



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

**Desarrollo de un método rápido para la
detección de *Escherichia coli*,
Staphylococcus aureus y *Salmonella* spp. en
quesos artesanales mediante la reacción en
cadena de la polimerasa**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

SANTOS ALEJANDRO JUÁREZ DE LA LUZ

ASESOR:

DR. LUIS JAVIER TOLEDO FLORES

OAXACA DE JUÁREZ, OAXACA

10 DE FEBRERO 2022

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	5
JUSTIFICACIÓN.....	6
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTO TEÓRICO	7
1.1 Leche.....	7
1.1.1 Definición.....	7
1.1.2 Propiedades fisicoquímicas	8
1.1.3 Otras características importantes de la leche.....	12
1.1.4 Modificaciones importantes de la leche.....	13
1.1.5 Composición de la leche.....	15
1.1.6 Especificaciones sanitarias de la leche	20
1.2 Quesos.....	21
1.2.1 Definición.....	21
1.2.2 Tipos de quesos	21
1.2.3 Proceso de elaboración del queso	24
1.2.4 Características nutricionales	30
1.2.5 Especificaciones sanitarias de los quesos	31
1.3 Bacterias	31
1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	31
1.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	36
1.3.3 <i>Salmonella</i> spp.	40
1.4 ADN.....	44
1.4.1 Definición.....	44
1.4.2 Estructura y función del DNA	44
1.4.3 Replicación del DNA.....	47
1.5 ARN.....	49
1.5.1 Definición.....	49
1.5.2 Descubrimiento e historia.....	50
1.5.3 Características genéricas del ARN.....	50
1.5.4 Estructura y función del RNA.....	51
1.6 PCR.....	52
1.6.1 Historia de la PCR	52
1.6.2 Definición.....	54

1.6.3	La Taq polimerasa	54
1.6.4	Cebadores para PCR.....	54
1.6.5	Pasos de la PCR	56
1.6.6	Aplicaciones de la PCR	58
1.7	Electroforesis.....	58
1.7.1	Definición.....	58
1.7.2	Componentes de la electroforesis en el gel de agarosa	59
1.7.3	Uso de la electroforesis en gel para visualizar los resultados de una PCR..	61
CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL		64
2.2	Obtención y preparación de las muestras	64
2.2.1	Métodos convencionales (NOM-210-SSA1-2014).....	64
2.3	Métodos moleculares.....	67
2.3.1	Preparación de cultivos bacterianos.....	67
2.3.2	Procesamiento de las muestras de queso	67
2.3.3	Extracción de ADN de cepas cultivadas	68
2.3.4	Síntesis de primers y sondas.....	68
2.3.5	Estandarización de la PCR	69
2.3.6	Análisis electroforético.....	70
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		71
3.1	Por métodos convencionales.....	71
3.2	Por método molecular.....	75
CONCLUSIONES		79
REFERENCIAS		81

RESUMEN

El presente trabajo se centra en evaluar la calidad sanitaria de quesos que se consumen en el estado de Oaxaca de Juárez. Para poder llegar a este fin se eligieron cuatro sitios distribuidos en el área que ocupa la zona conurbada de Oaxaca de Juárez, por un lapso de cuatro meses, dichos lugares se utilizaron para llevar a cabo el muestreo.

Las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos se han convertido en un problema creciente de salud pública para todo el mundo, especialmente para los países en desarrollo. Miles de millones de personas en el mundo corren el riesgo de alimentos inseguros. Muchos millones se enferman, mientras que cientos de miles mueren cada año porque consumen alimentos inseguros. La industria láctea tiene como materia prima la leche procedente de diferentes razas vacunas, el progreso de esta industria ha mejorado actualmente la alimentación en el día a día, aumentando así el número de posibles alimentos disponibles en la dieta diaria de todas las personas, dentro de los de mayor consumo se encuentran los quesos, yogurt, crema, mantequilla, dulce de leche, entre otros. La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 define a los quesos como “productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado”. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio común utilizada para hacer muchas copias (millones o miles de millones) de una región particular de ADN. Esta región de ADN puede ser cualquier cosa que le interese al experimentador. Por ejemplo, podría ser un gen cuya función quiere entender un investigador o un marcador genético usado por científicos forenses para relacionar el ADN de la escena del crimen con los sospechosos. Por lo general, el objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda analizarse o usarse de alguna otra manera. Por ejemplo, el ADN amplificado por PCR se puede secuenciar, visualizar por electroforesis en gel o clonar en un plásmido para otros experimentos. La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos.

Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones. Los productos que fueron utilizados para el desarrollo de la metodología de este estudio son tres quesos frescos y tres quesillos de Oaxaca elaborados a partir de leche sin pasteurizar, tres quesos mozzarella y tres quesos manchegos comerciales. Estos productos fueron analizados y comparados utilizando dos métodos, el método tradicional de cada uno de ellos basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, y un método rápido basado en la identificación de los ácidos nucleicos de los microorganismos por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos se han convertido en un problema creciente de salud pública para todo el mundo, especialmente para los países en desarrollo (Fung y otros, 2018).

Miles de millones de personas en el mundo corren el riesgo de alimentos inseguros. Muchos millones se enferman, mientras que cientos de miles mueren cada año porque consumen alimentos inseguros (Fred y otros, 2018).

En nuestro país al cierre de 2018, la elaboración de derivados y fermentos lácteos como quesos, crema y yogurt, alcanzó un volumen de un millón 150 mil toneladas, con un valor de 52 mil 104 millones de pesos. Por su parte, la industria de quesos produjo 418 mil 650 toneladas con un valor en el mercado de 21 mil 293 millones de pesos. Las principales variedades de queso son el fresco, doble crema y panela (SIAP, 2018).

Los agentes bacterianos transmitidos por los alimentos son la causa principal de enfermedades graves y fatales transmitidas por alimentos. Se tiene como dato que alrededor del 90% de las enfermedades de intoxicación alimentaria son causadas por especies de *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Vibrio*, *Bacillus* y *E. coli*.

Bien se sabe que el queso artesanal es producido por la fermentación de la leche cruda de ovinos, bovinos y caprinos principalmente, cuya elaboración está definida por costumbres, gustos o circunstancias ambientales de cada región. Una gran parte de quesos artesanales no pasan por un proceso de pasteurización en el cual se matan bacterias nocivas al elevar la temperatura de calentamiento por un determinado tiempo, de esta manera el queso artesanal se ha convertido en un vehículo transmisor de microorganismos causantes de infecciones alimentarias. Aun así, los productores informales consideran que sus propias técnicas proporcionan una mejor textura, sabor y aroma y que al implementar nuevas tecnologías puede afectar el resultado final del queso.

El queso artesanal también puede albergar bacterias patógenas y/o que pueden alterar el producto, tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmomonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otras, responsables principalmente de ETAS (Merchán y otros, 2019).

Los métodos convencionales para la identificación de microorganismos patógenos dependen de las características del cultivo ya que éstos implican el preenriquecimiento y el enriquecimiento selectivo, seguidos de pasos de aislamiento y de pruebas de identificación. Es por ello que estos métodos tienen una gran desventaja, la cual es el tiempo y el lugar de realización

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar mediante métodos cuantitativos el riesgo sanitario presente en quesos artesanales e industriales que se consumen en México, aplicando técnicas tradicionales y de biología molecular.

Objetivos específicos:

- Detectar los niveles de contaminación por *Escherichia coli* en quesos artesanales e industriales que se consumen en México, aplicando técnicas tradicionales y de biología molecular.
- Detectar los niveles de contaminación por *Staphylococcus aureus* en quesos artesanales e industriales que se consumen en México, aplicando técnicas tradicionales y de biología molecular.
- Detectar los niveles de contaminación por *Salmonella* spp. en quesos artesanales e industriales que se consumen en México, aplicando técnicas tradicionales y de biología molecular.

JUSTIFICACIÓN

La industria láctea tiene como materia prima la leche procedente de diferentes razas vacunas, el progreso de esta industria ha mejorado actualmente la alimentación en el día a día, aumentando así el número de posibles alimentos disponibles en la dieta diaria de todas las personas, dentro de los de mayor consumo se encuentran los quesos, yogurt, crema, mantequilla, dulce de leche, entre otros.

Siendo así los quesos artesanales uno de los puntos de origen para la proliferación de diferentes tipos de bacterias y esto a su vez trae consigo diversas enfermedades en el organismo de los seres humanos, que van desde las comunes como un lo es un malestar estomacal, hasta las más letales que en algunos casos son asintomáticas, tales son las producidas con la bacteria *Salmonella* spp.; es así como nace la necesidad de realizar estudios sistemáticos y metódicos, para así conocer de forma detallada la microbiología de este alimento derivado de la leche. Debido a que no se tiene como tal una secuencia metodológica para el proceso de elaboración la mayoría de los productores lo hace con diferentes técnicas convencional, haciendo así propenso al alimento a los microorganismos durante su elaboración, ya que no toman las correspondientes medidas sanitarias

Los métodos tradicionales existentes para la detección de las bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp.) presentes en los quesos se realizan en un periodo máximo de 5 días, lo cual generalmente es tardado, este tipo de alimentos son consumidos al día, por lo cual se busca desarrollar un método que facilite la presencia e identificación de las mismas con una reducción en el lapso de tiempo, esto a la vez otorgaría un plus en la calidad del producto vendido al consumidor. Con la ayuda de la PCR, la cual es una técnica útil para la detección de patógenos en los alimentos, se podrá tener un diagnóstico más rápido y efectivo debido a su sensibilidad que supera la de las técnicas convencionales.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 Leche

1.1.1 Definición

Desde el punto de vista fisiológico la leche se puede definir como el líquido que segregan las glándulas mamarias de hembras sanas; sin embargo, desde el punto de vista comercial o industrial es el producto de ordeño higiénico efectuado en hembras de ganado bovino lechero bien alimentado y en buen estado de salud, no debiendo contener calostro. Es considerada como el alimento más perfecto desde el punto de vista nutricional, así como físico-químico (UNAD, 2016).

Legal

“Leche es el producto íntegro y fresco de la ordeña de una o varias vacas, sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro y que cumpla con las características físicas y microbiológicas establecidas”

Las características principales que se tienen en cuenta para medir la calidad de la leche son.: densidad, índices crioscópicos y de refracción, acidez, grasa y sólidos no grasos, cantidad de leucocitos, gérmenes patógenos y presencia de antisépticos, antibióticos y sustancias alcalinas.

El calostro, es el producto segregado por la glándula mamaria inmediatamente después del parto de la vaca, es una sustancia que presenta una composición muy diferente a la leche y contiene una cantidad de proteínas en el suero, especialmente inmunoglobulinas que son necesarias para la nutrición del ternero, pero que su presencia daña la calidad de la leche en la medida que se gelifica con el calentamiento de la leche por ejemplo a uno 80 0C, produciendo la coagulación de la leche (UNAD, 2016).

Dietética

La leche es uno de los alimentos más completo que se encuentra en la naturaleza, por ser rica en proteínas, grasas, vitaminas y minerales, necesarias para la nutrición humana. La

proteína de la leche, contiene una gran cantidad de aminoácidos esenciales necesarios para el organismo humano y que no puede sintetizar, la proteína que se encuentra en mayor proporción en la leche es la caseína. Entre las vitaminas que contiene están: la Vitamina B12 (riboflavina) la B1 (tiamina), y las vitaminas A, D, E y K liposolubles. Entre los minerales de mayor cantidad están el calcio y el fósforo. Su contenido de grasa se debe principalmente a los triglicéridos.

La grasa de la leche está conformada principalmente por la combinación física de triglicéridos y éstos a su vez están formados por un alcohol (glicerol) y 14 o más ácidos grasos que en su mayoría son saturados excepto el ácido oleico que es insaturado y se encuentra en mayor cantidad. La combinación de este ácido con el linoleico, el butírico y caproico es lo que hace que la grasa de la leche tenga un bajo punto de fusión (UNAD, 2016).

Física

La leche es un líquido de color blanco opalescente característico debido a la refracción de la luz cuando los rayos de luz inciden sobre las partículas coloidales de la leche en suspensión. Cuando es muy rica en grasa, presenta una coloración cremosa, debido al caroteno que contiene la grasa, la leche baja en grasa toma un color ligeramente azulado (UNAD, 2016).

1.1.2 Propiedades fisicoquímicas

1.1.2.1 Características organolépticas

Son todas aquellas que se aprecian en forma simple y rápida o indirectamente por nuestros sentidos, como ser color, olor, sabor, textura.

El olor o aroma, de la leche fresca es ligeramente perceptible, sin embargo, la leche está ácida o contienen bacterias coliformes, adquiere el olor característico de un establo o a estiércol de las vacas, por lo cual se le da el nombre de “olor a vaca”

Sabor: la leche fresca tiene un sabor medio dulce, neutro debido a la lactosa que contiene.

Color: la leche posee comúnmente un color blanco amarillento, pero cuando se le ha adicionado agua o se ha descremado, el color es blanco azulado. La intensidad del color se debe al mayor o menor contenido de grasa, caseína (proteína de la leche), carotenos (colorantes que se encuentran en la hierba verde). El color de la leche se debe a los efectos combinados de la caseína, sales coloidales, pigmentes y otros componentes. La caseína y

las sales coloidales le imparten el color blanco y opaco de la leche, en la medida que refleja totalmente la luz. Los pigmentos debido a los carotenos le imparten a la leche un color ligeramente amarillento y los pigmentos de la riboflavina son los que le dan un color amarillo – verdoso al suero producido en la elaboración del queso (UNAD, 2016).

Sabor: Normalmente la leche tiene un sabor dulce, que depende fundamentalmente de la lactosa o azúcar de la leche. El sabor puede cambiar por acción de la alimentación, traumatismo de la ubre, alteraciones en el estado de salud de la vaca, sustancias extrañas del medio ambiente de los recipientes en los que se deposita.

Textura: la leche debe ser de consistencia líquida, pegajosa y ligeramente viscosa. Esto se debe al contenido de azúcares, sales disueltas en ella y caseína.

1.1.2.2 Propiedades químicas

Gravedad específica: oscila entre 1.028 – 1.034 expresada en grados de densidad. Al determinar la densidad de la leche con el lactodensímetro, ese valor debe ajustarse para una temperatura de 150C, adicionando o restando el factor de corrección de 0.0002 por cada grado centígrado leído por encima o por debajo de los 150C.

Densidad de la leche: está relacionada con la combinación de sus diferentes componentes: el agua (1.000 g/ml); la grasa (0.931g/ml); proteína (1.346g/ml); lactosa (1.666 g/ml) minerales (5.500 g/ml) y Sólidos no grasos (S.N.G. =1.616 g/ml).

Por lo anterior la densidad de una leche entera sería aproximadamente de 1.032 g/ml, una leche descremada de 1.036 g/ml y una leche aguada tendría una densidad aproximada de 1.029 g/ml.

pH (concentración de hidrogeniones). El pH es el logaritmo del inverso de la concentración de iones de hidrógeno. Cuando la concentración de iones de hidrógeno es de 10^{-1} a 10^{-7} , corresponde a un pH de 1 a 7 es decir, medio ácido. Si la concentración de iones de hidrógeno es de 10^{-7} a 10^{-14} (pH 7 a 14) el medio será alcalino (el pH =7 es neutro). Dichas variaciones dependen del estado de sanidad de la leche y de los microorganismos responsables de convertir la lactosa en ácido láctico.

Acidez: la leche cruda presenta una acidez titulable resultante de cuatro reacciones, de las cuales las tres primeras corresponden a la acidez natural de la leche cruda y la cuarta reacción corresponde a la acidez que se va formando en la leche por acción de las bacterias contaminantes.

Acidez natural se debe a:

1. Acidez de la caseína anfótera, constituye cerca de 2/5 partes de la acidez natural
2. Acidez de las sustancias minerales, del CO₂ y de ácidos orgánicos naturales, aproximadamente las 2/5 partes de la acidez natural.
3. Reacciones de los fosfatos, cerca de 1/5 parte de la acidez natural.

La determinación de la acidez de la leche es muy importante porque puede dar lugar a determinar el grado de alteración de la leche. Regularmente una leche fresca debe tener una acidez de 0.15 a 0.16%, valores menores pueden indicar que es una leche proveniente de vacas con mastitis, aguada o que contiene alguna sustancia química alcalina. Porcentajes mayores del 0.16%, indican que la leche contiene bacterias contaminantes.

Potencial de oxidorreducción: El potencial de oxidorreducción (Eh), mide las propiedades oxidantes (+) o reductoras (-) de una solución, el cual se visualiza en la corriente eléctrica entre dos electrodos sumergidos en la solución. La leche tiene un Eh (+) entre los valores de 0.20 a 0.30 voltios. El Eh de la leche se debe al contenido de: oxígeno, sustancias reductoras naturales (reductasa aldehídica, ácido ascórbico y tratamientos tecnológicos).

La contaminación por bacterias incrementa el poder reductor de leche, ya que cuando las bacterias se multiplican hay un mayor consumo de oxígeno y producción de sustancias reductoras, reduciéndose el Eh, hasta valores negativos. Este fenómeno se utiliza para el análisis que se le hace a la leche con azul de metileno y la resazurina. La reducción del azul de metileno produce el leuco azul de metileno (incoloro) a un Eh de +0.054V y con la reducción de la resazurina (azul pizarra) se produce la resofurina (rosada) y la dihidrorresofurina (incolores), a un Eh de +0.18 y +0.19 V, la resazurina, reacciona antes que el azul de metileno y detecta la presencia de leucocitos. Mediante este método se podrá evaluar los cambios en la calidad de la leche (UNAD, 2016).

Viscosidad. La viscosidad de la leche indica la resistencia que se opone al fluído. La viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura y depende de la composición del líquido, del estado físico de las sustancias coloidales dispersas, y del contenido de materia grasa. La leche es más viscosa que el agua y ello se debe al contenido de grasa en emulsión y a las proteínas que contiene en su fase coloidal. La viscosidad de la leche oscila entre 1.7 a 2.2 centipoises, siendo la de la leche completa de 2.2 y la de la leche descremada de 1.2. La leche homogenizada presenta un aumento en la viscosidad, entre 1.2 a 1.4 centipoises.

La viscosidad de la leche y sus productos es un dato importante en ingeniería para el cálculo de bombas que se requieren en el proceso, pero también es importante en la comercialización dado que el consumidor relaciona la viscosidad con el contenido graso de la leche.

Punto de congelación: Es una característica importante porque permite detectar la adición de agua en la leche. El punto de congelación de la leche debe oscilar entre un rango de -0.5130°C a -0.565°C . Los componentes que influyen en el punto de congelación de la leche son la lactosa y las sales coloidales. El aumento de la acidez de la leche reduce la viscosidad de la leche.

Calor específico: Es el número de calorías necesarias para elevar en un grado centígrado la temperatura de una unidad de peso de la leche. Dicho valor es más alto que el del agua.

Cuadro 1. Cp de algunos productos y subproductos de la leche

Calor específico	cal/g.°C
Leche completa	0.93-0.94
Leche descremada	0.94-0.96
Suero de queso	0.97
Grasa	0.40-0.60

Fuente: (UNAD, 2016)

Punto de ebullición. La ebullición de la leche se inicia a partir de los 100.170°C , pero cuando se reduce la presión del líquido, la ebullición ocurre a una temperatura menor. Este efecto es aplicado en la producción de leches concentradas al evaporar la leche mediante la reducción de la presión utilizando el vacío, lográndose evaporar parcialmente la leche a temperaturas entre los 50 a 700°C , sin causar ningún deterioro a los componentes de la leche.

Índice de refracción. Este valor expresa el fenómeno de desviación de la luz cuando atraviesa el aire e incide sobre la leche. Su valor oscila entre 1.3440 y 1.3485, siendo el resultado de la suma de los índices de refracción individual de los solutos o fase discontinua y del agua o fase continua de la leche. Cuando el valor de algunos de estos componentes se altera, cambia el valor del índice de refracción. Por ejemplo si se cambia la concentración de los solutos debido al aguado, el valor del índice de refracción se acercará al del agua, detectándose de esta manera el fraude.

Para la determinación del índice de refracción se utilizan instrumentos como el refractómetro de Abbé que se utiliza para productos descremados y leches concentradas azucaradas o refractómetros de inmersión como el lactómetro “Bertuzzi” para medir el índice de refracción del suero obtenido de la coagulación de la caseína (UNAD, 2016).

1.1.3 Otras características importantes de la leche

Variabilidad

Como la leche es un producto netamente biológico es susceptible de variación en su composición y propiedades por diferentes factores como son:

Factores genéticos. La leche tiene diferente composición de acuerdo a la especie o raza del mamífero que provenga, se sabe que existe cerca de 150 especies y se observa que el contenido de extracto seco varía entre el 8 y el 65%, la materia grasa entre el 1 y 19%, los carbohidratos entre el 0,1 y el 10% y las cenizas entre el 0.1 y 2.0%. Las únicas especies que se crían especialmente para la producción de leche son las especies de los rumiantes (vaca, cebú, búfalo, cabra y oveja). en el cuadro 1 se presenta el cuadro comparativo de composición de la leche según la especie. De acuerdo a los datos que se presenta en el cuadro, se observa que la leche de búfala y cabra, son las de mayor contenido de grasa y las de mayor contenido de caseína son las de oveja y búfala; las de mayor contenido de carbohidratos son las de asna y de yegua. Con respecto a la raza se sabe que existen razas para producción de leche y de carne, muy resistentes a condiciones climatológicas y de acuerdo a estas diferencias de raza, se tienen diferente rendimiento de leche y de su composición. Por ejemplo, entre la Frisona (de Holanda), la Frisona en otras zonas, la Pardo Suiza y la Jersey, esta última es la que presenta un mayor porcentaje en extracto seco, grasa, proteína total y en lactosa.

Cuadro 2. Composición media aproximada de la leche procedente de diferentes especies (%p/p)

Origen	Extracto seco	Materia grasa	Caseína	Proteínas del suero	Carbohidratos	Cenizas
Vaca	12.7	3.9	2.6	0.6	4.6	0.7
Yegua		1.7	1.3	1.2	6.0	0.5
Asna	10.8	1.5	1.0	1.0	6.7	0.5
Cabra		4.5	3.0	0.6	4.3	0.8
Oveja	10.8	7.5	4.6	1.0	4.6	1.0
Cebú		4.7	2.6	0.6	4.9	0.7
Búfala	13.3	7.5	3.6	0.7	4.8	0.8

Fuente: Alais Charles Alais. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos.2000

Factores fisiológicos. Como la etapa y el número de lactaciones, por ejemplo, al inicio se presentan el calostro que tiene propiedades diferentes a la de la leche normal; Las etapas de lactación es un factor relevante, teniendo en cuenta que el número de lactaciones influye en la composición de la leche, especialmente en la grasa, proteína, lactosa, calcio, sodio y potasio.

Efectos patológicos de la vaca. En especial la mastitis, que como consecuencia de las bacterias patógenas disminuye considerablemente el rendimiento lechero, ocasionando un aumento en las células somáticas especialmente leucocitos, además se aumenta la actividad enzimática. La mastitis, aunque no causa mucho problema en la producción lechera sí es causante de grandes pérdidas en el hato ganadero (UNAD, 2016).

Alterabilidad. Debido a las características nutricionales de la leche, se pueden desarrollar una gran cantidad de microorganismos entre los cuales están los que producen la fermentación de la lactosa obteniéndose el ácido láctico que conduce a la floculación debido al componente proteico, que en términos caseros se le denomina “leche cortada”.

La leche fresca tiene un período de duración muy corto por lo que se considera un alimento de alta perecibilidad, ello obliga a tener especiales medidas sanitarias y de Buenas prácticas de manufactura (B.P.M.) para evitar la proliferación de microorganismos patógenos que afecten su calidad así mismo permitir la inactivación de enzimas, durante su procesamiento (UNAD, 2016).

1.1.4 Modificaciones importantes de la leche

Por ser la leche un sistema inestable, está sujeta a sufrir cambios desde que se encuentra en la ubre, durante el ordeño, con los cambios de temperatura y durante el proceso tecnológico. Los principales cambios que tienen lugar en la leche son:

Cambios físicos

Por la incorporación del aire durante el ordeño, lo cual ocasiona la incorporación de oxígeno y nitrógeno.

También se pueden deteriorar los glóbulos grasos, al dañarse su membrana, pero también por la acción del frío los glóbulos grasos se aglutinan. Al enfriarse la leche se produce la cristalización de la materia grasa y se puede llegar a desestabilizar la emulsión.

Cambios químicos

Por acción del oxígeno muchos de los componentes de la leche se oxidan actuando la luz como catalizador de muchas reacciones que producen aromas indeseables en la leche.

Cambios bioquímicos

Debido a las enzimas que contiene la leche se produce la lipólisis por acción de la lipasa, la proteólisis por acción de las proteasas y la hidrólisis de los ésteres fosfóricos por la acción de las fosfatasas.

Cambios microbiológicos

El más frecuente es la fermentación de la lactosa con la producción de ácido láctico, acompañado de la disminución del pH. Ciertos microorganismos también actúan sobre las proteínas produciendo la proteólisis y sobre las grasas produciendo lipólisis.

Tratamientos térmicos

Son aquellos a los cuales se somete la leche, dependiendo de la temperatura y tiempo utilizado, producen cambios físicos, químicos y microbiológicos. Por ejemplo, en el caso de:

La *pasterización lenta*, donde se somete la leche a una temperatura de 72 –74°C durante 15 segundos, se destruye la mayoría de los microorganismos y se inactivan algunas enzimas, sin embargo, no se efectúan cambios significativos en las propiedades de la leche.

La *pasterización alta* donde se somete la leche a temperaturas de 90°C, durante 15 segundos destruye todas las formas vegetativas de los microorganismos, parte de las proteínas del suero se desnaturalizan quedando sus grupos SH- disociados.

La *esterilización* es un tratamiento todavía más severo donde se utiliza la temperatura de 118°C durante 20 minutos lográndose la destrucción de los microorganismos, incluyendo sus esporas, se inactivan las enzimas y se logra cambios químicos como las reacciones de pardeamiento y la producción de ácido fórmico. Para evitar estos efectos y lograr una mejor calidad de la leche tanto de índole microbiológica como de sus características físicas y químicas, se utiliza el tratamiento UHT (Ultra-High-Temperature), donde se somete la leche a una temperatura de 145°C durante uno o dos segundos con el propósito de esterilizar la leche, sin ocasionar mayores modificaciones químicas ni bioquímicas.

La centrifugación

Es una operación que se utiliza para el desnatado de la leche, que se lleva a cabo en una desnatadora o centrifugadora de operación continua, para producir una leche con poca cantidad de grasa (0.05 –0.08%).

La homogenización

Es aquella donde se somete la leche a altas presiones en un homogeneizador, reduce de tamaño los glóbulos grasos de la leche. En general todos los productos lácteos son sometidos a la homogenización.

La evaporación

La evaporación de la leche se realiza para eliminar parte del agua y obtener una leche más concentrada, con características diferentes a las de la leche fresca, con mayor cantidad de sólidos totales y un pH menor.

La fermentación

Es aquella mediante la cual se cultiva la leche con bacterias lácticas, ocasiona cambios significativos en la leche, debido a que la lactosa se convierte en ácido láctico, disminuyendo su pH y aumentando la viscosidad de la leche.

1.1.5 Composición de la leche

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera y presenta sustancias definidas: agua, grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuales se les denomina extracto seco o sólidos totales. Los sólidos totales varían por múltiples factores como lo son: la raza, el tipo de alimentación, el medio ambiente y el estado sanitario de la vaca entre otros (Agudelo y otros, 2005).

Cuadro 3. Composición general de la leche en diferentes

Nutriente (gr.)	Vaca	Búfala	Mujer
Agua	88	84	87.5
Energía (Kcal).	61	97	7.0
Proteína	3.2	3.7	1.0
Grasa	3.4	6.9	4.4
Lactosa	4.7	5.2	6.9
Minerales	0.72	0.79	0.20

Fuente: (Agudelo y otros, 2005)

El agua es la fase dispersante, en la cual los glóbulos grasos y demás componentes de mayor tamaño se encuentran emulsionados o suspendidos. Las sustancias proteicas se encuentran formando un coloide en estado de “sol” lióforo (caseína y globulina) o liófilo (albúmina), mientras que la lactosa y las sales se hallan en forma de solución verdadera. El peso específico de la leche oscila entre 1.027 y 1.035, con una media de 1.032. El punto de congelación se encuentra por término medio entre -0.54°C y -0.55°C (valores límites: -0.51°C y -0.59°C) en virtud de la lactosa y sales disueltas; la técnica de su determinación se llama crioscopia y ha sido también adoptada en el examen de la leche para determinar posibles adulteraciones por adición de agua. También puede influir sobre el punto de congelación de la leche la acidificación, en cuyo caso el punto crioscópico disminuye. El calentamiento de la leche origina la elevación del punto de congelación.

Proteínas

La proteína contenida en la leche es del 3,5% (variando desde el 2.9% al 3.9%). Esta “proteína láctea” es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes y de pesos moleculares distintos, (ver figura 1). Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%).

La caseína

Es la proteína más abundante, además de ser la más característica de la leche por no encontrarse en otros alimentos, existen tres tipos de caseínas (α , β y Kapa caseína), en la leche también se encuentra la albúmina y la globulina. El valor biológico de la caseína en la alimentación obedece a su contenido en aminoácidos esenciales que se separan de la parte acuosa por acción de enzimas como la renina o la quimiocina, que son las responsables de la precipitación de la proteína en la elaboración de quesos.

El comportamiento de los diferentes tipos de caseína en la leche al ser tratada con calor, diferente pH (acidez) y diferentes concentraciones de sal, provee las características de los quesos, los productos de leche fermentada y las diferentes formas de leche.

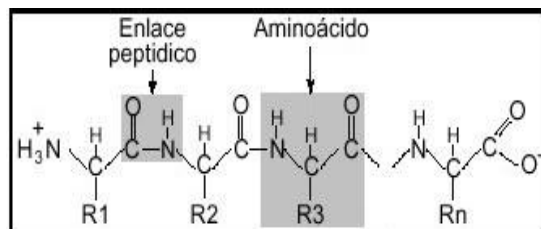


Figura 1 . Estructura de las proteínas (R_1 , R_2 , etc., son los radicales específicos de cada aminoácido. El número de aminoácidos en la caseína de la leche varía de 199 a 209).

La albúmina

Es la proteína de la leche, que sigue en cantidad a la caseína, con una cifra aproximada de 0.5%. Mientras que la caseína es relativamente estable a la acción del calor, las albúminas se desnaturalizan con facilidad al calentarlas. Por esta razón durante el proceso de calentamiento a altas temperaturas se destruye gran parte de la proteína sérica.

Las globulinas

Son proteínas de alto peso molecular que se encuentran preformadas en la sangre. También es posible que parte se produzca en las células del parénquima mamario. Son las proteínas que más fluctuaciones experimentan en el transcurso de un período de lactación, desde 9% al 16% del total de la proteína, que es la tasa que puede alcanzar en el calostro, disminuye hasta ser de sólo unas milésimas de dicho porcentaje en las últimas etapas de la lactancia. Los anticuerpos o inmunoglobulinas que se encuentran en el calostro son proteínas que se encuentran en el torrente sanguíneo, y hacen parte del sistema inmunológico cuya función es neutralizar y ayudar a destruir bacterias, así como otras partículas extrañas que hayan invadido el cuerpo; debido a esto se hace necesario el consumo de calostro en las primeras horas de vida del neonato (Agudelo y otros, 2005).

Componente graso

La grasa láctea se sintetiza en su inmensa mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche; se encuentra en forma de partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos, cuyos diámetros pueden variar de 0.1 a 0.22 micrones que se encuentran rodeados de una capa de fosfolípidos que evitan que la grasa se aglutine y pueda separarse de la parte acuosa.

La grasa de la figura 1 puede sufrir alteraciones causadas por la acción de la luz, del oxígeno y enzimas (lipasas). Los procesos hidrolíticos oxidativos conducen a la formación de peróxidos, aldehídos, cetonas y ácidos grasos libres, originándose así alteraciones del sabor

que se hace sebáceo o rancio.

El contenido de grasa puede variar por factores como la raza y las prácticas de debidas a la alimentación, además, se mantiene constante en los diversos períodos de lactación, tan sólo en el calostro parece disminuir su porcentaje. Se ve afectada si por el estado sanitario de la ubre presentando disminuciones significativas cuando se presentan procesos inflamatorios o infecciosos.

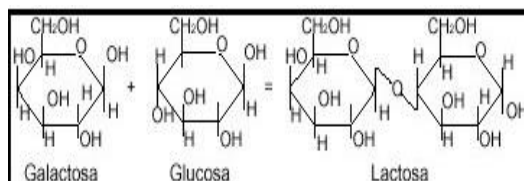


Figura 2. Estructura de la lactosa

Una proporción significativa de la población humana presenta intolerancia a la lactosa por no sintetizar suficiente cantidad de lactasa que es la enzima encargada de desdoblar la lactosa, y desarrollan síntomas de intolerancia a grandes dosis de lactosa, pero la mayoría puede consumir cantidades moderadas de leche sin padecer malestares. La fermentación de lactosa durante la industrialización baja su concentración en muchos productos, especialmente en los yogures y quesos. Además, leche pretratada con lactasa minimiza los problemas digestivos.

Elementos Minerales

La leche de vaca contiene sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso, hierro, cobalto, cobre, fósforo, fluoruros, yoduros. Además, se reconoce la presencia de otros en cantidades vestigiales, como el aluminio, molibdeno y plata. En la membrana de los glóbulos grasos se encuentran en mayor concentración el calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo y zinc. Una parte de los metales, sobre todo los alcalinos y los halógenos, se encuentran libres en forma de iones en solución. El calcio, por el contrario, se halla en su mayor parte ligado a la caseína. Tan sólo un tercio del calcio y del magnesio se encuentra en disociación iónica. Además de los cloruros y fosfatos, deben mencionarse también los citratos, presentes en una cuantía media de 2.3 gr/Lt.

Durante la duración de la lactancia descienden primero los contenidos de calcio y fósforo, para al final volver a aumentar ligeramente. Así mismo, disminuye la tasa de potasio, mientras que la de sodio muestra desde el principio tendencia a aumentar. El contenido de calcio se ve influido por la época del año.

La tasa de magnesio permanece prácticamente invariable. Reviste especial interés la cantidad de cobalto ya que este elemento es imprescindible para la síntesis de vitamina B12, tan importante para los animales y el hombre.

El cobre por su parte experimenta notables oscilaciones (entre 0 y 80 mg/L), la concentración de este mineral se halla disminuida en la leche de vacas que pastaron en llanuras ácidas. La leche de épocas secas es más pobre en cobre, que la de la época lluviosa. Las alteraciones secretoras, las enfermedades del metabolismo y otros estados patológicos originan en su mayoría notables cambios en la concentración de los elementos minerales. Como primer signo de un trastorno secretor es particularmente frecuente que descienda la tasa de calcio, haciendo que la leche pierda sus propiedades de coagulación.

Vitaminas

La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, su concentración está sujeto a grandes oscilaciones. El calostro posee una extraordinaria riqueza vitamínica, contiene de 5 a 7 veces más vitamina C y de 3 a 5 veces más vitaminas B2, D y E que la leche normal. También influye la época del año, tiempo atmosférico, ambiente y la alimentación; este último factor repercute especialmente en los carotenos y en la vitamina A como consecuencia de la abundante ingestión de carotenos cuando la base de la alimentación son forrajes frescos.

La vitamina E por su parte es 10% más abundante en épocas en que el ganado tiene acceso a forraje más toscos, lo cual posiblemente dependa del mayor contenido graso de la leche en verano. Por lo general, la concentración de las vitaminas hidrosolubles se conserva constantemente. En la vitamina C se observan fluctuaciones dependiendo de la alimentación. Son variadas las influencias de la manipulación de la leche sobre su contenido vitamínico ya que en el simple almacenamiento se producen pérdidas de vitaminas, dependientes de la temperatura y de las radiaciones lumínicas (Agudelo y otros, 2005).

Enzimas

Las enzimas contenidas en la leche se aprovechan para efectos de inspección y control, ya que muchas de ellas influyen en la calidad de la leche y en el origen de distintas alteraciones. Las enzimas de la leche carecen de valor desde el punto de vista alimenticio, sobre todo para los organismos ya desarrollados. Las enzimas lácteas tienen dos orígenes: las corporales y las enzimáticas.

Las primeras llegan directamente a la leche -en la que se encuentran en forma libre- procedentes de la sangre, o bien de las células corporales. Pero también pueden llegar a la leche con las células. En ambos casos se trata de enzimas originadas en el organismo. Las segundas se originan en la leche misma, producto de la acción de los gérmenes.

Existen dos grupos de enzimas: las hidrolasas cuyo mecanismo de acción se caracteriza por un desdoblamiento hidrolítico, a este grupo pertenecen entre otras, las esterasas, lipasas, carbohidratasas y proteasas. Entre las esterasas es importante la lipasa que actúa cuando la leche es depositada sin refrigeración, dándole un sabor rancio. Las lipasas se inactivan a temperaturas superiores a los 60°C, por lo tanto no son evidenciables después de la pasteurización. A las esterasas pertenecen también las fosfatasa que se dividen en ácidas y alcalinas, la fosfatasa alcalina se encuentra preferentemente en la membrana proteica de los glóbulos grasos y es inactivada al someter la leche a procesos de calentamiento (62°C durante 30 minutos o a 72°C 15 segundos).

El otro grupo importante de enzimas son las oxido-reductasas, las más importante son la catalasa y la peroxidasa que sirven como indicadores de la calidad microbiológica de la leche.

1.1.6 Especificaciones sanitarias de la leche

Cuadro 4. Límites máximos permisibles de algunas bacterias en la leche

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
Mesofílicos aerobios UFC/mL	30000
Organismos Coliformes totales UFC/mL en planta	10
Organismos Coliformes totales UFC/mL en punto de venta	20
<i>Salmonella spp</i> en 25 mL	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> en 25 mL	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 mL	Negativo

Fuente: (SSA, Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Especificaciones sanitarias., 1994).

1.2 Quesos

1.2.1 Definición

El queso es el producto que resulta de la precipitación de las caseínas, que deja como residuo el llamado suero de la leche; para llevar a cabo este proceso, se emplean básicamente dos métodos: por medio de la renina o cuajo, o bien, acidificar en el punto isoeléctrico de las caseínas (pH 4.6) (Badui Degal, 2006).

La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 define a los quesos como “productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado” (SSA, 1994). Los quesos frescos poseen alto contenido de humedad, su sabor es suave y no poseen corteza. Estos quesos poseen una vida de almacenamiento, corta, por lo cual generalmente se almacenan bajo refrigeración. Por otra parte, los quesos madurados se obtienen mediante tratamientos con microorganismos que producen cambios físicos y bioquímicos que dan lugar a nuevos sabores, aromas y texturas. De esta manera, estos productos pueden o no requerir almacenamiento refrigerado y su vida de anaquel en general es prolongada. Los quesos son producidos con mezclas de quesos y otros aditivos que son sometidos a fusión y emulsificación a altas temperaturas. Lo anterior permite que estos productos tengan una vida de almacenamiento relativamente prolongada (SSA, 1994).

1.2.2 Tipos de quesos

Dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 se mencionan los siguientes:

Quesos frescos: se caracterizan por ser productos en alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración (SSA, 1994).

En los quesos frescos se encuentra la siguiente clasificación:

Frescales: Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.

De pasta cocida: Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.

La Ricota es también de pasta blanda, pero se obtiene por un proceso diferente. Se realiza por precipitación mediante el calor en medio ácido producido por acidificación, debida al cultivo de bacterias lácticas apropiadas o por ácidos orgánicos permitidos a ese fin, de las sustancias proteicas de la leche (entera, parcial o totalmente descremada) o del suero de quesos. (CITIL, 2015)

El queso Mascarpone, se diferencia de los mencionados ya que es un producto de muy alta humedad elaborado con leche entera y crema, coagulada por el calor y ácidos permitidos a ese efecto. (CITIL, 2015)

El queso Azul se diferencia porque se obtiene por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada o no por la acción de bacterias lácticas específicas, y mediante un proceso de elaboración que utiliza hongos específicos (*Penicillium roquefortii*), complementados o no por la acción de hongos y/o levaduras subsidiarias responsables de otorgarle al producto características distintivas durante el proceso de elaboración y maduración. (CITIL, 2015)

Acidificados: Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel.

Quesos maduros: alimentos que se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda, con o sin corteza, sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto de que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración (SSA, 1994).

La clasificación dentro de este tipo de quesos, es la que a continuación se indica:

Madurados prensados de pasta dura: Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito.

Madurados prensados: Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergja, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsoe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.

De maduración con mohos: Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.

Quesos procesados: estos productos se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión de sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70°C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel (SSA, 1994).

En estos quesos únicamente encontramos los quesos fundidos y fundidos para untar.

1.2.2.1 Clasificación de acuerdo a sus parámetros fisicoquímicos

Otra clasificación que se hace de los quesos se centra en parámetros fisicoquímicos como lo son el contenido de humedad y contenido de grasas (CITIL, 2015).

Según su contenido de grasa:

Doble crema o extra graso: son los quesos más grasos ya que contienen no menos del 60% de materia grasa.

Grasos: son los que tienen entre 45 y hasta 59,9% de materia grasa.

Semigrasos: son los que contienen entre 25 y 44,9 % de materia grasa.

Magros: son los que contienen entre 10 y hasta 24,9% de materia grasa. Dentro de este grupo podemos encontrar al queso port salut, queso mozzarella, la ricota, entre otros.

De leche descremada: Aquellos que contienen menos del 10% de materia grasa.

Según su contenido de humedad

Quesos de baja humedad: son aquellos que contienen hasta un 35,9% de humedad y son quesos de pasta dura.

Quesos de mediana humedad: son aquellos en los cuales la humedad oscila entre 36 y 45,9% y son conocidos como de pasta semidura.

Quesos de alta humedad: su humedad varía entre un 46 y un 54% y son conocidos como de pasta blanda o macíos.

Quesos de muy alta humedad: poseen una humedad no menor al 55% son los quesos de pasta muy blanda.

1.2.3 Proceso de elaboración del queso

Los pasos fundamentales para su elaboración incluyen la coagulación de la leche, el cortado del coágulo, la eliminación del suero (desuerado), el salado, el prensado y la maduración (si se requiere).

La transformación de la leche en queso está constituida fundamentalmente por tres etapas:

La formación del gel de caseína. Es la cuajada o coagulación de la leche.

Desuerado parcial del gel de caseína por sinéresis.

Afinado o maduración del gel desuerado. Es la maduración enzimática del gel desuerado, del que es responsable, en primer lugar, la proliferación de determinados microorganismos. En el caso de los quesos frescos, la fabricación se interrumpe en esta fase (Guzmán, 2010).

1.2.3.1 Formación del gel en caseína

Consiste en una serie de modificaciones físico-químicas que conducen a la formación de un coágulo. Estas modificaciones pueden efectuarse por tres vías:

Proteólisis limitada (coagulación enzimática), acidificando (con cultivos iniciadores o adición de ácidos; coagulación láctica) y calentando o la combinación de éstos tres métodos (Guzmán, 2010).

1.2.3.1.1 Coagulación enzimática

La coagulación enzimática es la práctica más común en la elaboración de quesos. Este mecanismo se lleva a cabo mediante la adición de enzimas proteolíticas, que poseen la propiedad de coagular el complejo caseínico de la leche. Estas enzimas pueden tener diversos orígenes (Guzmán, 2010).

Cuajos de origen animal: cuajos de terneras lactantes (renina o quimosina), cuajo bovino (pepsina), cuajo porcino (pepsina) y cuajos de animales combinados.

Cuajos de origen vegetal: látex de las higueras (*Ficus carica*) y bromelina.

Cuajos de origen bacteriano: enzimas producidas por hongos como el *Mucor pusillus* y la *Endothia parasítica*.

El cuajo, mezcla de renina y pepsina excretada en el estómago de los rumiantes lactantes, es el coagulante mejor conocido y su mecanismo de acción ha sido bien estudiado. En general, se conocen dos fases en el proceso de coagulación de la leche mediante la acción de este cuajo:

- ✓ En la primera fase interviene la enzima renina que cataliza la siguiente reacción:



Figura 3. Hidrólisis del complejo k caseínas por acción del cuajo.

La cadena de aminoácidos de la molécula de *k* caseína tiene 169 unidades, con un punto especialmente débil situado entre las unidades 105 (fenilalanina) y 106 (metionina) que es atacado por la renina del cuajo descomponiendo los complejos de *k* caseína en dos partes:

a) Cadena de aminoácidos comprendiendo del 1 al 105, insolubles, forma la paracaseína *k* que dará lugar al coágulo; b) Cadena de aminoácidos del 106 al 169, con carbohidratos que hacen soluble esta fracción, por lo que se va con el suero.

- ✓ En la segunda fase, la paracaseína formada precipita en presencia de iones calcio. Se van formando agregados moleculares cada vez mayores, que crecen incluyendo a los glóbulos de grasa (Guzmán, 2010).

1.2.3.1.2 Coagulación ácida

La coagulación ácida puede realizarse por acidificación directa (agregando ácido láctico o acético) o al cultivar microorganismos que produzcan ácido láctico a partir de lactosa.

Las proteínas de la leche tienen una carga eléctrica que dependen del pH de la solución, si éste es ácido ocurre entonces una desmineralización de la micela, lo que ocasiona una modificación electrostática que neutraliza las cargas hasta alcanzar el punto isoelectrico. La hidratación de las proteínas es entonces, lo que provoca su insolubilización y la formación del coágulo (Verdalet, 1998).

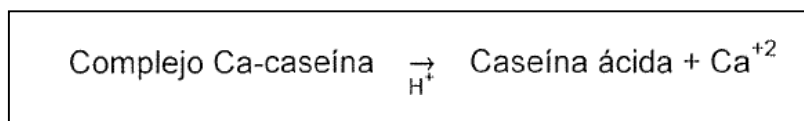


Figura 4. Desmineralización del complejo Ca-caseína

Los iones cálcicos libres se combinan con el ácido láctico para formar lactato cálcico. Debido a la desmineralización, no se forma la red tridimensional como en el caso de la coagulación con cuajo, por lo que, éste coágulo no es muy estable. Este proceso es reversible, la caseína ácida puede solubilizarse añadiendo álcali o ácido más allá del punto isoeléctrico.

Así pues, las micelas de caseína se aglomeran para formar un gel compacto aprisionando el líquido de dispersión que constituye el suero. En realidad todas las cuajadas se obtienen por acción simultánea del cuajo y del ácido láctico proveniente de la transformación de la lactosa por las bacterias lácticas (Verdalet, 1998).

Cuadro 5. Constituyentes más importantes de la leche para la elaboración del queso.

Constituyente	Propiedad
Caseína	Forma el gel (estructura elemental del queso): influencia la textura y flavor a través de la proteólisis durante la maduración.
Grasa	Contribuye a la textura y flavor del queso, vía lipólisis.
Lactosa	Sustrato para la fermentación iniciada por las bacterias ácido lácticas: productos de la fermentación de lactosa también contribuyen al flavor durante la maduración.

Fuente: (Verdalet, 1998)

No obstante, siempre existe un predominio más o menos encaminado hacia uno de los dos modos de floculación mencionados. En una cuajada enzimática domina ampliamente la acción del cuajo y se disminuye al máximo la acidificación láctica. Por el contrario, en una cuajada ácida, el papel del cuajo es limitado y el agente principal de la floculación es la acidificación.

Los parámetros a controlar durante la coagulación son el tiempo de toma, la velocidad de endurecimiento de la cuajada y la capacidad de desuerado. El tiempo de toma es el tiempo desde que se adiciona el cuajo hasta que se obtiene el gel. El tiempo de coagulación incluye además del tiempo de toma, el tiempo de endurecimiento, esto es la consistencia que debe de tener la cuajada antes de someterla al corte.

Es importante saber que dependiendo del método de coagulación empleado, se obtienen diferentes características de la cuajada; así pues cuando el método de coagulación es enzimático, el coagulo es flexible, elástico, compacto, impermeable y contráctil. Esta última propiedad permite efectuar el desuerado. Su carácter compacto tolera la intervención de acciones mecánicas potentes que facilitan la contracción del coágulo y la salida del suero. Sin esta acción, el gel no desuera debido a su impermeabilidad.

Por otro lado, cuando el método de coagulación es ácido, el coagulo es firme, friable, poroso y poco contráctil. Su deshidratación es difícil por la importante retención de agua resultante de la elevada hidratación de las pequeñas partículas muy dispersas de caseína desmineralizada. Además, la friabilidad se opone al trabajo mecánico intenso (Verdalet, 1998).

1.2.3.2 Corte de la cuajada

Después de que la leche ha coagulado la primera operación que se realiza es el corte de la cuajada formada. El propósito del cortado es el de permitir la salida de una gran proporción del suero de la cuajada. El contenido de agua en la cuajada se reduce rápidamente cuando se realiza el cortado en cubos pequeños, aunque la cantidad de grasa expulsada es mayor. En el momento del cortado, la cuajada debe tener una firmeza suficiente y resistencia al corte (que corresponde a la tensión de la cuajada). Las cuajadas muy duras son difíciles de trabajar y se forma una capa seca sobre la superficie de los trozos, y el desuerado es imperfecto (Guzmán, 2010).

1.2.3.3 Desuerado de la cuajada.

Al terminar la operación de corte de la cuajada, los granos están muy blandos y con grietas en su membrana exterior, por lo que se procede a agitarlos suavemente para que éstos alcancen una estructura más estable. Si a la vez que se agita se eleva la temperatura el desuerado es aún mayor debido a que los granos de cuajada se hidratan menos favoreciéndose la sinéresis. Además, al elevar la temperatura las bacterias lácticas presentes activan su crecimiento y multiplicación, transformando más lactosa a ácido láctico

lo que se traduce en un descenso de pH que favorece también la eliminación del suero al aumentar la permeabilidad del gel debido a una disolución parcial de la armadura cálcica.

En un momento determinado según el tipo de queso, se procede a sacar el suero de la tina de cuajado. Esta operación se puede realizar a través de tamices perforados que dejan pasar el suero y retienen los granos de cuajada o bien, con la ayuda de una bomba con la cual el suero puede ser succionado. Es importante que en cada tipo de queso se drene siempre la misma proporción de suero, para tener un producto final normalizado en cuanto al contenido de humedad (Verdalet, 1998).

1.2.3.4 Moldeado y prensado de la cuajada

El moldeado tiene por objeto lograr que los granos de cuajada solden y formen piezas grandes. Existen varias formas y tamaños de moldes, éstos van a depender de las posibilidades económicas, del tipo de queso que se va a elaborar y del gusto regional. Existen moldes de canasta de palma o plástico, cilindros metálicos, plásticos o de teflón, cajas de teflón o madera, morrales de manta o yute (Amiot, 1991).

El moldeado de los quesos debe efectuarse a temperatura templada para los quesos que se elaboran con leches pasteurizadas frescas o poco maduras. Las cuajadas muy maduras se moldean mejor a temperaturas bajas (10-12 °C).

El prensado de los quesos tiene por objeto endurecer la masa de cuajada y eliminar el suero sobrante; puede realizarse por la presión que ejerce su propio peso (auto prensado) o al aplicar una fuerza externa. Para llevarlo a cabo es necesario envolver los quesos en telas ligeras o en mantas de tela denominada cielo. El auto prensado se utiliza para los quesos que tienen un alto contenido de agua, como los blandos y semiduros; consiste en voltear los quesos a intervalos de 15-30 min al inicio y después a intervalos más largos (1-1.25 h).

Por su parte, la aplicación de una fuerza externa se realiza comúnmente con prensas horizontales o verticales, accionadas neumática, hidráulica o mecánicamente. En estos casos, el prensado debe ser aplicado con menor intensidad al principio de la operación y ser aumentado después en fases sucesivas. La intensidad del prensado depende de la consistencia, humedad y tamaño del queso (Amiot, 1991).

1.2.3.5 Salado del queso

Muchos son los objetivos del salado en los quesos, entre ellos se destacan:

- Realzar el sabor del queso.
- Regular el desarrollo microbiano, tanto suprimiendo bacterias indeseables como controlando el crecimiento de los agentes de maduración.
- Mejorar la apariencia y consistencia de los quesos.
- Contribuir a la pérdida de suero que continúa tras el desuerado (Amiot, 1991).

La cantidad de sal que se emplea y el momento de adicionarla va a depender del tipo de queso que se va a elaborar. Las técnicas de salado son:

-Salado en el suero: este método consiste en adicionar un alto contenido de sal (5- 8%) durante el agitado de los granos. Este procedimiento se usa en la elaboración de la mayoría de los quesos criollos de América Latina.

-Salado en la masa del queso: este tipo de salado se efectúa después del desuerado de los granos. La sal se esparce uniformemente sobre la cuajada y luego se procede a mezclar revolviendo juntos la cuajada y la sal añadida durante el tiempo necesario hasta que la distribución de la sal sea homogénea.

-Salado con sal seca sobre la superficie del queso: consiste en frotar uniformemente sobre la superficie del queso sal cristalina. Se aplica en fases sucesivas durante varios días (desde 24 h hasta 10 o 12 días) según el tipo de queso. Para lograr una distribución adecuada, deben transcurrir más de 90 días. Este tipo de salado se efectúa a 8-12 °C.

-Salado por salmuera: para salar con salmuera, los quesos se sumergen en un recipiente que contiene una solución salina. Para los quesos duros se utiliza una salmuera con 22-24% de sal y 13-14% si son blandos. La concentración más baja que debe usarse es de 13-14% puesto que si se emplean salmueras menos concentradas la sal monocíclica de caseína que se acumula durante el salado se disuelve y los quesos se hidratan y se desmoronan fácilmente (Amiot, 1991).

1.2.3.6 Maduración del queso

Es la última fase de la fabricación del queso. La cuajada, antes de iniciarse la maduración, presenta una capacidad, volumen y forma ya determinadas. Suele ser ácida en razón de la

presencia de ácido láctico. En el caso de los quesos frescos la fabricación se interrumpe en esta fase. Los demás tipos de queso sufren una maduración más o menos pronunciada, que es un fenómeno complejo.

La maduración comprende una serie de cambios de las propiedades físicas y químicas adquiriendo el queso su aspecto, textura y consistencia, así como su aroma y sabor característicos. Los cambios responsables de la maduración son: la fermentación de la lactosa, proteólisis y lipólisis (Amiot, 1991).

1.2.4 Características nutricionales

El queso contiene los nutrientes presentes en la leche de manera concentrada. De esta forma brinda un gran aporte de proteínas, grasas, vitaminas y minerales. Otros nutrientes como la lactosa y las proteínas del suero se pierden en el proceso de elaboración (Amiot, 1991).

Calorías: El valor calórico del queso depende principalmente del contenido en grasa que posee. Cuanto más graso sea el queso, mayor será su valor calórico.

Grasas: Contiene grasas saturadas y colesterol al igual que todo alimento de origen animal. El porcentaje de grasas varía según el tipo de queso.

Proteínas: Tiene proteínas de Alto Valor Biológico (AVB), esto significa que contiene los aminoácidos que el organismo no puede producir y que es necesario que se incorporen a través de la alimentación, asimismo son proteínas de alta digestibilidad.

Vitaminas: Aporta vitaminas A, D, B2 y B12.

La vitamina A es necesaria para el crecimiento normal, la reproducción y el desarrollo fetal. La vitamina D colabora en la absorción del calcio y consecuentemente, ayuda al mantenimiento de la estructura ósea.

La vitamina B12 colabora en el buen funcionamiento del sistema nervioso y el aparato cardiovascular.

La vitamina B2 colabora en la obtención de energía de los alimentos, interviene en el mantenimiento de la piel, favorece la formación de anticuerpos, interviene en el mantenimiento de las mucosas.

Minerales: Proporciona grandes cantidades de calcio y fósforo. El calcio interviene en diversas funciones. No solo colabora en el mantenimiento de los huesos y dientes, sino que también interviene en la secreción de hormonas, enzimas y contracción de los músculos. Por otra parte, el fósforo participa en la producción de algunas proteínas y hormonas además de, junto con el calcio, fortalecer el esqueleto. En relación al contenido de sodio, en su mayoría, los quesos cuanto más duros son, mayor contenido de sodio tienen (Amiot, 1991).

1.2.5 Especificaciones sanitarias de los quesos

Cuadro 6. Límites máximos permisibles de algunas bacterias en la leche.

MICROORGANISMOS	FRESCOS	MADURADOS	PROCESADOS
	LÍMITE MÁXIMO		
Coliformes fecales (NMP/g)	100	50	
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	1000	100	MENOS DE 100
Hongos y levaduras (UFC/g)	500	500	100
<i>Salmonella</i> en 25 g	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Fuente: (SSA, Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias, 1994).

1.3 Bacterias

1.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertenece a un grupo de bacterias presentes en el intestino del ser humano y animales, siendo, la gran mayoría, inocuas en ellos. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* productoras de toxinas, llamadas vero-toxinas o toxinas de tipo shiga que pueden causar cuadros gastrointestinales graves en el ser humano (elika, 2013).

1.3.1.1 Reservorio

Los rumiantes, y en particular el ganado bovino y ovino, son el principal reservorio de estas bacterias. Otros animales como las cabras, los cerdos, los caballos, las aves de corral, los perros y los gatos pueden actuar también como reservorio. Los animales portadores no muestran ningún signo clínico y eliminan las bacterias *E. coli* por las heces.

1.3.1.2 Condiciones de supervivencia

Las cepas de *E. coli* verotoxigénica (ECVT) sobreviven durante meses en el estiércol contaminando las aguas superficiales (bebida y riego), las verduras y frutas y la superficie de las tierras de cultivo.

Estas bacterias se multiplican a temperaturas entre 6 y 50° C, con una temperatura óptima alrededor de 37° C. También, pueden crecer en presencia de un 6% de NaCl, ya que son más resistentes a estos compuestos que otras bacterias, como la *Salmonella*.

Para controlar el crecimiento hay que mantener los alimentos refrigerados y durante la congelación se inactiva. Son termorresistentes, pero se pueden eliminar con un tratamiento térmico a 65° C (elika, 2013).

Cuadro 7. Condiciones de crecimiento de *E.coli*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	7-8	35-40	46
pH	4.4	6-7	10
Actividad del agua	0.95	0.995	---

Fuente: (elika, 2013).

1.3.1.3 Etiología

En la actualidad se distinguen seis serotipos de *E. coli* que pueden producir gastroenteritis:

E. coli enterotoxigénica (ECET)

E. coli enteropatógena (ECEP)

E. coli enteroinvasiva (ECEI)

E. coli enterohemorrágica (ECEH), también conocida como verotoxigénica (ECVT)

E. coli enteroagregativa (ECEA)

E. coli de adherencia difusa (ECAD)

Estas tres últimas se agrupan en *E. coli* productoras de toxina Shiga (ECTS). Dentro de las productoras de toxina Shiga, el serogrupo que se asocia más frecuentemente con toxiinfecciones en humanos es la *E. coli* verotoxigénica (ECVT) O157, y la cepa más implicada en toxiinfecciones alimentarias y de la que se disponen más datos es la ECVT O157:H7. No obstante, hay otros serogrupos de *E. coli* productoras de toxinas patógenas para el ser humano: O26, O103, O111 y O145 (elika, 2013).

1.3.1.4 Vías de transmisión

Las bacterias *E. coli* verotoxigénicas pueden transmitirse al hombre a través de los alimentos por varias vías:

1. En origen: en las explotaciones ganaderas por una inadecuada falta de higiene:

- A través del contacto directo con animales o canales infectadas con *E. coli*.
- Indirectamente a través de los alimentos de origen animal y del agua contaminados (contaminando a su vez a cultivos de vegetales). La presencia de *E. coli* en los alimentos de origen animal es debida a contaminación de origen fecal.

2. En proceso por falta de higiene e inadecuada manipulación de los alimentos:

- Contaminación cruzada en los mataderos y en las fases posteriores de transformación de los alimentos, y en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
- Personas: Los manipuladores de alimentos pueden ser portadoras de *E. coli*, de forma que, al manipular los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene, contaminan los alimentos.
- Agua: El agua de riego puede estar contaminada con estiércol (que contiene *E. coli* procedente de las heces de los animales), transmitiéndose a las frutas y verduras frescas regadas con dicha agua.

También es muy importante la transmisión secundaria de persona a persona, sobre todo en el ámbito familiar, escolar y de centros de atención de personas mayores (elika, 2013).

1.3.1.5 Alimentos a considerar

Existen diversos alimentos asociados a las toxiinfecciones de *E. coli*, pero la fuente más frecuente es la carne de vacuno y los productos cárnicos de vacuno (hamburguesas, carne

picada, etc) que hayan sido poco cocinados, así como la leche cruda sin pasteurizar y los productos elaborados con ella (queso, nata, etc).

Las frutas y verduras lavadas o regadas con agua contaminada también pueden ser transmisoras de la bacteria. Asimismo, el pescado y los moluscos pueden estar contaminados si el agua en el que se encuentran está contaminada con *E. coli*. También los alimentos cocinados listos para el consumo pueden estar contaminados con *E. coli* por contaminación cruzada con materia prima contaminada (elika, 2013).

1.3.1.6 La toxiinfección alimentaria por *E. coli*

La infección que provoca *E. coli* es una zoonosis (enfermedades transmitidas de animales a humanos) de origen alimentaria, es decir que se transmite a los humanos a través del consumo de los productos alimenticios contaminados con *E. coli*.

La mayor parte de las *E. coli* son inocuas, pero las cepas productoras de toxina Shiga o verotoxigénicas pueden provocar cuadros gastrointestinales graves. En los adultos sanos, los síntomas suelen ser diarrea grave, a menudo sanguinolenta, acompañada de cólicos abdominales, sin fiebre o con fiebre moderada, que suelen aparecer dos o tres días después del consumo del alimento contaminado, y los afectados se recuperan de la infección en el plazo de una semana (elika, 2013).

1.3.1.7 Límites legales

Cuadro 8. Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones

Alimento	Límite microbiológico máximo permitido	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
Moluscos bivalvos vivos y equinodermos, tunicados y gasterópodos vivos	230 NPM/100 g de carne y líquido intravalvar	Productos comercializados durante su vida útil	Mejoras en la higiene del sacrificio, revisión de los controles del proceso y del origen de los animales
Carne picada	50- 500 ufc/g	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene del sacrificio,

			revisión de los controles del proceso y del origen de los animales
Carne separada mecánicamente	50- 500 ufc/g	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen
Preparados cárnicos	50- 500 ufc/g	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
Queso a base de leche o suero sometido a tratamiento térmico	50- 500 ufc/g	En el momento del proceso de fabricación en el que se prevea que el recuento de <i>E. coli</i> será el máximo	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
Mantequilla y nata a base de leche cruda o leche sometida a tratamiento térmico inferior a la pasteurización	100- 1000 ufc/g	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el

			origen de las materias primas
Productos pelados y descabezados de crustáceos y moluscos cocinados	10-100 ufc/g	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y en la selección de las materias primas
Frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo)	1-10 ufc/g	Proceso de elaboración	Mejoras en la higiene de la producción y en la selección de las materias primas
Zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados (listos para el consumo)	100- 1000 ufc/g	Proceso de elaboración	Mejoras en la higiene de la producción

Fuente (DOUE, 2020).

1.3.2 *Staphylococcus aureus*

1.3.2.1 Descripción de la bacteria

Los estafilococos son cocos anaerobios facultativos, son Gram positivos y se presentan solos, en pares o racimos, no son móviles, ni esporulados; algunos biotipos son capaces de producir una toxina altamente termoestable, así por ejemplo, *Staphylococcus aureus* produce 5 toxinas, que pueden provocar severas intoxicaciones en el hombre. Su metabolismo es oxidativo/fermentativo, es catalasa-positivo y puede metabolizar una gran variedad de carbohidratos en condiciones aeróbicas, con la subsecuente liberación de ácido, principalmente ácido acético con pequeñas cantidades de bióxido de carbono; en condiciones anaerobias, el producto principal de la fermentación es el ácido láctico (SSA,1994).

1.3.2.2 Reservorio

Staphylococcus aureus es una bacteria muy resistente en el medio ambiente y ampliamente distribuida en la naturaleza que puede encontrarse en el aire, agua, residuos, maquinaria y superficies de la industria alimentaria, pero su principal reservorio son los animales y humanos, encontrándose en la piel, cabello, fosas nasales y garganta.

En consecuencia, pueden transmitirse a una amplia gama de alimentos, principalmente alimentos derivados de animales (leche, carne y huevos y los productos derivados) y alimentos consumidos en crudo (frutas, verduras, etc) (elika, 2013).

1.3.2.3 Condiciones de supervivencia

Staphylococcus aureus es una de las bacterias patógenas humanas formadoras de toxinas más resistente y puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco, y son muy persistentes en alimentos con contenido alto en sales y azúcares. Asimismo, sus toxinas son altamente estables, y resistentes al calor, congelación e irradiación, por lo que una vez formadas en el alimento, es extremadamente difícil eliminarlas.

Cuadro 9. Tabla de crecimiento de las toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	10	40-45	48
pH	4	7-8	9.6
Aw	0.85	0.98	0.99

Fuente (elika, 2013)

1.3.2.4 Etiología

Muchas de las 32 especies y subespecies del género *Staphylococcus* pueden encontrarse en los alimentos por contaminación medioambiental, humana y animal.

No obstante, las enterotoxinas estafilocócicas son producidas principalmente por *Staphylococcus aureus*, pero también por *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. delphini*, y actualmente se han identificados 16 tipos de dichas toxinas (elika, 2013).

1.3.2.5 Vías de transmisión

Las toxinas estafilocócicas se pueden transmitir a las personas a través del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas prácticas de cocinado y conservación:

- Contaminación cruzada en las fases posteriores de transformación de los alimentos, y en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
- Personas: Los manipuladores de alimentos pueden ser portadores de *Staphylococcus*, de forma que al preparar los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene y conservación, contaminan los alimentos (elika, 2013).

1.3.2.6 Alimentos a considerar

Los brotes de *Staphylococcus aureus* ocurridos en Europa en los últimos cinco años se han asociado a leche cruda y queso elaborado con ella tanto de vaca, cabra y oveja, seguido de carne cruda y productos cárnicos (salami, etc.).

También se ven implicados los huevos y productos derivados (bollería, cremas, salsas), ensaladas, sándwiches, conservas de pescado, carne y verduras y en general, todos aquellos alimentos preparados y consumidos en crudo que permanezcan a temperaturas de refrigeración durante largos periodos de tiempo (elika, 2013).

1.3.2.7 La toxiinfección alimentaria producida por *Staphylococcus aureus*

Las enterotoxinas estafilocócicas son causa frecuente de un número elevado de brotes de toxiinfección alimentaria. Los síntomas característicos de la intoxicación estafilocócica son náuseas, vómitos, dolores estomacales y abdominales y ocurren rápidamente (1-6h) tras la ingesta del alimento contaminado.

Grupos de riesgo: la deshidratación ligada a los síntomas gastrointestinales hace que sea de especial importancia en personas con el sistema inmunitario débil (bebés y niños menores de 5, personas mayores de 60 años, y enfermos de cáncer, diabéticos, portadores del VIH, pacientes tratados con corticosteroides y otros grupos de riesgo) donde puede desencadenar problemas más graves: des-hidratación, dolor de cabeza, calambres musculares, alteración de la presión sanguínea y coronaria (elika, 2013).

1.3.2.8 Límites legales

Cuadro 10. Límites máximos permisibles de *Staphylococcus aureus* en productos y subproductos de la leche.

Alimento	Límite microbiológico máximo permitido	Fase en la que se aplica el criterio
Quesos, leche en polvo y suero en polvo, tal como se contempla en los criterios para los estafilococos coagulasa positivos	No detectado en 25 gr	Productos comercializados durante su vida útil

Fuente: (elika, 2013)

Así mismo, deben cumplir con los criterios de higiene de los procesos de fabricación relativos a los estafilococos coagulasa positivos.

Cuadro 11. Criterios microbiológicos aplicables a los quesos y sus posteriores modificaciones

Alimento	Límite microbiológico máximo permitido	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultado insatisfactorios
Quesos a base de leche cruda	10 ⁴ 10 ⁵ ufc/g	En el momento del proceso de fabricación en el que se prevea que el número de estafilococos será el máximo.	Mejoras en la higiene de la producción y selección de las materias primas. Si se detectan valores > 10 ⁵ ufc/g, el lote de queso deberá ser sometido a pruebas para enterotoxinas estafilocócicas.
Quesos hechos a base de leche sometida a un tratamiento térmico inferior a la pasteurización y quesos madurados base de leche o suero sometidos a pasteurización o tratamiento térmico más fuerte.	100 1000 ufc/g		
Quesos blandos no madurados (quesos frescos) a base de leche o suero sometido a pasteurización o un tratamiento térmico más fuerte.	10 100 ufc/g	Final del proceso de fabricación.	Mejoras en la higiene de la producción. Si se detectan valores > 10 ⁵ ufc/g, el lote de queso deberá ser sometido a pruebas para enterotoxinas estafilocócicas.
Leche en polvo y suero en polvo.	10 100 ufc/g	Final del proceso de fabricación.	Mejoras en la higiene de la producción. Si se detectan valores > 10 ⁵ ufc/g, el lote de queso deberá ser

			sometido a pruebas para enterotoxinas estafilocócicas.
--	--	--	--

Fuente: (elika, 2013)

1.3.3 *Salmonella* spp.

1.3.3.1 Descripción de la bacteria

Salmonella pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gram negativos, de 0,7-1,5 x 2-5 µm, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*). Fermentan glucosa, maltosa y manitol, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. Son generalmente catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitratos a nitritos (ReNaLOA, 2011).

Pertenece a un grupo de bacterias que están presentes en el intestino de personas y animales sanos, de forma que las heces son el principal foco de contaminación a los alimentos y al agua. Cuando llega a los alimentos frescos, tiene la habilidad de multiplicarse muy rápidamente, y cuando una persona ingiere dicho alimento contaminando, el gran número de bacterias provoca “salmonelosis”, infección gastrointestinal provocada por dicha bacteria (elika, 2013).

1.3.3.2 Reservorio

Las bacterias *Salmonella* spp. viven en el tracto intestinal de animales sanos, principalmente, aves de corral, ganado vacuno y porcino, y animales domésticos (tortugas, perros, gatos, roedores) sin provocar problemas para su salud. En el medio ambiente (heces), esta bacteria sobrevive durante mucho tiempo debido a su gran resistencia a la baja actividad de agua. Asimismo, puede permanecer viable en productos ricos en proteínas y grasas (elika, 2013).

El estado de portador crónico es raro en los seres humanos. Sí se presenta con mayor frecuencia el estado de portador temporal, pero es común en los animales, incluidas las aves. Dado que la bacteria se ubica y multiplica en intestino, es eliminada a través de la materia fecal en forma intermitente, contaminando todo el ambiente que rodea al animal (cama, polvo, plumas, cáscara de huevos, bebederos, comederos, etc.) y de esta manera, a otras aves (transmisión horizontal) (RENAPRA, 2015).

1.3.3.3 Condiciones de supervivencia

Cuando las bacterias *Salmonella* pasan de los animales hospedadores a los alimentos derivados (carne, huevos, leche) es capaz de multiplicarse a una velocidad muy elevada, ya que puede duplicar su número cada 15 ó 20 minutos si la temperatura es elevada (superior a 20° C), y más significativamente, si la temperatura ambiente supera los 30°C, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C (elika, 2013).

Si los alimentos no se refrigeran rápidamente (el límite de crecimiento está en 6° C) el microorganismo se multiplica, con el consiguiente riesgo de contaminar los alimentos. Por tanto, temperatura y tiempo son dos factores claves en el desarrollo de la *Salmonella*.

Cuadro 12. Condiciones de crecimiento de *Salmonella*.

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	5.2	35-43	46.2
pH	3.8	7-7.5	9.5
Actividad del agua	0.93	0.99	>0.99

Fuente: (elika, 2013)

1.3.3.4 Etiología

Se han descrito más de 2.500 serotipos de *Salmonella* que muestran una gran adaptación para el crecimiento en el hombre y los animales. Los serotipos más importantes desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria son *En-teritidis* y *Typhimurium*. En Europa, el serotipo *Enteritidis* se ha convertido en el predominante, principalmente asociado al consumo de huevos o carne de pollo contaminados. *S. Typhimurium* es el segundo serotipo más común después de *S. Enteritidis* en muchos países, siendo las principales fuentes de infección el ganado vacuno y porcino, aunque también se aísla en aves, y ganado ovino y caprino (elika, 2013).

1.3.3.5 Vías de transmisión

La *Salmonella* puede llegar a los alimentos por varias vías:

1. **En origen:** en las explotaciones avícolas y ganaderas por una inadecuada manipulación de los alimentos derivados de los animales. La presencia de *Salmonella* spp. en los alimentos de origen animal es debida, mayoritaria-mente, a contaminación de origen **fecal** durante los procesos de obtención, aparte de la contaminación endógena de los huevos.
2. **En proceso** por falta de higiene e inadecuada manipulación de los alimentos:

- Contaminación cruzada en los mataderos, en las fases posteriores de transformación de los alimentos, y en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
- Personas: Los manipuladores de alimentos pueden ser portadoras de *Salmonella*, de forma que al manipular los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene, contaminan los alimentos.
- Agua: El agua de riego puede estar contaminada con *Salmonella*, transmitiéndose a las frutas y verduras frescas regadas con dicho agua (elika, 2013).

1.3.3.6 Alimentos a considerar

Debido a que la *Salmonella* es un microorganismo sensible a los tratamientos térmicos, se asocia con el consumo de alimentos crudos o poco cocinados.

El huevo contaminado, crudo o poco cocinado, y los ovoproductos y preparados a base de huevo son la principal fuente de infección de *Salmonella*, especialmente aquellos que contienen huevo crudo como la mayonesa, salsas, helados, cremas, masas de pastelería. También, la carne de ave, de cerdo y de vacuno insuficientemente cocinada y carnes fermentadas, leche no pasteurizada y productos derivados pueden estar contaminadas con *Salmonella*. Las frutas y verduras regadas con agua contaminada, también pueden ser transmisoras de la bacteria. Asimismo, el pescado y los moluscos pueden estar infectados si el agua en el que se encuentran está contaminada con *Salmonella* (elika, 2013).

1.3.3.7 Salmonelosis

La Salmonelosis es una enfermedad zoonótica infecciosa, transmitida a través de una gran variedad de alimentos y muy asociada a carnes y subproductos de aves de corral, incluidos los huevos. Rara vez es mortal, excepto en niños muy pequeños, ancianos e inmunocomprometidos- aunque la morbilidad y los costos derivados pueden ser altos.

La **salmonelosis** generalmente se autolimita en personas sanas con sistema inmune intacto. La mortalidad es menor al 1 %, aunque en el caso de *Salmonella* Enteritidis esta tasa es un poco mayor. Los **síntomas** son: náuseas, vómitos, dolores abdominales, diarrea, fiebre, dolor de cabeza; comienzan entre 6 y 72 horas después de la exposición y duran de 4 a 7 días, dependiendo de factores del huésped, dosis ingerida y características de la cepa. La enfermedad puede presentar las siguientes *complicaciones*: deshidratación que puede llevar a la muerte en los niños, los ancianos y los inmunocomprometidos si no son tratados con rapidez, septicemia o abscesos localizados en órganos internos y/o articulaciones;

también artritis reactiva (como respuesta autoinmune) que se puede presentar 3 a 4 semanas después del comienzo de los síntomas agudos (RENAPRA, 2015).

1.3.3.8 Límites legales

Cuadro 13. Criterios microbiológicos de Salmonella aplicados a productos alimenticios.

Alimento	Límite microbiológico máximo permitido	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
Canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas	Ausencia en la zona examinada por canal	Canales después de su faenado, pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio, revisión de los controles del proceso y del origen de los animales
Canales porcinos	Ausencia en la zona examinada por canal	Canales después de su faenado, pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio, revisión de los controles del proceso y del origen de los animales
Canales de pollos de carne y pavos	Ausencia en 25 g de una muestra conjunta de piel del cuello	Canales tras el enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen

Fuente: (elika, 2013)

1.4 ADN

1.4.1 Definición

ADN es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos. La molécula de ADN consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Enganchado a cada azúcar hay una de las siguientes 4 bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T). Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces entre las bases; la adenina se enlaza con la timina, y la citosina con la guanina. La secuencia de estas bases a lo largo de la cadena es lo que codifica las instrucciones para formar proteínas y moléculas de ARN. El ADN se organiza estructuralmente en cromosomas. A nivel funcional se organiza en genes, que son piezas de ADN que generan características físicas específicas (Institute, 2019).

El ADN es el constituyente de los genes y por ello el portador de la información genética. Con la replicación del ADN en el proceso celular los caracteres genéticos pasan a las células descendientes que reproducen cadenas de ADN con una estructura complementaria de las originales, lo que permite la obtención de dobles cadenas de ADN en las células hijas, idénticas a las parentales de la célula original (Illana, 2014).

1.4.2 Estructura y función del DNA

El DNA es una doble hélice, entrelazada y sumamente larga que almacena información genética. Sus componentes se ordenan con una relación química específica, lo que determina la estructura tridimensional del DNA del cual derivan consecuencias funcionales. En la doble hélice, las bases enfrentadas se aparean y permanecen unidas por puentes de hidrogeno. Las bases apareadas deben ser siempre combinaciones de una purina con una pirimidina. No solamente las purinas no pueden aparearse con purinas, ni las pirimidinas con pirimidinas, sino que, a causa de las estructuras particulares de las bases, la adenina solo se aparea con la timina, formando dos puentes de hidrogeno (A=T) y la guanina solamente con la citosina, formando tres puentes de hidrogeno (G=C). Las bases apareadas son complementarias, y además cumplen con la denominada “Ley de Chargaff”, que dice que la cantidad de adenina (A) es igual que la de timina (T) y que la de guanina (G) es igual que la de citosina (C): A=T y G=C, pero el número de A+T y el de G+C no son iguales entre sí (Brandan, 2011).

Dado que una molécula de DNA puede tener miles de nucleótidos de largo, es posible obtener una gran variedad de secuencias de bases diferentes, y la variedad es uno de los requisitos primarios del material genético.

Otra característica de la cadena es que la misma tiene dirección: cada grupo fosfato está unido a un azúcar en la posición 5' -el quinto carbono en el anillo de azúcar- y al otro azúcar en la posición 3' -el tercer carbono en el anillo de azúcar-. Así, la cadena tiene un extremo 5' y un extremo 3'.

Las dos cadenas corren en direcciones opuestas, es decir, la dirección desde el extremo 5' al 3' de cada cadena es opuesta y se dice que las cadenas son antiparalelas. Aunque los nucleótidos dispuestos a lo largo de una cadena de la doble hélice pueden presentarse en cualquier orden, su secuencia determina el orden de los nucleótidos en la otra cadena. Esto es necesariamente así, porque las bases son complementarias (G con C y A con T).

La función principal de la secuencia de bases a lo largo de la hebra de DNA es almacenar y transmitir durante generaciones la “memoria genética” para codificar la síntesis de todas las proteínas (proteoma) del cuerpo humano (Brandan, 2011).

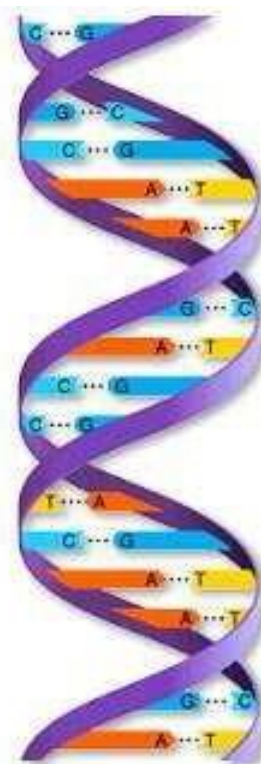
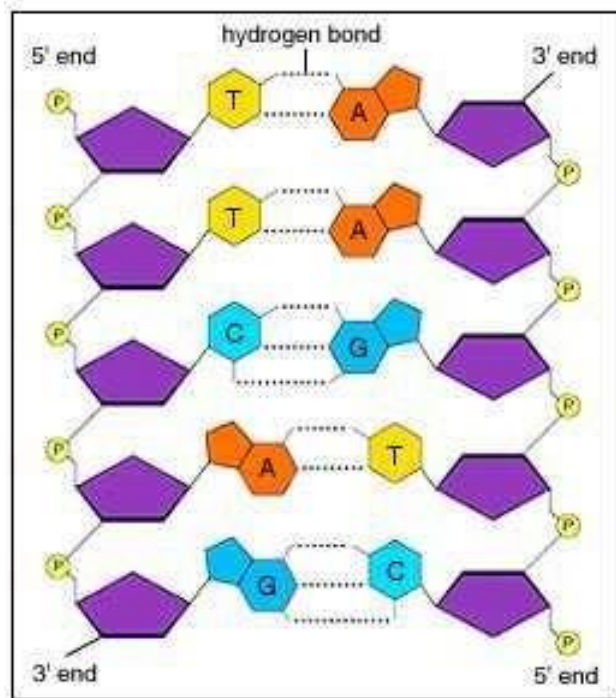


Figura 5. Modelo de doble hélice del ADN

1.4.2.1 Historia del modelo de “doble hélice”

La estructura definitiva del modelo de *doble hélice* la explicaba Watson en una carta a Delbrück el día 12 de marzo de 1953.

Watson (1953) decía que “las características más importantes de este modelo eran las siguientes: 1) la estructura básica era helicoidal, constaba de dos hélices que se entrecruzan, el corazón de la hélice estaba ocupado por las bases purínicas y pirimidínicas, los grupos fosfato estaban en el exterior; y 2) las hélices no eran idénticas, sino complementarias de manera que si una hélice contenía una base purínica la otra contenía una pirimidínica, esta característica era producto de su intento de que los residuos fueran equivalentes y, al mismo tiempo, de situar las bases purínicas y pirimidínicas en el centro. El apareamiento de las purinas con las pirimidinas era muy exacto y obedecía a su deseo de formar enlaces de hidrógeno, la adenina formaría pareja con la timina mientras que la guanina siempre lo haría con la citidina” (p.237).

El modelo definitivo se publicó en la revista *Nature* el 25 de abril de 1953, junto a otros artículos de Wilkins, Stokes y Wilson, y de Franklin y Gosling, por especial acuerdo de todos ellos. Posteriormente, Watson y Crick escribieron un artículo de carácter más especulativo sobre las implicaciones genéticas de su estructura del ADN. Entre las líneas de su texto original conviene destacar lo siguiente:

“A pesar de estas incertidumbres pensamos que la estructura del ácido desoxirribonucleico que proponemos puede contribuir a resolver uno de los problemas biológicos fundamentales, la base molecular de la plantilla necesaria para la autorreproducción genética. La hipótesis que sugerimos es que esta plantilla es el patrón de bases formado por una cadena del ácido desoxirribonucleico y que el gen contiene un par complementario de estas plantillas”. (Illana, 2014)

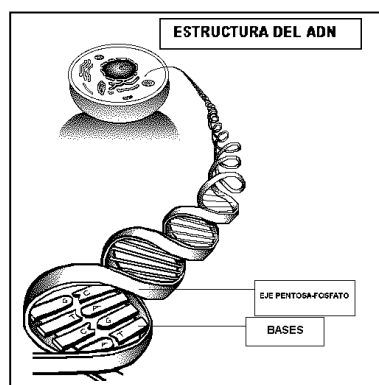


Figura 6. Estructura del ADN según Watson y Crick

Watson y Crick postularon un modelo preciso para la estructura tridimensional del ADN, en el que explicaban cómo la información genética podía replicarse con exactitud. El modelo proponía que dos cadenas o hebras de polinucleótidos se hallaban enrolladas en forma de hélice alrededor de un mismo eje, constituyendo así una doble hélice. El enrollamiento de ambas cadenas es tal que no pueden separarse sin desenrollarse (Illana, 2014).

Las bases se encuentran en el interior de la doble hélice, con sus planos paralelos entre sí, y perpendiculares al eje de la doble hélice. Las bases de una de las hebras están apareadas en los mismos planos con las bases de la otra hebra. El apareamiento de las bases es de tal forma que sólo encajan en la estructura determinados pares de bases que pueden ligarse entre sí, por enlaces de hidrógeno. Los pares permitidos son adenina-timina y guanina-citosina, precisamente los pares de bases que muestran equivalencia en el ADN (Illana, 2014).

Después del establecimiento del modelo de doble hélice por James Watson y Francis Crick, y con todas las aportaciones anteriores, y algunas posteriores, los ácidos nucleicos se consideran los constituyentes químicos de los genes y los que regulan la reproducción celular y la biosíntesis de proteínas. Los ácidos nucleicos son los portadores de la información genética celular (Illana, 2014).

1.4.3 Replicación del DNA

Es el proceso por el cual se copia cada cadena del DNA para dar origen a una nueva cadena de DNA complementaria. Esto ocurre en cada división celular y asegura que la información genética sea transmitida a ambas células hijas. La síntesis de DNA involucra la acción altamente coordinada de muchas proteínas que se encuentran en un complejo denominado replisoma. Durante la replicación cada cadena de DNA sirve como molde para la formación de una nueva cadena. Esto se conoce como replicación semiconservadora. También existe replicación durante la recombinación y la reparación del DNA dañado (Brandan, 2011).

La replicación del DNA comienza en una secuencia de nucleótidos particular en el cromosoma: el origen de la replicación. Ocurre bidireccionalmente por medio de dos horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas. Las enzimas helicasas desenrollan la doble hélice en cada horquilla de replicación y proteínas de unión a cadena simple estabilizan las cadenas separadas. Otras enzimas, las topoisomerasas, relajan el superenrollamiento de la hélice, ya que cortan las cadenas por delante de las horquillas de replicación y luego las vuelven a unir (Brandan, 2011).

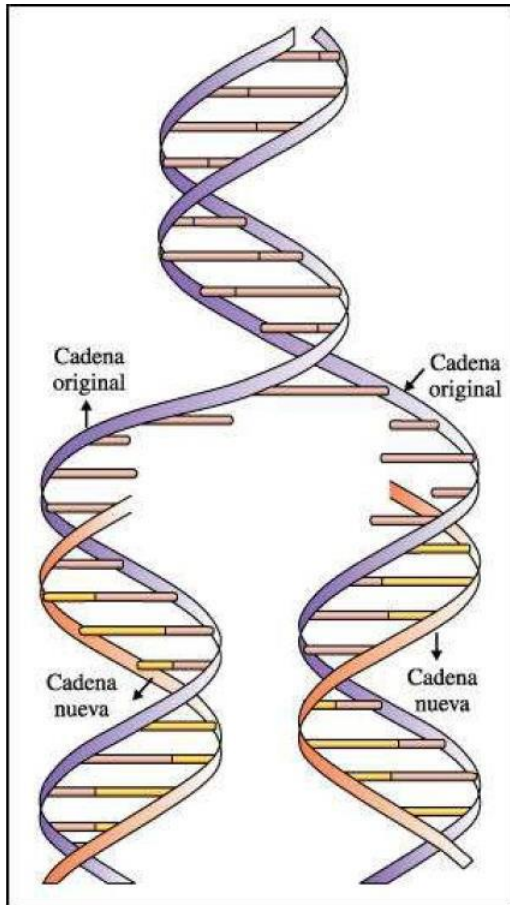


Figura 7. Replicación del DNA



Figura 8. Enzima topoisomerasa

Para que pueda comenzar la replicación se necesita una secuencia de cebador de RNA sintetizado por la enzima RNA primasa, con sus bases correctamente apareadas con la cadena molde. La adición de nucleótidos de DNA a la cadena es catalizada por las DNA polimerasas. Estas enzimas sintetizan nuevas cadenas solo en la dirección 5' a 3', añadiendo nucleótidos uno a uno al extremo 3' de la cadena creciente. La replicación de la cadena adelantada es continua, pero la replicación de la cadena rezagada es discontinua. En la cadena rezagada, fragmentos de Okazaki se sintetizan en la dirección 5' a 3'. Cuando un fragmento de Okazaki ha crecido lo suficiente como para encontrar a un cebador de RNA por delante de él, otra DNA polimerasa reemplaza a los nucleótidos de RNA del cebador con nucleótidos de DNA. Luego, la DNA ligasa conecta cada fragmento con el fragmento contiguo recién sintetizado en la cadena (Brandan, 2011).

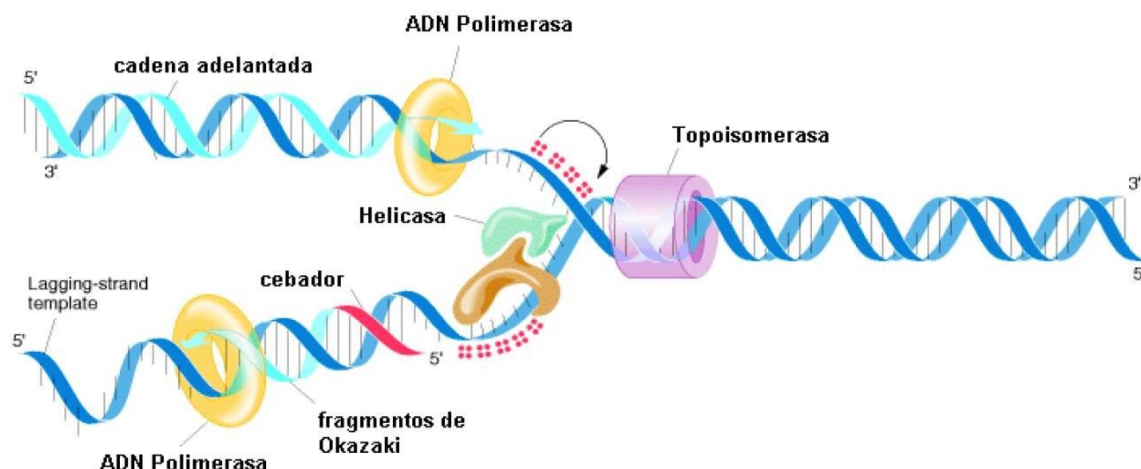


Figura 9. Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN.

En el proceso de replicación del DNA se pierden nucleótidos en los extremos de las moléculas de DNA lineales. En algunas células eucarióticas, esta pérdida es compensada por la actividad de la enzima telomerasa. En el curso de la síntesis de DNA, la DNA polimerasa corrige los errores, retrocediendo cuando es necesario para eliminar nucleótidos que no estén correctamente apareados con la cadena molde. Otros errores en el DNA ocurren en forma independiente del proceso de replicación y son usualmente reparados por distintos mecanismos. Los nucleótidos, antes de ser incorporados a las cadenas crecientes de DNA, se encuentran en forma de trifosfatos. La energía requerida para impulsar la replicación proviene de la eliminación de dos fosfatos "supernumerarios" y la degradación del enlace P ~ P (Brandan, 2011).

1.5 ARN

1.5.1 Definición

El ácido ribonucleico (ARN o RNA, de RiboNucleic Acid, su nombre en inglés) es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN). El ARN celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus es

de doble hebra. En los organismos celulares desempeña diversas funciones. Es la molécula que dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica; el ADN no puede actuar solo, y se vale del ARN para transferir esta información vital durante la síntesis de proteínas (producción de las proteínas que necesita la célula para sus actividades y su desarrollo). Varios tipos de ARN regulan la expresión génica, mientras que otros tienen actividad catalítica. El ARN es, pues, mucho más versátil que el ADN (Dahm, 2005).

1.5.2 Descubrimiento e historia

Los ácidos nucleicos fueron descubiertos en 1868 por Friedrich Miescher, que los llamó nucleína ya que los aisló del núcleo celular. Más tarde, se comprobó que las células procariotas, que carecen de núcleo, también contenían ácidos nucleicos. El papel del ARN en la síntesis de proteínas fue sospechado en 1939. Severo Ochoa ganó el Premio Nobel de Medicina en 1959 tras descubrir cómo se sintetizaba el ARN. En 1965 Robert W. Holley halló la secuencia de 77 nucleótidos de un ARN de transferencia de una levadura, con lo que obtuvo el Premio Nobel de Medicina en 1968. En 1967, Carl Woese comprobó las propiedades catalíticas de algunos ARN y sugirió que las primeras formas de vida usaron ARN como portador de la información genética tanto como catalizador de sus reacciones metabólicas (hipótesis del mundo de ARN). En 1976, Walter Fiers y sus colaboradores determinaron la secuencia completa del ARN del genoma de un virus ARN (bacteriófago MS2). En 1990 se descubrió en Petunia que genes introducidos pueden silenciar genes similares de la misma planta, lo que condujo al descubrimiento del ARN interferente. Aproximadamente al mismo tiempo se hallaron los micro ARN, pequeñas moléculas de 22 nucleótidos que tenían algún papel en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*. El descubrimiento de ARN que regulan la expresión génica ha permitido el desarrollo de medicamentos hechos de ARN, como los ARN pequeños de interferencia que silencian genes (Ruvkun, 2001).

1.5.3 Características genéricas del ARN

Basándonos en la estructura del RNA, se puede apreciar que éste es químicamente muy similar al DNA y contiene clásicamente cuatro tipos de nucleótidos unidos por enlaces fosodiéster en dirección 3'- 5'. Dos diferencias existen en la composición química entre el DNA y el RNA; la primera es que el azúcar constitutivo del DNA es la desoxirribosa, en tanto que el RNA contiene ribosa, la cual, a su vez, contiene un grupo hidróxilo (OH) adicional; la segunda diferencia es que el RNA no contiene la base nucleotídica timidina y, en su lugar, posee la base nucleotídica uracilo. A diferencia del DNA que es una doble cadena, el RNA

generalmente es de una sola cadena, a excepción hecha por la estructura secundaria propia del RNA, la cual permite la formación de dobles cadenas por interacciones nucleotídicas o apareamiento de bases intracadena (Jímenez & Merchant, 2003).

1.5.4 Estructura y función del RNA

La estructura del RNA está estabilizada por las mismas fuerzas que estabilizan el DNA y su flexibilidad conformacional se encuentra limitada por muchas de las características que limitan la conformación del DNA. De hecho, el RNA puede ser aún más rígido que el DNA debido a la presencia de un número mayor de moléculas de agua que forman enlaces de hidrogeno con los grupos 2'-OH del RNA. Aun así, el RNA presenta una mayor variedad de formas y tamaños que el DNA, y en algunos casos tiene actividad catalítica. Aunque el DNA determina el tipo de producto bioquímico que la célula sintetiza, la transmisión y la decodificación de la información necesaria para la síntesis de proteínas las lleva a cabo el RNA, cuya formación la dirige el DNA. La estructura general del RNA se diferencia de la del DNA en tres aspectos: el RNA es una molécula de cadena simple en lugar de doble; el azúcar presente en cada nucleótido de RNA es ribosa en lugar de desoxirribosa y en vez de la base timina, el RNA posee uracilo (Brandan, 2011).

Se conocen tres tipos de RNA: mRNA, tRNA y rRNA. Los tres tipos de RNA se sintetizan en el núcleo mediante enzimas RNA polimerasas bajo la dirección del DNA. Dado que el azúcar ribosa del RNA es más susceptible a la degradación que la degradación de desoxirribosa presente en el DNA, los tres tipos de moléculas de RNA en el citoplasma celular pueden modificarse con rapidez en respuesta a señales extracelulares (Brandan, 2011).

- **RNA mensajero (mRNA):** El mRNA es la plantilla para la síntesis de proteínas. Es una molécula larga que contiene desde varios cientos a varios miles de nucleótidos. Cada grupo de tres nucleótidos forma un codón que se complementa exactamente con el triplete de nucleótidos del DNA. El mRNA se forma mediante un proceso denominado transcripción.

- **RNA de transferencia (tRNA):** La molécula de tRNA con forma de trébol contiene solo 80 nucleótidos, y su función consiste en aportar la forma activada de los aa a moléculas de proteína en los ribosomas. Se conocen por lo menos 20 tipos distintos de tRNA, cada uno de los cuales reconocen y fijan un solo tipo de aa. Cada molécula de tRNA posee dos sitios de reconocimiento: el primero es complementario para el codón de mRNA y el segundo es complementario para el aa propiamente dicho. Cada tipo de mRNA transporta su aa

específico a los ribosomas, donde tiene lugar la síntesis de proteínas; allí el tRNA reconoce el codón apropiado sobre el mRNA y aporta el aa a la molécula proteica en formación.

• **RNA ribosómico (rRNA):** El ribosoma es la estructura física en el citoplasma en la que tiene lugar la síntesis de proteínas. El rRNA constituye el 60% del ribosoma; el resto está formado por proteínas estructurales y enzimas necesarias para la síntesis de proteínas. El rRNA se sintetiza en el núcleo, pero a diferencia de los otros tipos de RNA, este proceso se realiza en el nucléolo. El rRNA formado se combina con proteínas ribosómicas del núcleo para producir el ribosoma, el cual más tarde es transportado al citoplasma. Al llegar allí, la mayoría de los ribosomas se fijan al retículo endoplasmático y comienzan a sintetizar proteínas (Brandan, 2011).

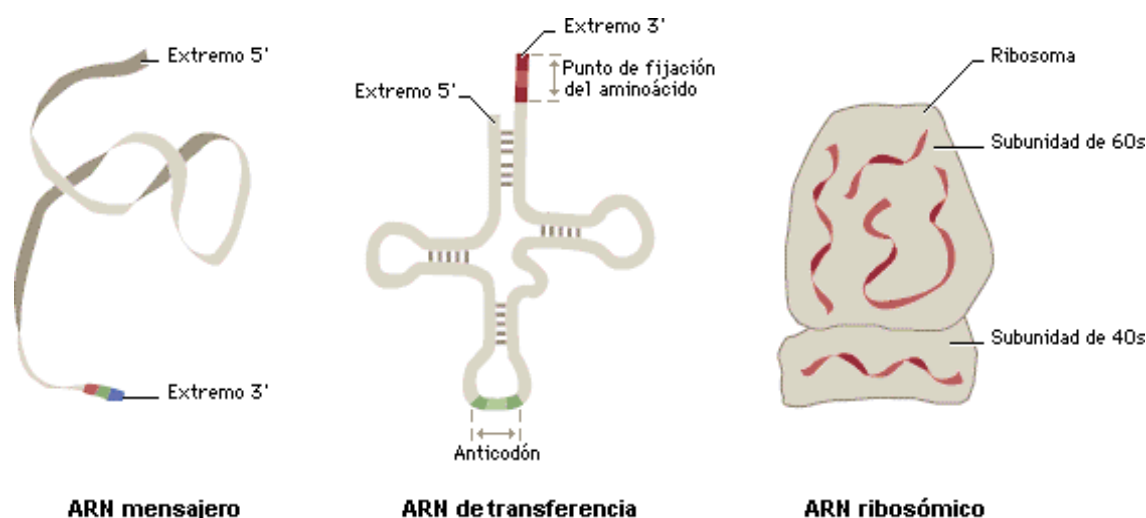


Figura 10. Representación estructural de los tres tipos de ARN

1.6 PCR

1.6.1 Historia de la PCR

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores. Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros de la compañía californiana Cetus Corporation la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de

iniciadores para la secuenciación de ADN. Mullis y colaboradores usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adicionaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y nucleótidos trifosfatados. Como resultado obtuvieron la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores. En un principio, para llevar a cabo el ciclo de PCR, se calentaba la mezcla en baño María, pero cuando llegaba a más de 90°C para desnaturalizar la doble hélice, la ADN polimerasa de *E. coli* se inactivaba. Por este motivo, cada que se calentaba a estas temperaturas se tenía que adicionar nueva enzima a la mezcla. El proceso original era poco eficiente, utilizaba grandes cantidades de ADN polimerasa y necesitaba de supervisión durante todo el proceso (Serrato, 2008).

El elemento que mejoro la técnica fue el descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables y termoactivas (que no pierden su actividad con temperaturas altas). En 1976 se aisló la primera polimerasa termoestable conocida como Taq polimerasa, a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en ambientes acuáticos con temperaturas cercana a los 100 °C. Esta nueva enzima permitió la simplificación y automatización de la PCR, sin necesidad de adicionar polimerasa en cada uno de los ciclos (Serrato, 2008).

La Taq polimerasa es la enzima más utilizada en la PCR, pero presenta la desventaja de que no tiene actividad “correctora” (actividad nucleasa 3' → 5'), por lo que existe la probabilidad de introducir errores durante el copiado del ADN. Afortunadamente, se han encontrado ADN polimerasas termoestables, termoactivas y de alta fidelidad (con actividad “correctora”) provenientes de bacterias del dominio *Archaea*, como la ADN polimerasa Pfu de *Pyrococcus furiosus* (Serrato, 2008).

En la actualidad, para llevar a cabo la PCR, únicamente se necesita mezclar en micro tubos el ADN molde, la ADN polimerasa; los desoxirribonucleótidos adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP); una solución amortiguadora; un cofactor de la polimerasa (regularmente se usa magnesio) y los iniciadores (Anexo 1). La reacción se efectúa en equipos conocidos como termocicladores que se programan para que produzcan los ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación (Serrato, 2008).

1.6.2 Definición

La **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** es una técnica de laboratorio común utilizada para hacer muchas copias (millones o miles de millones) de una región particular de ADN. Esta región de ADN puede ser cualquier cosa que le interese al experimentador. Por ejemplo, podría ser un gen cuya función quiere entender un investigador o un marcador genético usado por científicos forenses para relacionar el ADN de la escena del crimen con los sospechosos. Por lo general, el objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda analizarse o usarse de alguna otra manera. Por ejemplo, el ADN amplificado por PCR se puede secuenciar, visualizar por electroforesis en gel o clonar en un plásmido para otros experimentos. (Greif, 2013)

La PCR se utiliza en muchas áreas de la biología y la medicina, como la investigación en biología molecular, el diagnóstico médico e incluso algunas ramas de la ecología (Greif, 2013).

1.6.3 La Taq polimerasa

Al igual que la replicación de ADN en un organismo, la PCR requiere de una enzima ADN polimerasa que produzca nuevas cadenas de ADN mediante el uso de las cadenas existentes como molde. La ADN polimerasa que normalmente se utiliza en la PCR se llama Taq polimerasa, por la bacteria tolerante al calor de la que se aisló (*Thermus aquaticus*). *T. aquaticus* vive en aguas termales y fuentes hidrotermales. Su ADNpolimerasa es muy termoestable y su mayor actividad se presenta cerca de los 70°C (temperatura a la que la ADN polimerasa de ser humano o de *E. coli* no funcionaría). La Taq polimerasa es ideal para la PCR gracias a esta estabilidad térmica. Como veremos, laPCR utiliza altas temperaturas repetidamente para desnaturalizar el molde de ADN o separar sus cadenas (Greif, 2013).

1.6.4 Cebadores para PCR

Al igual que otras ADN polimerasas, la *Taq* polimerasa solo puede hacer ADN si hay un cebador, una corta secuencia de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN. En una reacción de PCR, la región de ADN que será copiada, o amplificada, se determina por los cebadores que el o la investigadora elija (Greif, 2013).

Los cebadores para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud. En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanca (la región que debe ser copiada). Es decir,

les agregan secuencias que harán que se unan a cadenas opuestas del molde de ADN solo en los extremos de la región a copiar. Los cebadores se unen al molde mediante complementariedad de bases (Greif, 2013).

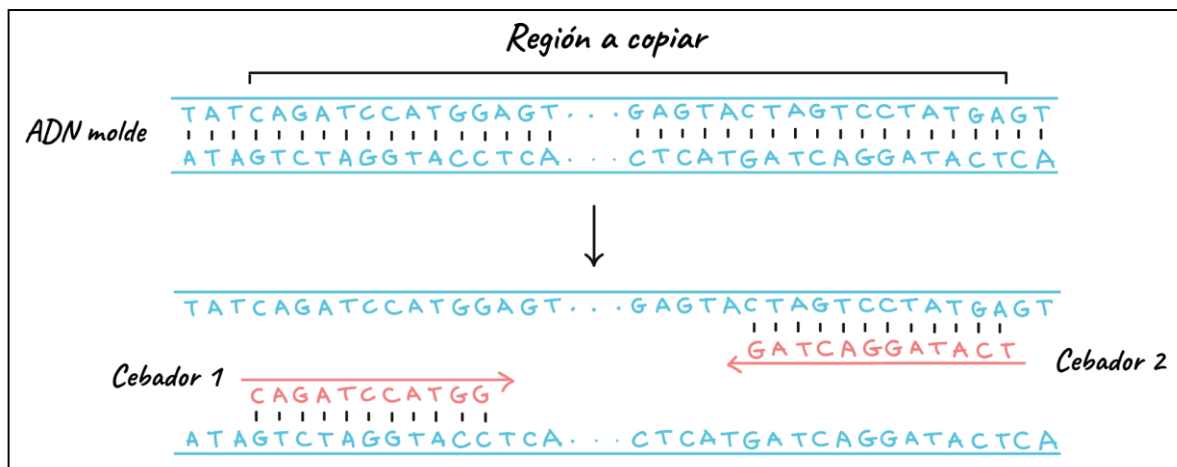


Figura 11. Los cebadores se unen al molde, la polimerasa los extiende y la región que se encuentra entre ellos se copia

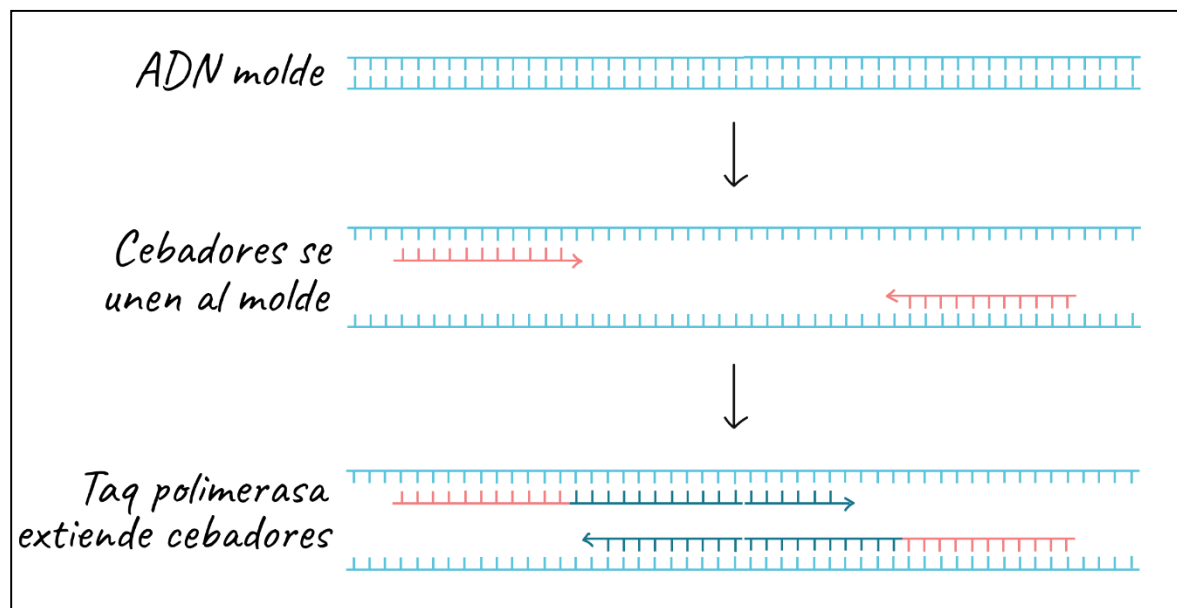


Figura 12. Extensión de los cebadores por la Taq polimerasa

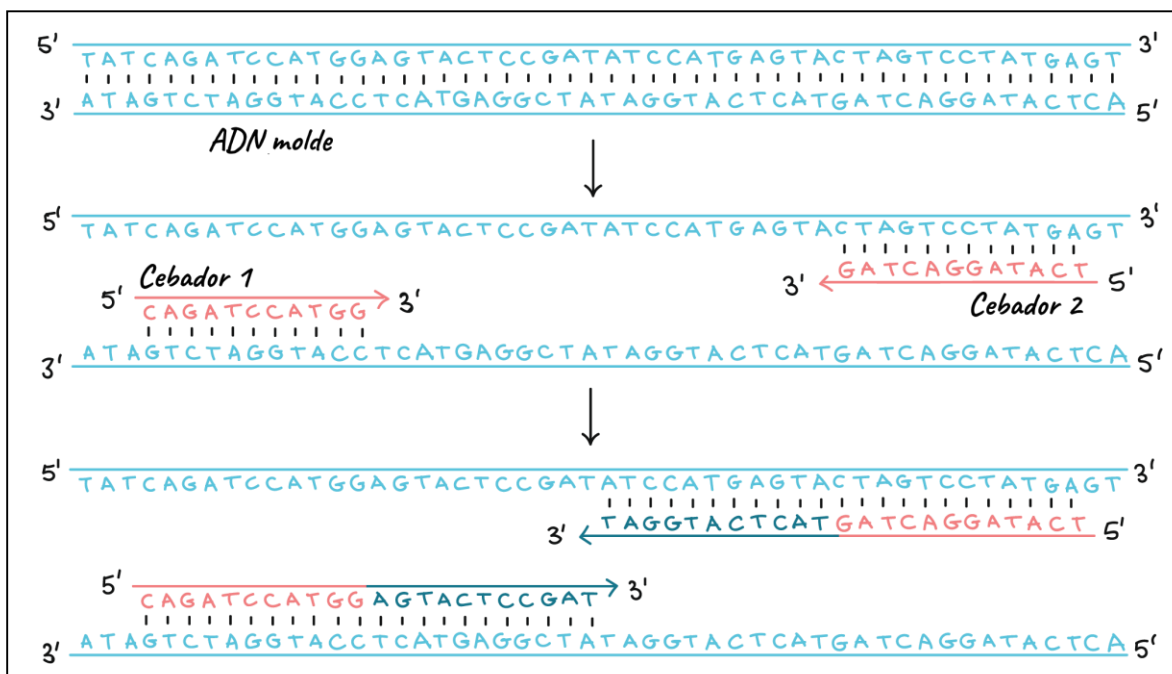


Figura 13. Los dos cebadores, apuntan "hacia adentro" al unirse, es decir, en dirección 5' a 3' hacia la región a copiar. Al igual que otras ADN polimerasas, la *Taq* polimerasa solo puede sintetizar ADN en dirección 5' a 3'. Al extenderse los cebadores, la región que se encuentra entre ellos se copia.

1.6.5 Pasos de la PCR

Los ingredientes clave para una reacción de PCR son *Taq* polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos (los bloques básicos del ADN). Los ingredientes se colocan en un tubo, junto con los cofactores que necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN (Serrato, 2008).

Los pasos básicos son:

1. **Desnaturalización** (96°C): la reacción se calienta bastante para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.
2. **Templado** (55 – 65°C): la reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.
3. **Extensión** (72°C): la temperatura de la reacción se eleva para que la *Taq* polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.

Este ciclo se repite 25 – 35 veces en una reacción de PCR típica, que generalmente tarda 2 - 4 horas, según la longitud de la región de ADN que se copia. Si la reacción es eficiente (funciona bien), puede producir miles de millones de copias a partir de una o unas cuantas copias de la región blanco (Serrato, 2008).

Eso es porque no solo se usa el ADN original como molde en cada ciclo. En realidad, el nuevo ADN que se produce en una ronda puede servir como molde en la siguiente ronda de síntesis de ADN. Hay muchas copias de los cebadores y muchas moléculas de *Taq* polimerasa flotando en la reacción, por lo que el número de moléculas de ADN casi puede duplicarse en cada ciclo. La siguiente imagen muestra este patrón de crecimiento exponencial (Serrato, 2008).

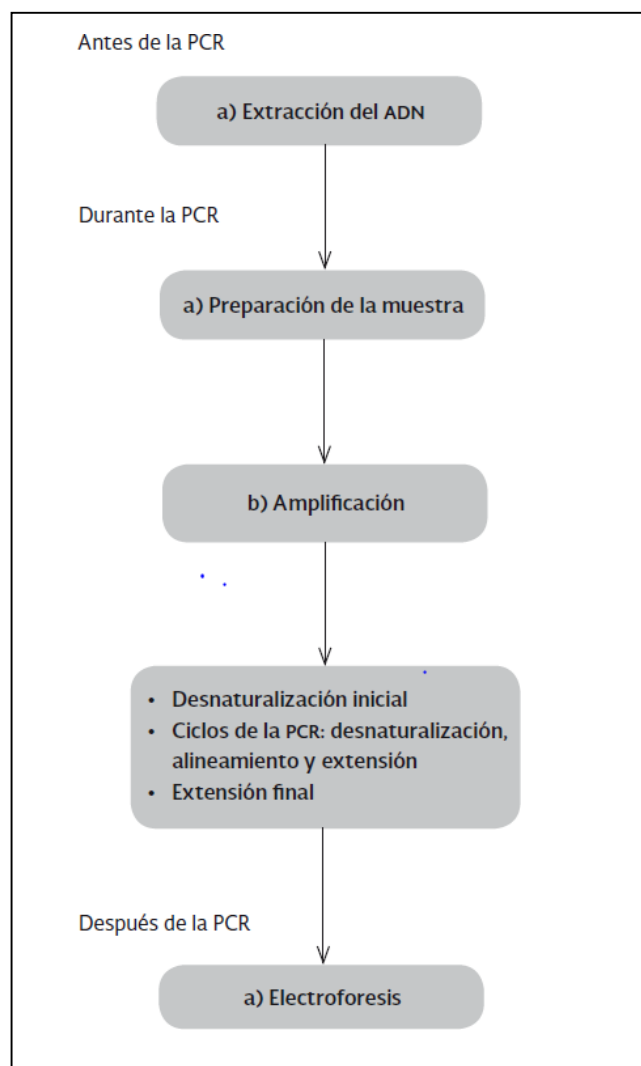


Figura 14. Etapas de la técnica PCR

1.6.6 Aplicaciones de la PCR

Mediante el uso de la PCR, una secuencia de ADN se puede amplificar millones o miles de millones de veces y producirá suficientes copias de ADN para que se analicen mediante otras técnicas. Por ejemplo, el ADN se puede visualizar por electroforesis en gel, enviara secuenciar o digerir con enzimas de restricción y clonar en un plásmido.

La PCR se utiliza en muchos laboratorios de investigación, y también tiene aplicaciones prácticas en medicina forense, pruebas genéticas y diagnósticas. Por ejemplo, la PCR se utiliza para amplificar genes asociados con trastornos genéticos a partir del ADN de los pacientes (o de ADN fetal, en el caso de pruebas prenatales). La PCR también puede utilizarse para detectar el ADN de una bacteria o un virus en el cuerpo de un paciente: si el patógeno está presente, es posible amplificar regiones de su ADN de una muestra de sangre o tejido (Academy, 2016).

1.7 Electroforesis

1.7.1 Definición

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones (Fierro, 2014).

La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizar la técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a Vin Thorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se obtenían de partículas purificadas de polyomavirus. Su razonamiento era que una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción permitiría el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN. Este es exactamente el principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos. Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo. Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través

de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hace que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación (Fierro, 2014).

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular. El DNA problema que se va a analizar mediante electroforesis en gel de agarosa en esta práctica es DNA plasmídico. Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y de pequeño tamaño (entre dos y varios cientos de kilobases) que se encuentran en muchas especies bacterianas. Se caracterizan porque se replican de manera independiente del DNA cromosómico bacteriano, tienen su propio origen de replicación, y no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyan a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos. Una determinada célula bacteriana puede no tener ningún plásmido o puede albergar un número variable de los mismos. Algunas clases de plásmidos poseen la propiedad conocida como “replicación relajada”, esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación (Padilla y otros, 2010).

1.7.2 Componentes de la electroforesis en el gel de agarosa

1.7.2.1 Agarosa

La agarosa, coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal (con un peso molecular medio de ~12 000 Da) formado por la repetición de la unidad básica, la agarobiosa, que comprende unidades alternadas de galactosa y 3,6- anhidrogallactosa. La agarosa es muy frágil y las manipulaciones pueden destruirla con facilidad. Los geles de agarosa poseen grandes «poros» y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes con un peso molecular de más de 200 kDa (Soma, 2017).

Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada por cuanto las bandas que se forman en los geles tienen tendencia a ser difusas y a

esparcirse. Ello obedece al tamaño de los poros y no puede controlarse. Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta que la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido. Al endurecerse, la agarosa forma una matriz cuya densidad viene determinada por su concentración (Soma, 2017).

1.7.2.2 Tampón de electroforesis

La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductancia eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o ni siquiera se desplaza. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductancia eléctrica es muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. En el peor de los casos, el gel se funde y el ADN se desnaturaliza (Soma, 2017).

Se dispone de varios tipos de tampones para la electroforesis de ADN nativo bicatenario. Contienen EDTA (pH 8.0) y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o tris-fosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50 mM (pH 7.5 – 7.8). Los tampones de electroforesis suelen prepararse en forma de soluciones concentradas y se conservan a temperatura ambiente. El TBE se utilizaba inicialmente a una concentración de trabajo de 1x en el caso de la electroforesis en gel de agarosa. No obstante, una solución de trabajo de 0.5x proporciona un poder más que suficiente y en la actualidad prácticamente todas las electroforesis en gel de agarosa se practican utilizando esta concentración (Soma, 2017).

1.7.2.3 Concentración de agarosa

Un fragmento de ADN de un tamaño determinado migra a diferentes velocidades a través de los geles según la concentración de agarosa. En función de la concentración de agarosa o tampón, se pueden separar segmentos de ADN que contengan de 20 a 50 000 pb. En los geles horizontales, la agarosa se emplea por lo general en concentraciones comprendidas entre un 0,7 % y un 3 % (Soma, 2017),

Cuadro 14. Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas de ADN lineales.

% agarosa	Gamas de tamaños de ADN (pb)
0.75	10 000 – 15 000
1	500 – 10 000

1.25	300 – 5 000
1.5	200 – 4 000
2	100 – 2 500
2.5	50 – 1 000

Fuente: (Soma, 2017)

1.7.2.4 ADN marcador

Para una tensión, un gel de agarosa y unas concentraciones de tampón determinadas, la distancia de migración depende del peso molecular del material inicial. Así pues, debe cargarse un ADN marcador de tamaño conocido en las ranuras situadas en los extremos derecho e izquierdo del gel. Generalmente un marcador contiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo cual facilita la labor de determinar el tamaño de los ADN desconocidos en caso de que se produjese alguna distorsión sistemática del gel durante la electroforesis (Soma, 2017).

1.7.2.5 Tampón de cargas

Las muestras de ADN que deben cargarse en el gel de agarosa se mezclan en primer lugar con un tampón de carga que por lo general contiene agua, sacarosa y un colorante (por ejemplo, cianol de xileno, azul de bromofenol, verde de bromocresol, etc.). La cantidad máxima de ADN que puede cargarse depende del número de fragmentos. La cantidad mínima de ADN que puede detectarse mediante fotografía de los geles teñidos con bromuro de etidio es de aproximadamente 2 ng en una banda de 0,5 cm de ancho. Si una banda de este ancho contiene más de 500 ng de ADN, la ranura estará sobrecargada y se producirá emborronamiento. El tampón de carga se emplea con tres fines:

- Aumentar la densidad de las muestras para que las gotas de ADN caigan uniformemente en el pocillo
- Añadir color a la muestra, simplificando de este modo el proceso de carga
- Incorporar un colorante a la muestra que, en un campo eléctrico, se desplace hacia el ánodo a una velocidad previsible (Soma, 2017).

1.7.3 Uso de la electroforesis en gel para visualizar los resultados de una PCR

Habitualmente, los resultados de una reacción de PCR se visualizan (se hacen visibles) al usar electroforesis en gel. La electroforesis en gel es una técnica en la que una corriente eléctrica impulsa fragmentos de ADN a través de una matriz de gel y los fragmentos de ADN se separan según su tamaño. Típicamente se incluye un estándar, o marcador de

peso molecular, para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR (Greif, 2013).

Los fragmentos de ADN de la misma longitud forman una "banda" en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se una al ADN. Por ejemplo, una reacción de PCR que produce un fragmento de 400400400 pares de bases (pb) se vería así en un gel:

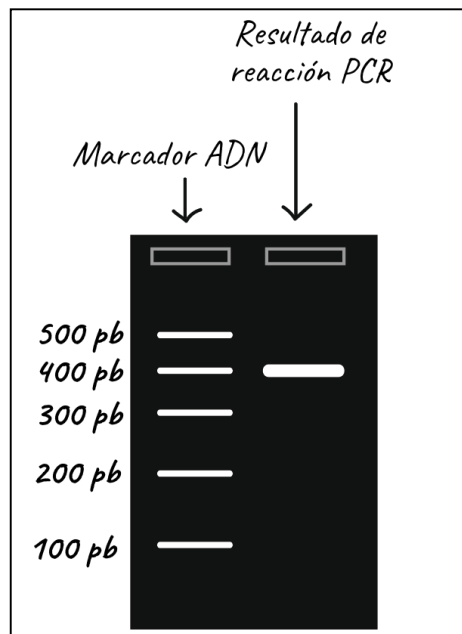


Figura 15. Resultado gráfico de una electroforesis

Una banda de ADN contiene muchas, muchas copias de la región blanco de ADN, no solo una o unas cuantas copias. Dado que el ADN es microscópico, deben existir muchas copias de este para poder verlo a simple vista. Esto es una parte importante de por qué la PCR es una herramienta importante: produce suficientes copias de una secuencia de ADN para poder ver o manipular esa región de ADN (Greif, 2013).

1.7.3.1 Visualización de productos de PCR:

El procedimiento más común para el análisis de los fragmentos obtenidos en la PCR es la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida. La electroforesis permite separar fragmentos de acuerdo a su tamaño. Los fragmentos de ADN (cargados negativamente) se desplazan por el gel a través de un campo eléctrico hacia el polo positivo. Los fragmentos más pequeños migran más rápido y son los que vemos más abajo en el gel. La elección de

la matriz (agarosa o acrilamida) y el porcentaje en la cual separar los productos, dependerá del tamaño de los mismos y los largos diferentes que deseemos separar. Generalmente, los geles de agarosa se visualizan agregando Bromuro de etidio, un agente que se intercala en el ADN y fluoresce cuando es expuesto a la luz UV, y en el caso de los geles de acrilamida, la tinción se realiza con nitrato de plata, que por interacciones electrostáticas se une al ADN (Greif, 2013).

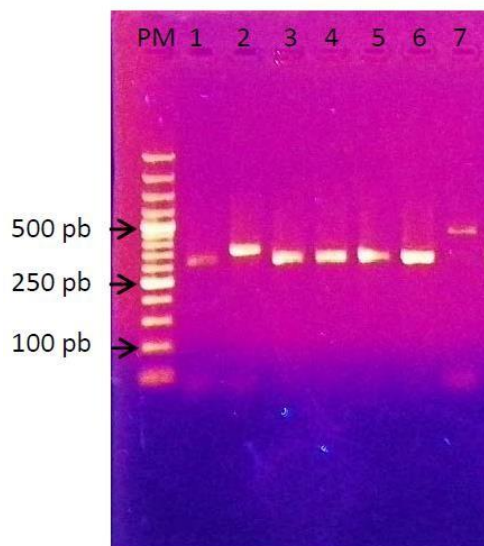


Figura 16. Gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de Etidio dónde se visualizan productos de amplificación de diferentes tamaños (carriles 1, 2, 3 y 7) entre 250 y 500 bases. En los carriles 3 a 6, el tamaño parece ser el mismo. Sin embargo, la resolución de este tipo de gel no hace posible esta afirmación.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los productos que fueron utilizados para el desarrollo de la metodología de este estudio son tres quesos frescos y tres quesillos de Oaxaca elaborados a partir de leche sin pasteurizar, tres quesos mozzarella y tres quesos manchegos comerciales. Estos productos fueron analizados y comparados utilizando dos métodos, el método tradicional de cada uno de ellos basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, y un método rápido basado en la identificación de los ácidos nucleicos de los microorganismos por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

2.2 Obtención y preparación de las muestras

Se adquirieron tres quesos frescos y tres quesillos del día en tres mercados tradicionales de la ciudad de Oaxaca, recabando la información acerca del origen y manejo del producto hasta su arribo al mercado. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio y procesadas dentro de las siguientes dos horas. Asimismo, se adquirieron tres quesos mozzarella y tres quesos manchegos de marcas diferentes, los cuales se procesaron dentro del intervalo de tiempo señalado anteriormente. Las muestras fueron homogeneizadas utilizando solución reguladora de fosfatos estéril en una proporción 1.10.

2.2.1 Métodos convencionales (NOM-210-SSA1-2014)

Se describen a continuación los procedimientos para la detección o cuantificación de los microorganismos presentes en los quesos utilizando los métodos tradicionales basados en su aislamiento y cultivo en sustratos específicos que contienen nutrimentos y condiciones especiales para su propagación. Los reactivos, materiales, equipos y condiciones de trabajo fueron los descritos en la norma oficial NOM-210-SSA1-2014.

2.2.1.1 Aislamiento de *Salmonella* spp

El pre-enriquecimiento inicial se realizó homogeneizando las muestras de 25 g de queso en 225 ml de agua peptonada amortiguada estéril, durante un minuto utilizando una licuadora comercial, seguida de incubación a 36°C durante 18h. Para realizar el enriquecimiento selectivo se colocó 1 ml del cultivo anterior en tubos de cultivo con 10 ml de caldo tetratiónato adicionado de 0.2 ml de lugol y 0.1 ml de solución acuosa de verde brillante. Los tubos se incubaron a 36°C durante 24h. El aislamiento de *Salmonella* se llevó a cabo sembrando por estriado cajas de Petri de agar sulfito bismuto, las cuales fueron incubadas

a 36°C durante 24h. Las cajas se incubaron 24h adicionales en el caso de ausencia de colonias. La presencia de colonias de color café, gris o negro indicó la probable presencia de *Salmonella*.

La confirmación bioquímica de la presencia de *Salmonella* spp. se realizó tomando una pequeña porción de una colonia típica con un asa recta estéril y sembrando por punción hasta el fondo y por estriado en la superficie de tubos de cultivo de 10 ml conteniendo agar triple azúcar hierro solidificado de manera inclinada. Los tubos se incubaron a 36°C durante 24h con las tapas sin ajustar para favorecer condiciones de aerobiosis. Las colonias típicas de *Salmonella* produjeron color rojo en la superficie del medio y amarillo en el fondo; se produjo además gas, lo cual originó que el medio se elevara del fondo del tubo; además, se observó un precipitado negro en los tubos positivos (la gran mayoría de especies, aproximadamente 90%, producen ácido sulfhídrico, originando una coloración negra en el agar). Existen además especies lactosa-positivas, las cuales tornan el medio completamente amarillo (SSA, 2014).

2.2.1.2 Cuantificación de *Escherichia coli*

Una masa de 25g de cada uno de los quesos del estudio fue homogeneizada en 225 ml de solución reguladora de fosfatos estéril durante un minuto utilizando una licuadora comercial. Similarmente, se prepararon diluciones decimales sucesivas (1:100 a 1:10,000) con la finalidad de poder cuantificar los niveles de contaminación de *E. coli* en los quesos. La prueba presuntiva de la presencia del microorganismo se realizó colocando 20 ml de la suspensión inicial y las diluciones apropiadas en tubos de cultivo con campanas de Durham conteniendo 10 ml de caldo lauril triptosa 3X estéril (triple cantidad de medio de cultivo por volumen de agua recomendado; p. ej. 106.8g/L, en vez del normal 35.6g/L). Los tubos se incubaron a 35°C durante 24-48h. La formación de gas indicó un resultado positivo de la prueba presuntiva (SSA, 2014).

La prueba confirmativa se realizó tomando una asada de cada tubo positivo de la prueba presuntiva y sembrando en un tubo de 10 ml conteniendo caldo EC estéril e incubando a 35°C durante 48h. Se procedió de la misma manera con un segundo tubo, el cual fue incubado a 45.5°C durante 24h. En caso de no haber formación de gas, este segundo tubo se incubó 24h adicionales. El resultado permitió cuantificar la contaminación de los quesos por coliformes totales y fecales, respectivamente. Adicionalmente, se sembraron por duplicado cajas de Petri con agar eosina azul de metileno con la finalidad

de confirmar la identidad de *E. coli* en los tubos positivos a coliformes fecales. Las cajas fueron incubadas a 35°C durante 24-48 h. La presencia de colonias negro azulado con brillo metálico verde característico permitió confirmar la presencia de *E. coli* en los quesos estudiados (SSA, 2014).

2.2.1.3 Cuantificación de *Staphylococcus aureus*

Una masa de 25g de cada uno de los quesos del estudio fue homogeneizada en 225 ml de solución reguladora de fosfatos estéril durante un minuto utilizando una licuadora comercial. Similarmente, se prepararon diluciones decimales sucesivas (1:100 a 1:1000) con la finalidad de poder cuantificar los niveles de contaminación de *S. aureus* en los quesos. Se sembraron 0.1 ml de la suspensión inicial y de las diluciones apropiadas por duplicado, en cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo agar Baird Parker estéril (preparado a partir de la base Baird Parker comercial adicionada de emulsión de yema de huevo y telurito de potasio). El inóculo se extendió en la superficie del medio utilizando triángulos de vidrio esterilizados a la flama, después de lo cual se incubaron las cajas a 36°C durante 48h. Se contaron las colonias positivas (diámetro de alrededor de 2 mm, circulares, convexas, negras, brillantes y con un halo claro) y se multiplicó por el factor de dilución correspondiente para reportar el resultado final (SSA, 2014).

Se realizó la confirmación de *S. aureus* en muestras positivas mediante las pruebas de la coagulasa utilizando 0.3 ml de plasma de conejo mezclado con biomasa de cinco colonias representativas en placas de porcelana de 12 pozos. La prueba fue positiva cuando la mezcla incubada a 37°C formó coágulos al cabo de 4h. Igualmente, se aplicó la prueba confirmativa de la catalasa mezclando biomasa de cinco colonias representativas con una gota de H₂O₂ en un portaobjetos. La formación inmediata de burbujas confirma la presencia de *S. aureus* (SSA, 2014).

2.3 Métodos moleculares

2.3.1 Preparación de cultivos bacterianos

La cepa de *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 700699 y *S. typhimurium* ATCC 13076 se adquirieron de American Type Culture Collection. Los cultivos se mantuvieron en placas de agar BHI. Se inocularon tubos conteniendo 3 ml de caldo BHI con una colonia de la cepa, el tubo se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante 16-20 h. Se contaron las poblaciones microbianas en los tubos mediante diluciones seriales PS, extendiendo 200-300 uL de la dilución 10⁻⁷ en placas BHIA incubadas a 37°C durante 18 h. El conteo de salmonella se realizó dispersando 200 uL de la dilución apropiada en placas de agar XLT4, incubando 24 h a 35°C y contando colonias con centros negros. El conteo de listeria se realizó dispersando 150 uL de diluciones apropiadas en placas de agar MOX incubando 24 h a 35°C y contando colonias blancas con bordes grises.

2.3.2 Procesamiento de las muestras de queso

En tubos de centrifuga de 15 ml se agregaron 10 ml de una suspensión de queso (25 g de queso y 25 ml de agua destilada). Se añadirán 800 µl de EDTA 0.5 M y se incubaron a 40°C durante 5 min. Las diluciones de bacterias (50 µl) preparadas anteriormente fueron agregadas a la suspensión calentada y se mezclaron por inversión. La muestra fue centrifugada durante 15 min a 4700 xg a temperatura ambiente en una centrifuga de rotor de columpio.

La capa de grasa se eliminó por aspiración, seguida por aspiración del resto del material, excepto 50 µl con una punta limpia. La pastilla se re suspendió en 450 µl de buffer de lisis (SDS 0.1%, NaCl 30 mM, MgCl₂ 2 mM) por pipeteo y fue transferido a un tubo de microcentrifuga que contenía ADNasa I (2 uL de 500 U/ml en Tris 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7.5), y se incubó durante 5 minutos. Se agregó DE (3 uL) mientras se agitaba el tubo y se centrifugó a 15,000 xg durante 2 min en rotor inclinado.

El sobrenadante se eliminó por aspiración y la pastilla se resuspendió en 100 uL de PS con EDTA 1 mM por pipeteo. Se agregaron 5 uL de una solución de tripsina (2 mg/ml en buffer de fosfatos) a las muestras y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con mezclado periódico. Se añadieron 400 µl de PS + T y el tubo se centrifugó durante 2 min a 15000 xg. El sobrenadante fue eliminado por aspiración.

2.3.3 Extracción de ADN de cepas cultivadas

Se utilizó el método de extracción de ADN de Birnboim y Doli (1979). El caldo de cultivo con una colonia independiente cultivada durante 12 h se dividió en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugó 3 min a 12000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 110 µl de solución salina P1 (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8), 3 µl de RNAsa (20 mg/ml) y se re suspendió la pastilla. A continuación, se adicionaron 110 µl de solución P2 (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión lentamente 4 veces y se agregaron 135 µl de solución P3 (60 ml de CH₃COOK 5 M, 11.5 ml de CH₃COOH glacial, 28.5 ml de agua) agitando por inversión. Para la separación de proteínas, la muestra se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 200 µl de cloroformo a 4°C, los tubos se mantuvieron en agitación hasta formar un precipitado blanco y se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante fue recuperado en un tubo de 1.5 ml y se depositó un volumen de isopropanol a -20°C agitando por inversión. Se centrifugó por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue desechado. Posteriormente, se agregaron 500 µl de etanol al 70% y se agitó para disolver la pastilla formada, se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm, se decantó y se dejó secar por 10 minutos. El ADN se almacenó a -20°C y fue diluido con agua libre de nucleasas. La pureza del ADN se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280 entre un rango de 1.8-2.0. La integridad se evaluó utilizando un gel de agarosa al 2% (Birnboim & Doly, 1979).

2.3.4 Síntesis de primers y sondas

La Tabla 1 muestra los primers y sondas correspondientes a las cuatro cepas reportadas por Chiang y otros (2012), los cuales fueron sintetizados para el análisis molecular de este estudio por la empresa T4 Oligo. Los primers fueron analizados en el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para establecer sus temperaturas de alineamiento y especificidad.

Tabla 1. Primers utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas.

Fragmento de DNA (N° GeneBank)	Primers	Secuencia de oligonucleótidos	Producto de PCR
Staphylococcus Aureus BA000018	SAU3/SAU4	F5'ACAAATAATAAAGGTGGC3' R5'TATCGCCAGTTTGTACTT3' Sonda5'ACAATTGTAGGGGAGACAGATTT TTTTTTTTTTTTTTTTT3'	406 pb
Escherichia coli O157:H7 AE005174	HAF1/HAR1	F5'AATAAACAGGTACGGCT3' R5'TATCACCTCATCAACCAAAATC3' Sonda5'TTTTTTTTTTTTTTTTAATTGAAT CCATTCTGTCTACTT3'	316 pb
Salmonella spp. AM933172	Sspp1S/Sspp1 A	F5'TTGCGTTGCGTCTGTCC3' R5'GCTTATCGTCTGCGGCTC3' Sonda5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGCG ATAGTACGGCCATTT3'	237 pb
htpG-like <i>L. monocytogenes</i>	Lm1/Lm2	F5'GAAGAAATTAATAGTTGGAC3' R5'GAAATAGTCTTGGAATGCG3' Sonda 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAATAGTCTT GGAAATGCG3'	120 pb

2.3.5 Estandarización de la PCR

Se realizaron ensayos de PCR para evaluar la calidad del ADN extraído de los cultivos bacterianos. Se diseñaron gradientes de temperatura de 50 a 70°C y concentración de primers de 0.1 a 1 uM. La temperatura teórica de la amplificación fue tomada de acuerdo a la temperatura de metilación de los primers sintetizados (63°C). Como control positivo de amplificación se utilizó una muestra de ADN genómico de *E. coli* DH5α. La Tabla 2 muestra las concentraciones finales de los reactivos para la amplificación de muestras de ADN de queso, las cuales fueron programadas en un termociclador (Labnet, modelo Multigene Gradient TC9600-G) utilizando los primers sintetizados y el ADN de cada microorganismo.

Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR para la detección de microorganismos en quesos.

COMPONENTE	20 µl/RXN	CONCENTRACIÓN FINAL
H ₂ O	7.4 µl	-----
2X Phusion Flash PCR Master Mix	10 µl	0.5 µM
Primer Fw	0.8 µl	0.5 µM
Primer Rw	0.8 µl	0.5 µM
ADN de plantilla	1 µl	1 pg-10 ng

Las condiciones de ciclado se muestran en la Tabla 3. El ciclado se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor de la enzima (Phusion Flash PCR, Thermo Fisher Scientific).

Tabla 3. Programa de ciclado de PCR estándar.

PASO DEL CICLO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)	CICLOS
Desnaturalización inicial	98	10	1
Desnaturalización	98	1	30
Alineamiento	63.5	15	30
Extensión	72	15	30
Extensión final	72	60	1

2.3.6 Análisis electroforético

Esta técnica fue empleada para analizar resultados de reacciones de alineamiento, integridad de ADN y productos de la PCR. Las concentraciones de los geles empleados fueron de 0.7 a 2%, de acuerdo al tamaño de producto esperado. Se utilizó buffer de corrida TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8), 3 µl de Buffer de carga 6X y Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración de 0.04 µg/ml. Como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Las muestras se corrieron a 90V por 1 hora y fueron analizadas visualmente mediante un transiluminador con una longitud de onda de 302 nm.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Por métodos convencionales.

A continuación, se muestran y detallan las tablas con los resultados obtenidos en experimentos que fueron realizados por triplicado para cada muestra. Para este caso en particular las pruebas fueron realizadas con dos alimentos, queso y quesillo.

Tabla 4. Resultados obtenidos en las muestras de queso

QUESO (Q) N=3							
SITIO	OCT	DE	E. coli	DE	S. aureus	DE	SALMO
1	180,000	9,200	400	24	24,000	980	NEG
2	240,000	11,000	8,300	225	19,000	650	NEG
3	270,000	9,500	3,100	88	28,000	500	POS
4	290,000	10,000	140,000	2,700	27,000	1,100	NEG

Coliformes totales; Escherichia coli; Staphylococcus aureus; Salmonella spp.

La tabla número 4 presenta la cuantificación de los patógenos de interés (*E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella*) de 4 sitios diferentes del estado de Oaxaca, pudiendo encontrar en las columnas mínimos y máximos de las mismas.

En la columna perteneciente a *OCT* se observa un mínimo de 1.8×10^5 UFC en el sitio 1 y un máximo de 2.9×10^5 UFC en el sitio 4, lo anterior pudiera atribuirse a que el proceso de producción en el primer sitio cuenta con una mayor sistematización, en la cual se tiene una buena manipulación de toda la materia prima y que además se realiza en un lugar cercano a la ciudad. En tanto que en el segundo sitio el proceso se lleva a cabo a las afueras de un pequeño pueblo de Etla, en el que las medidas sanitarias no son las mejores por lo que no existe un buen manejo del alimento. Mientras que para la columna de *Salmonella* encontramos que en el sitio 3 se presentó como positivo, la NOM-210-SSA1-2014 estipula que para ser considerado apto para el consumo humano, ésta se debe encontrar ausente, dicho lo anterior, se observa claramente que el 75% de las muestras analizadas cuentan con el parámetro adecuado para la norma. Lo que conlleva a decir que el resultado esperado por el queso del sitio 3 no es aceptable ya que esta bacteria es causa de una de las enfermedades de gastroenteritis más comunes dentro de la población, que a su vez puede resultar mortal si no se atiende en tiempo y forma.

Tabla 5. Resultados obtenidos en las muestras de quesillo

QUESILLO (q) N=3							
SITIO	OCT	DE	E. coli	DE	S. aureus	DE	SALMO
1	550	18	0	0	7,200	350	NEG
2	1,800	77	750	33	6,400	290	NEG
3	1,400	59	120,000	3,200	350	15	NEG
4	18,000	770	11,000	228	6,600	330	NEG

Coliformes totales; Escherichia coli; Staphylococcus aureus; Salmonella spp.

De manera semejante en la tabla 5 se presentan los niveles alcanzados por cada uno de los patógenos en las diferentes muestras analizadas, las cuales fueron recolectadas de cuatro sitios diferentes. Así mismo se detallan los valores máximos y mínimos para cada columna en los patógenos estudiados.

Analizando la columna de *E. coli*, se puede visualizar que el sitio 3 presentó el valor máximo de cuantificación de unidades formadoras de colonias, en tanto que el sitio 1 no tuvo registro alguno de la misma. Probablemente dicho resultado se debe a que el primer sitio se tiene de manera integrado un tratamiento térmico en el proceso de elaboración, lo que dio origen a la ausencia de este patógeno. Mientras que en el sitio 3, posiblemente se utilizan los insumos sin hacer antes una revisión previa de los mismos. Pasando a la columna de *S. aureus* se puede observar que los datos obtenidos son aceptables dado que la NOM-210-SSA1-2014 establece un límite de 10^4 - 10^5 UFC/ml, estando así dentro del límite permisible establecido por la norma.

Finalmente, las muestras fueron negativas ante la presencia de *Salmonella* que es el indicador calificado con mayor gravedad dentro de estos patógenos estudiados, nos da la pauta para calificar a estos alimentos como buenos dado que no violan los límites establecidos por la norma.

En las imágenes presentadas a continuación se visualizan con la ayuda de un contador de colonias Quebec la presencia de *S. aureus* en una de las muestras de queso y quesillo.



Figura 17. Presencia de *S. aureus* en la muestra 4 de quesillo.



Figura 18. Presencia de *S. aureus* en la muestra 4 de queso.



Figura 19. Presencia de coliformes en la muestra 3 de quesillo

En la figura 19 se observa la inmensa cantidad de coliformes totales presentes en la caja Petri, lo cual da la pauta para catalogar inapropiado al alimento dado que esta bacteria se encuentra en las heces de humanos o animales de sangre caliente y guardan una estrecha relación con bacterias que son patógenas para el humano que son capaces de generar enfermedades diarreicas que pueden desencadenar en la muerte.

3.2 Por método molecular

Como primer paso se extrajeron las muestras de ADN del congelador para descongelar, y posteriormente homogeneizar las muestras de ADN y centrifugarlas brevemente, así mismo se centrifugaron los reactivos de la PCR.

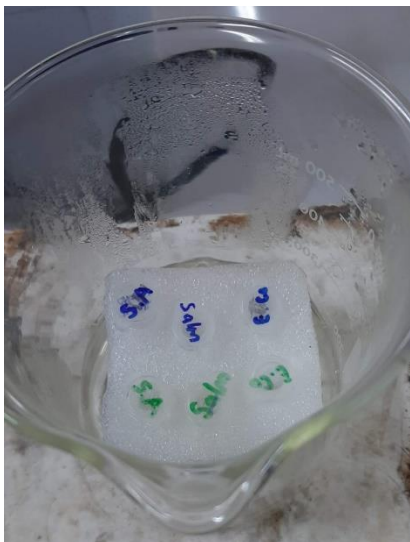


Figura 20. Calentamiento de las muestras de ADN en un calentador eléctrico.



Figura 21-22. Centrifugadora para la separación de la fase sólida y líquida

Seguido de ello se añadieron en microtubos la muestra y los primers necesarios para poder así copiar la secuencia de ADN, se depositaron en un termociclador el cual se encargo de repetir los ciclos de temperatura durante un determinado periodo de tiempo. Así, al finalizar la reacción en cadena de la polimerasa obtuvimos en los tubos múltiples copias de una secuencia de DNA.

Procedimos a preparar todo lo necesario para realizar una electroforesis en gel de agarosa para comprobar el resultado de la PCR. Enseguida preparamos el soporte donde se llevó a cabo la electroforesis, para ello rellenamos la cámara con tampón tris-acético. Este tampón nos proporcionó las condiciones óptimas de pH para el proceso. Además, contiene EDTA que evito que el ADN fuese degradado por nucleasas.

Depositamos las muestras en los pocillos hechos por el peine, el DNA es una molécula con carga negativa, por ello al aplicar corriente eléctrica en DNA migró desde el polo negativo de la cámara hacia el polo positivo. El colorante añadido a la muestra nos permitió visualizar de frente el avance de nuestras muestras.



Figura 23. Cámara electroforética y geles de agarosa con corrimiento de DNA a 90 V

Por último, para visualizar el resultado de la electroforesis llevamos el gel hasta una lámpara de luz ultravioleta, al preparar el gel hemos añadido bromuro de etidio, una sustancia fluorescente que se intercala entre las bases del ADN, de esta manera al ver el gel con luz UV pudimos observar la altura a la que han corrido las bandas ADN.

Mediante los métodos moleculares se apreció la presencia de la bacteria *Escherichia coli*, esto fue posible gracias al análisis electroforético, haciendo uso de una lámpara de rayos UV para visualizar los carriles en los cuales la migración de los fragmentos de ADN fue exitosa.

Así también, se reafirma que con la empleando técnicas moleculares se obtienen resultados que refuerzan de alguna manera lo ya hecho con los métodos tradicionales.

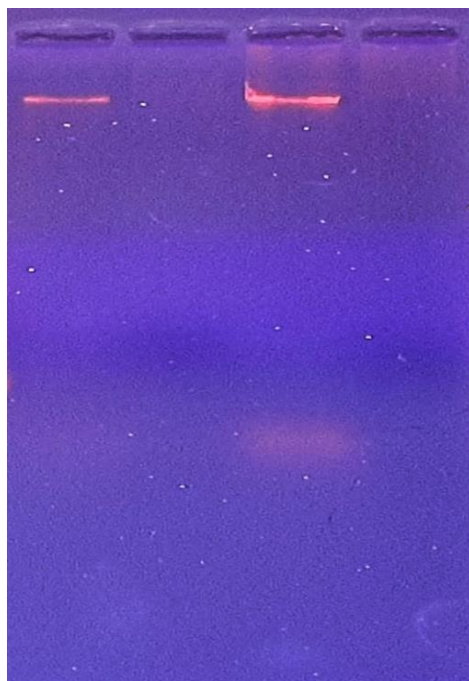


Figura 24. Detección de *Escherichia coli* en electroforésis.

La figura 24 muestra un gel de agarosa expuesta a rayos UV para ver con mayor claridad el desplazamiento de uno de los carriles para así dar muestra de que el microorganismo mencionado está presente dentro de la muestra analizada.

A continuación, se muestran los expemientos hechos y la presencia de los patógenos en algunos de los pocillos.

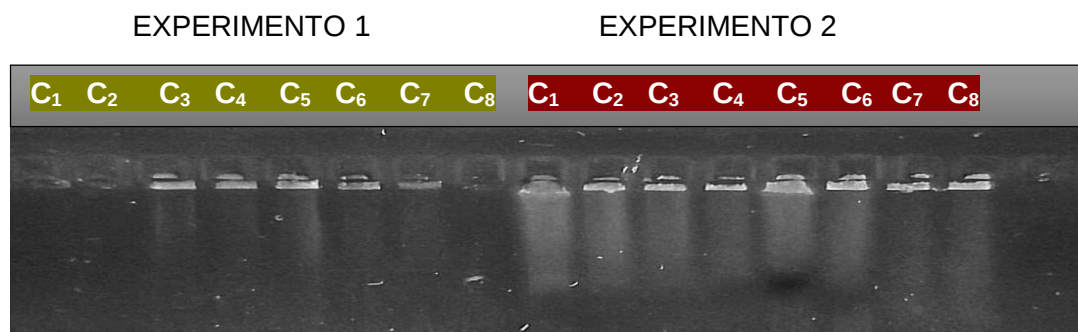


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa, C₁, C₃, C₅, C₇, ADN de muestras de quesillo, C₂, C₄, C₆, C₈, ADN demuestras de queso.

La imagen muestra el desplazamiento del DNA de las muestras de queso y quesillo. En el corrimiento número 1, los carriles y muestras se identifican de la siguiente manera: quesillo (C₂-*S. Aureus*, C₄-*Salmonella spp*, C₆-*E. Coli*, C₈-*E. Coli*), queso (C₁-*E. Coli*, C₃-*E. Coli*, C₅-*Salmonella*, C₇-*S. Aureus*). La identificación de carriles es igual en el corrimiento 2.

En la prueba número 1 se logró ver con mayor claridad el desplazamiento de los carriles 3,4,5,6, y 7, los cuales corresponden a los siguientes microorganismos: *E. Coli*, *Salmonella* y *S. Aureus*, estos presentes en las muestras de queso y de quesillo. Mientras que en la prueba número 2 hubo una mayor cantidad de microorganismos presentes ya que hay más carriles visibles con el desplazamiento buscado, esto a la vez nos da la pauta para decir que las bandas se encuentran bien definidas e integras.

La figura 25 muestra el depósito de las muestras en los pocillos, las que lograron tener un desplazamiento visible son aquellas que sí tuvieron la presencia de los microorganismos de interés. Así con la ayuda de un fotodocumentador se pudo ver con mayor claridad la presencia y/o ausencia en los pocillos.

CONCLUSIONES

Se evaluó mediante métodos cuantitativos el riesgo sanitario existente en productos derivados de la leche, queso y quesillo. Fueron detectables las tres bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*) que eran de interés para dicho estudio, lo cual dio la pauta para concentrar dichos resultados tal como se pudo apreciar en las tablas, cada uno de estos microorganismos cuenta con un límite específico de aceptabilidad; los cuales se sustentan en la NOM-210-SSA1-2014. Los límites permisibles varían según la especie a analizar.

Así mismo se detectaron los niveles máximos y mínimos de contaminación por *E. coli* en cada una de las muestras a analizar y a la par con ayuda del método molecular empleado se reforzó dicho estudio para reafirmar la presencia de este microorganismo en las muestras estudiadas. Con ayuda de los límites establecido por la norma se pudo ver y analizar con claridad si el alimento era apto o no para el consumo humano.

De manera similar se realizó el estudio para la detección de niveles de *S. aureus* y *Salmonella spp.*, se pudo detectar que ambos alimentos tuvieron aceptabilidad en el margen del rango indicado para *S. aureus*, sin embargo la presencia de este patógeno nos indica la mala práctica higiénica que se tuvo al momento de manipular la materia prima durante el proceso, no obstante, hubo muestras extremadamente contaminados por coliformes, lo cual no es un buen parámetro dado que causa enfermedades entéricas, las cuales pueden llegar a desencadenar en una patología más severa si ésta no se trata a tiempo.

Por último, se detectó la presencia de *Salmonella* como positiva en una sola muestra, mientras que las otras resultaron negativas, lo cual descartar por completo a la muestra como un alimento apto para consumo humano; ya que siendo esta bacteria es una de las más peligrosas debido a los efectos nocivos que puede llegar a provocar, no se puede comercializar un comestible en ese estado.

Como se mencionó anteriormente, los niveles de contaminación en los diferentes quesos analizados variaron, puesto que el muestreo fue realizado en diferentes lugares de la ciudad; con el propósito de examinar alimentos derivados de la leche, debido a que el consumo de estos alimentos se ha elevado en los últimos años dentro de la población nació la necesidad de analizar y evaluar el riesgo existente en ellos para prevenir enfermedades. En el caso de los comestibles estudiados se llega a la conclusión de que faltan pasos previos en el proceso de elaboración, los cuales son factores que alteran la calidad del producto y por ende su análisis microbiológico.

A la par se comparó la similitud existente entre un método tradicional y uno aplicando técnicas de biología molecular, el segundo fue más rápido y no hubo la necesidad de realizar siembras y conteos en placas, tan sólo se extrajo ADN de las muestras y se adicionó el primer con las secuencias características de los microorganismos de interés.

Con esta metodología se optimizó el proceso en cuanto a tiempo, esto a la vez dio la pauta para implementar nuevos criterios en la forma de identificación, para este caso en particular se tomó como criterio que el corrimiento de las bandas de los geles fuese visible y presentara el desplazamiento buscado para así asegurar la presencia o ausencia de los microorganismos estudiados.

REFERENCIAS

- Academy, K. (13 de Marzo de 2016). *Métodos de análisis del ADN*. Recuperado el 18 de Mayo de 2020, de Métodos de análisis del ADN: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/v/gel-electrophoresis-dna>
- Agudelo Gómez, D. A. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Lasallista de Investigación*, 38-42.
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones*. Madrid, España: ACRIBIA.
- Badui Degal, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Brandan, N. (2011). *Conceptos de genética*. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste.
- Carmen Alicia Padilla Peña, J. D. (2010). *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. España: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales.
- Chiang, Y.-C. T.-Y.-Y.-H.-K.-Y.-Y. (2011). Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas*. *Journal of microbiological methods*, 110.
- CITIL, ". A. (2015). *NUTRICIÓN Y EDUCACIÓN ALIMENTARIA*. Argentina: Código Alimentario Argentino.
- Dahm, R. (15 de Febrero de 2005). *Friedrich Miescher y el descubrimiento del ADN*. Recuperado el 28 de Mayo de 2020, de Friedrich Miescher y el descubrimiento del ADN: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15680349/>
- DOUE. (28 de 04 de 2020). *Reglamento CE 2073/2005, DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones*. Obtenido de Reglamento CE 2073/2005, DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20180101&from=EN>
- elika. (2013). *Salmonella spp.* País Vasco: Fundación Vaska para la Seguridad Agroalimentaria.
- elika. (2013). *Escherichia Coli*. País Vasco: Fundación Vaska para la Seguridad Agroalimentaria.
- elika. (2013). *Staphylococcus aureus*. País Vasco: Fundación Vaska para la Seguridad Agroalimentaria.

- Fierro, F. F. (2014). *Electroforesis de ADN*. México: UAM.
- Fred Fung, H.-S. W. (2018). Food safety in the 21st century. *Biomedical Journal* , 88-95.
- Greif, G. (2013). *PCR: Reacción en cadena de la polimerasa*. Montevideo: Unidad de Biología Molecular. Institut Pasteur Montevideo.
- Guzmán, I. K. (2010). *Propiedades físico-químicas, texturales y sensoriales del queso elaborado en el municipio de Vega de Alatorre, Ver., y su relación con algunas características del queso de La Joya, Ver.* Universidad Veracruzana. Veracruz: Instituto de ciencias básicas.
- H. Birnboim, J. D. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA* (Vol. 7). Paris, France: Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut de Recherche en Biologie Moléculaire.
- Illana, J. (2014). *Biología molecular y estructura del ADN* . España: Real Sociedad Española de Química.
- Institute, N. H. (14 de Noviembre de 2019). *Ácido desoxirribonucleico*. Recuperado el 27 de Mayo de 2020, de *Ácido desoxirribonucleico*: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-acido-Desoxirribonucleico>
- Jímenez García, L. F., & Merchant Larios , H. (2003). *Biología celular y molecular* (Primera Edición ed.). México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Nuri Merchán, S. Z. (3 de Junio de 2019). *Determination of the microbiological safety of artisanal cheeses according to Colombian technical standards*. (R. C. Nutrición, Editor, & U. d. Facultad de ciencias de la Salud, Productor) Recuperado el 23 de abril de 2020, de *Determination of the microbiological safety of artisanal cheeses according to Colombian technical standards*: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182019000300288
- ReNaLOA. (2011). *ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL* . Buenos Aires, Argentina.: Ministerio de la salud .
- RENAPRA. (2015). *Enfermedades transmitidas por los alimentos* . Argentina : anmat.
- Ruvkun, G. (26 de Octubre de 2001). *Glimpses of a tiny RNA world*. Recuperado el 20 de Mayo de 2020, de *Glimpses of a tiny RNA world*: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11679654/>
- Salud, S. d. (2014). *NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos*. México.
- Serrato, D. (2008). *PCR: reacción en cadena*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- SIAP. (2018). *Panorama de la leche en México*. México: SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA. Obtenido de SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA .

- Soma, M. (2017). *Electroforesis en gel de agarosa*. Italia: European Commission.
- SSA. (1994). *Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Especificaciones sanitarias*. México: Diario Oficial de la Federación.
- SSA. (1994). *Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos*. México: Diario Oficial de la Federación.
- SSA. (1994). *Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias*. México: Diario Oficial de la Federación .
- SSA. (2014). *NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Diario Oficial de la Federación, págs. 1-95*.
- UNAD. (2016). *DEFINICIÓN, COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA LECHE*. México: Escuela de Ciencias, Tecnología e Ingeniería.
- Verdalet, I. (1998). *Las aptitudes queseras de la leche*. Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana . Veracruz: Universidad Veracruzana.