- Caro I, Mateo J, Sandoval M H, Soto S, García A M R and Castro J M (2013) Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science* **96** 3461–3470.
- Castro C G, Martínez C F E, Martínez C A R and Espinoza A (2013) Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* **33** 105–110.
- Cervantes E F and Villegas de Gante A (2012) *La leche y los quesos artesanales en México*, 1st edn, pp 27–30. México City, Mexico: Universidad Autónoma Chapingo, Center for Economic, Social and Technological Research of Agribusiness and World Agriculture.
- Cervantes E F, Santoyo C H and Álvarez M A (2001) *Lechería Familiar: Factores de éxito para el negocio*. pp 165–189. Ciudad de México, México: Plaza y Valdés.
- Cervantes E F, Villegas de Gante A, Cesín V J A and Espinoza O A (2008) *Los quesos mexicanos genuinos/Genuine Mexican Cheeses: Patrimonio cultural que debe rescatarse*, 1st edn, pp. 113–115. México City, Mexico: Mundi Prensa México.
- Cervantes E F, Cesín V A and Mamani O I (2013) La calidad estándar de la leche en el estado de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* **4** 75–86.
- Cervantes E F, Villegas de Gante A and Cesín V A (2016) Caracterización de la Cadena Agroindustrial del Queso Adobera de los Altos de Jalisco, México. In *Proc. Ier Simposio Nacional de los Quesos Mexicanos Tradicionales*, pp 183–192. Texcoco, México, México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Civille G V and Carr B T (2015) *Sensory Evaluation Techniques*, 5th edn, pp. 325–327. Boca Raton, FL: CRC Press.
- CODEX STAN 283-1978 (2007) *Codex Alimentarius: International Food Standards, General Standard for Cheese*. 6pp. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Delgado F J, González-Crespo J, Cava R and Ramírez R (2011) Proteolysis, texture and colour of a raw goat milk cheese throughout the maturation. *European Food Research and Technology* **233** 483–488.
- Flores M R, Oliva H A A and Narvaez Z J A (2011) Characterization of microbial traits involved with the elaboration of the Cotija cheese. *Food Science and Biotechnology* **20** 997–1003.
- Gómez T N, Garde S, Peiróten A and Ávila M (2015) Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: microbiology, colour, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control* **56** 186–194.
- Gonzalez C A F, Yescas C, Ortiz E A M, De la Rosa A M A, Hernández M A and Vallejo C B (2016) Invited review: artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science* **99** 3250–3262.
- Grass R J F and Cesín V A (2014) Situación actual y retrospectiva de los quesos genuinos de Chiautla de Tapia, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo* **11** 201–221.
- Grass R J F, Cervantes E F and Altamirano C J R (2013) Estrategias para el rescate y valorización del queso tenate de Tlaxco. *Culturales* **1** 9–54.
- Hernández M C, Hernández M A, Aguirre M E and Villegas de Gante A (2010) Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterization of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology* **63** 552–560.
- Kelly A L, O'Flaherty F and Fox P F (2006) Indigenous proteolytic enzymes in milk: a brief overview of the present state of knowledge. *International Dairy Journal* **16** 563–572.
- Law B A and Tamime A Y (2010) *Technology of Cheesemaking*, 2nd edn, pp. 231. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Lawlor J B, Delahunty C, Wilkinson M and Sheehan J (2001) Relationships between the sensory characteristics, neutral volatile composition and gross composition of ten cheese varieties. *Lait* **81** 487–507.
- Murugesan S, Reyes-Mata M P, Nirmalkar K *et al.* (2018) Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Research International* **113** 371–381.
- O'Brien E, Mills S, Dobson A *et al.* (2017) Contribution of the novel sulfur-producing adjunct *Lactobacillus nodensis* to flavor development in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science* **100** 4322–4334.
- Palacios V S (2006) *Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo, Hidalgo*. Thesis. Instituto de ciencias agropecuarias. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo, México.
- Pedrero F D L and Pangborn R M (1997) *Evaluación sensorial de los alimentos: Métodos analíticos*, 1st edn, pp. 103–105. México: Editorial Alhambra Mexicana.
- Pomeón T and Cervantes E F (2010) *El sector lechero y quesero en México de 1990 a 2009: entre lo global y lo local*. Research report 89. Universidad Autónoma Chapingo. Center for Economic, Social and Technological Research of Agribusiness and World Agriculture.
- Romero C P A, Leyva R G, Cruz C J G and Santos M A (2009) Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **8** 111–119.
- Ruvalcaba G J M, Estrada C E, Peña C A L, Méndez R M D, Romero J J H and Ruiz A C R (2011) Caracterización de las prácticas de ordeño y calidad higiénico-sanitaria de leche en dos municipios de los Altos de Jalisco. In *Proc. XIII Congreso internacional inocuidad de alimentos*, pp 117–120. Puerto Vallarta, Jalisco, México: Universidad de Guadalajara.
- Ruvalcaba G J M, Delgado M R J, Ruiz E H, López G V and Méndez R M D (2014) Characterization of Adobera cheese by texture profile

- analysis and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* **4** 90–94.
- Ruvalcaba G J M, Delgado M R J, Ruiz E H and Méndez R M D (2016) Conteo de bacterias ácido-lácticas en queso adobera de los Altos de Jalisco y su relación con aspectos de calidad del producto. In *Estudios en Inocuidad y Microbiología Alimentaria*, pp 218–221. Orozco H L O, Garay M L E and Torres V M R, eds. Guadalajara, Jalisco, México: Universidad de Guadalajara.
- Ruvalcaba G J M, Arteaga G R I, Delgado M R J, Villaseñor G F, Villanueva G M and Montes O L R (2017) Exploración del perfil de inocuidad microbiológica de queso adobera elaborado artesanalmente. In *Investigaciones en Ciencia e Inocuidad de Alimentos*, pp 738–741. Orozco-Hernández L O, Garay-Martínez L E and Torres M R, eds. Guadalajara, Jalisco, México: Universidad de Guadalajara.
- Ruvalcaba G J M, Arteaga G R I, Delgado M R J and Lara A J (2018) Description of the microbiota associated to artisanal adobera cheese, a genuine Mexican cheese. In *Proc. 2nd Biotechnology World Symposium*. San José del Cabo, Baja California Sur, México: Instituto Politécnico Nacional.
- SAGARPA (2016) *Agro-food and fishing information system*. URL <http://www.siap.gob.mx/>. Accessed 01/06/2016.
- Singh T K, Drake M A and Cadwallader K R (2003) Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2** 166–189.
- Solís M A D, Martínez L R, Solorio S J, Estrada F J G, Avilés N F, Gutiérrez I A T and Castelán O O A (2013) Characteristics of the tepeque cheese from “la tierra caliente” of the state of Michoacán: a cheese produced in an intensive silvopastoral system. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **16** 201–214.
- Stone H, Bleibaum R N and Thomas H A (2012) Chapter 7 - Affective testing. In *Food Science and Technology Sensory Evaluation Practices*, 4th edn., pp 291–325. Stone H, Bleibaum R N and Thomas H A, eds. San Diego: Academic Press.
- Sulejmani E I and Hayaloglu A A (2017) Characterization of Macedonian White-brined cheese: effect of raw or heat-treated caprine milk. *International Journal of Dairy Technology* **70** 1–9.
- Torres V M R, Mendoza B M, Castro R J, Gómez A C A, Garay M L E, Navarro H V and Villaruel L A (2012) Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *Journal of Food Protection* **75** 79–84.
- Villegas de Gante A and Cervantes E F (2011) La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales* **19** 146–164.
- Villegas de Gante A, Cervantes E F, Cesín V A, Espinoza O A, Hernández M A, Santos M A and Martínez-Campos A R (2014) *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. 1st edn, pp. 129–140. Texcoco, México, México: Biblioteca básica de Agricultura.
- Wadhvani R and McMahon D J (2012) Colour of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal of Dairy Science* **95** 2336–2346.
- Walstra P, Wouters J T M and Geurts T (2006) *Dairy Science and Technology*, 2nd edn, pp. 608–613. Boca Raton, FL: Food Science and Technology. CRC Press.
- Wehr H and Frank J PedreroF (2004) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th edn, pp. 363–527. Washington, DC: Am. Public Health Assoc.
- Wick C, Nienaber U, Anggraeni O, Shellhammer T H and Courtney P D (2004) Texture, proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *Journal of Dairy Research* **71** 107–115.
- Yescas C. (2013) *Quesos mexicanos*. 1st edn, pp. 38–41. México, DF, México: Larousse.