

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y LEVADURAS BENÉFICOS EN EL
QUESO MADURADO CHIHUAHUA**

POR:

MARIA FERNANDA CARRASCO MATAMOROS

ANTEPROYECTO DE TESIS



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, CA

JUNIO, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, HONGOS Y LEVADURAS BENÉFICOS EN EL
QUESO MADURADO CHIHUAHUA**

POR:

MARIA FERNANDA CARRASCO MATAMOROS

DEBORA KAROLINA MEJIA MENDEZ, MSc.

Asesor principal

ANTEPROYECTO DE TESIS

**PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DE INVESTIGACIÓN**

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, CA

JUNIO, 2024

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo General.....	2
2.2. Objetivos específicos	2
III. HIPOTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Industria láctea en Honduras: Situación actual de los quesos.....	4
4.1.1. El queso.	4
4.1.2. Clasificación de los quesos:.....	5
4.2. Quesos madurados	6
4.2.1. Queso chihuahua.....	6
4.2.2. Características fisicoquímicas.....	7
4.2.3. Proceso de manufactura	7
4.2.4. Condiciones de los procesos de maduración	8
4.2.4.1. Temperatura.....	8
4.2.4.2. Humedad.....	8
4.2.4.3. Tiempo.....	9
4.3. Microorganismos nativos como cultivos iniciadores.	9
4.4. Principales agentes microbiológicos presentes en el queso.	9
4.4.1. Microbiota primaria.	10
4.4.1.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).	10
4.4.1.2. Cultivos iniciadores.	11
4.4.2. Microbiota secundaria	11
4.4.2.1. Hongos.....	11
4.4.2.2. Levaduras.	12
4.5. Método de identificación de microorganismos: MALDI-TOF.	12
V. MATERIALES Y METODO	14
5.1. Ubicación	14
5.2. Materiales y equipo.....	15

5.3. Metodología	15
5.3.1. Diseño experimental	15
5.3.2. Etapa 1: Elaboración del queso madurado chihuahua.....	17
5.3.3. Etapa 2: Análisis Fisicoquímicos.....	17
5.3.3.1. Acidez titulable.....	17
5.3.3.2. pH	17
5.3.3.3. Grasa.....	18
5.3.3.4. Humedad.....	18
5.3.3.5. Proteína.....	18
5.3.4. Etapa 3: Análisis microbiológicos.	19
5.4. Variables por evaluar	19
5.4.1. Variables dependientes	19
5.4.2. Variables independientes	19
5.5. Análisis estadístico.	20
VI. PRESUPUESTO	21
VII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	22
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los quesos (Tot Formatge, 2024)	5
Figura 2. Imagen de un típico queso Chihuahua artesanal (Ortiz Estrada, 2020).....	6
Figura 3. Planta Procesadora de lácteos, UNAG, Olancho.....	14
Figura 4. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.	14
Figura 6. Etapas de la investigación.....	16

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos.....	16
Tabla 2. Niveles y variables de respuesta de los tratamientos.	16
Tabla 3. Formulación optimizada queso madurado chihuahua (Lopez Burgos, 2024).....	17
Tabla 4. Métodos para la determinación de los análisis fisicoquímicos.	19
Tabla 5. Método para la identificación de microorganismos.	19
Tabla 6. Presupuesto desarrollo de investigación.	21
Tabla 7. Presupuesto gastos de viaje.	21

I. INTRODUCCIÓN

El queso madurado Chihuahua es uno de los quesos mexicanos más populares en ese país. Actualmente presenta altos volúmenes de producción, posicionándolo como uno de los más consumidos en México (Cervantes Escoto, Villegas, Cesin Vargas, & Espinoza Ortega, 2008). Algunas investigaciones realizadas al queso chihuahua han logrado identificar una microbiota muy diversa de bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales han sido asociadas con sus características típicas de sabor, aroma y textura (Briker, *et al*, 2005). Sin embargo, aún se desconoce qué tipo de poblaciones microbianas están presentes en cada etapa de su elaboración y qué cambios ocurren en una variación de tiempo y temperatura en estas poblaciones a lo largo de la manufactura y almacenamiento.

Durante las últimas dos décadas se ha logrado estudiar y comprender mejor la ecología microbiana de diversos ecosistemas alimentarios mediante el uso de técnicas de biología molecular, las cuales han constituido una herramienta poderosa en el estudio de la diversidad y dinámica de poblaciones microbianas en diversas matrices alimentarias (Giraffa & Carminati, 2008). Lo anterior ha permitido el avance del conocimiento sobre las diferentes poblaciones de microorganismos durante la producción de alimentos madurados, sobre todo durante la manufactura y maduración de algunos quesos.

Es así, que en este trabajo se llevara a cabo la caracterización de la diversidad y dinámica de las poblaciones microbianas durante la manufactura y almacenamiento del queso madurado Chihuahua, ya que en nuestro país carece de información de este tipo de derivados lácticos y a su vez el difuso conocimiento acerca de los microorganismos benéficos que puedan existir en la cascara y en el interior del queso madurado.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar la microbiota de bacterias, hongos y levaduras que participan en la elaboración de queso chihuahua.

2.2. Objetivos específicos

- Elaborar el queso chihuahua mediante una formula optimizada a escala de laboratorio.
- Realizar análisis fisicoquímicos y microbiológicos al queso chihuahua.
- Evaluar la presencia de microorganismos benéficos en la cascara y en el interior del queso, mediante MALDI-TOF MS.

III. HIPOTESIS

Hipótesis Nula (H₀): La microbiota del queso madurado chihuahua se ve beneficiada por una comunidad diversa de bacterias, hongos y levaduras en relación con su tiempo y temperatura de maduración.

Hipótesis alternativa (H_a): La microbiota del queso madurado chihuahua no se ve beneficiada por una comunidad diversa de bacterias, hongos y levaduras en relación con su tiempo y temperatura de maduración.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Industria láctea en Honduras: Situación actual de los quesos.

En la actualidad la producción de productos lácteos en Centroamérica representa una de las actividades productivas con mayor importancia y dinamismo de toda la región que favorecen la producción de leche industrial. En la región centroamericana el consumo per cápita de leche es mucho menor respecto a los otros países de Latinoamérica. Costa Rica, Honduras y El Salvador registran los consumos más altos, mientras que, Guatemala y Nicaragua presentan niveles de consumo más bajos, pese a que Nicaragua es uno de los mayores productores de la región (Molina, 2010).

(Matute Menocal, 2011) en su estudio menciona que la leche recolectada por las plantas procesadoras de lácteos y derivados constituye la principal materia prima de las mismas y esta es producida en el departamento de Olancho bajo un ambiente de ganadería tradicional, orientada a la producción de ganado de leche y engorde, estos se ven directamente afectados en época de verano, debido a la escasez de pastos, provocando una disminución en la oferta de leche y consecuentemente esto genera una menor producción de productos derivados de la leche y sus derivados

4.1.1. El queso.

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, cuyas características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales difieren entre cada tipo. Se estiman más de 2000 variedades de queso entre madurados, semi-madurados y frescos. No obstante, en nuestro país predomina el consumo de quesos frescos, mismos que forman parte de una enorme

variedad de platillos que constituyen nuestro legado gastronómico (Ramírez-López & Vélez-Ruiz., 2012).

Es el resultado de la precipitación y/o coagulación de las caseínas de la leche. Este se ha elaborado desde tiempos prehistóricos a partir de la leche de distintas especies de hembras mamíferas, como camellas, alces, vacas, cabras, ovejas, etc (Carranco & Rodriguez, 2015).

(Ramírez-López & Vélez-Ruiz., 2012) indica que fisicoquímicamente, el queso es un gel o malla tridimensional de fosfocaseinatos y fosfocaseinatos de calcio, donde a través de la coagulación se forma un entramado que engloba agua, glóbulos de grasa, lactosa, y otras proteínas, además de minerales y vitaminas.

4.1.2. Clasificación de los quesos:

Existen varias formas para clasificar los quesos, que se basan en distintas características del producto terminado o por alguna modalidad durante su fabricación:

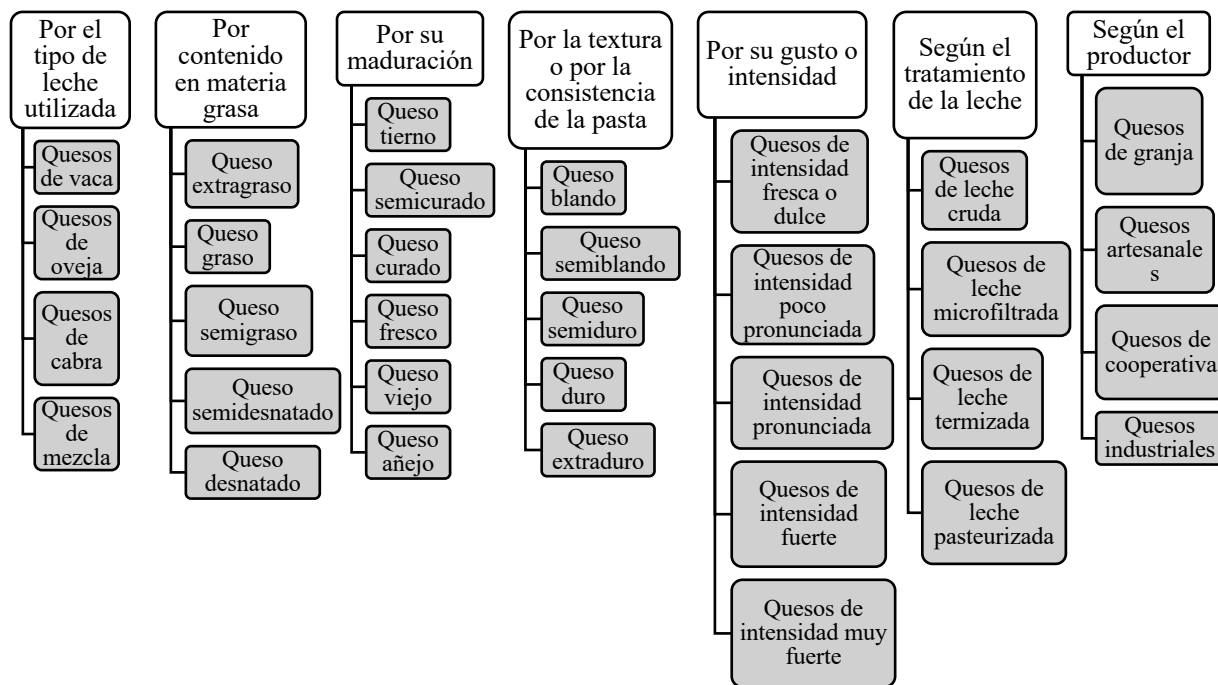


Figura 1. Clasificación de los quesos (Tot Formatge, 2024)

4.2. Quesos madurados

(González Martínez , 2020) define que los quesos madurados son aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso, son sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel. Los quesos madurados se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza, así como pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

4.2.1. Queso chihuahua

El Queso Chihuahua, producido en el nortero estado de Chihuahua (México), es un queso semiduro similar al Chester, una versión del Cheddar con mayor humedad y menos tiempo de maduración. Aunque el queso se elabora tradicionalmente con leche cruda, la pasteurización de la leche es esencial para minimizar el riesgo de microflora indeseable en este tipo de queso, que suele venderse y consumirse entre 3 y 6 semanas después de su fabricación (Van Hekken, Tunick, Tomasula, & Molina-Corral, 2020).



Figura 2. Imagen de un típico queso Chihuahua artesanal (Ortiz Estrada, 2020)

4.2.2. Características fisicoquímicas

Se caracteriza por ser un queso semiduro, olor medio-alto de leche fresca, leche cocida y mantequilla fundida, humedad y carácter graso, mínimamente madurado (3-6 semanas), con notas de sabor amargo, agrio y salado, y con capacidad para fundirse por lo que, se emplea leche pasteurizada el queso carece de hoyos, mientras que cuando se usa leche cruda poseerá pequeños agujeros (Ortiz Estrada, 2020).

(Van Hekken, Tunick, Tomasula, & Molina-Corral, 2020) mencionan que la presentación final, aunque con diferentes dimensiones, tiene la forma de un cilindro aplanado o, típicamente, de barras rectangulares. Cuando está bien madurado, es una pasta de color amarillo dorado, que se rebana fácilmente, de gusto un tanto cremoso, con un sabor y aroma lácteo delicado.

Desde el punto de vista tecnológico, algunos autores definen al queso Chihuahua como una mezcla entre el queso cheddar y el queso brick, con textura semidura y fácil de desmenuzar. Sin embargo, estudios dedicados a describir la textura y dureza de este queso, lo clasifican como un queso con características similares a la del queso colby fresco así lo define (Van Hekken, Tunick, Tomasula, & Molina-Corral, 2020). De manera general, se pueden distinguir dos tipos de queso Chihuahua: el queso Chihuahua elaborado con leche cruda y el queso Chihuahua elaborado con leche pasteurizada, que junto con el procesamiento y peculiaridades de la calidad de la leche otorgan características sensoriales particulares al producto.

4.2.3. Proceso de manufactura

(Ortiz Estrada, 2020) en la etapa de pre maduración de la leche durante el proceso de elaboración del queso chihuahua, las bacterias ácido lácticas (BAL), son responsables del sabor y aroma, influyendo de igual forma en la textura y fundido de este queso, por ello se

han realizado investigaciones acerca de los microorganismos predominantes de este queso, incluso se ha explorado el potencial antimicrobiano, producción de aroma y capacidad proteolítica del mismo para generar péptidos bioactivos por BAL aisladas de queso chihuahua.

La etapa más crítica en la manufactura del QC es la chedarización, proceso donde se lleva a cabo la acidificación de la pasta, la cual debe encontrarse específicamente entre 32-38 grados Dornic (°D), hecho que es crucial en el desarrollo de las características deseables de este queso asegura en su investigación doctoral (Ortiz Estrada, 2020).

4.2.4. Condiciones de los procesos de maduración

(Gastalver Robles, 2020) menciona que las condiciones ambientales se crean para favorecer la proliferación de ciertos microorganismos que ayudan a la maduración de los quesos o para conseguir las características organolépticas peculiares de los mismos, y al mismo tiempo para inhibir la proliferación de microorganismos indeseables.

4.2.4.1. Temperatura

La temperatura influye sobre la velocidad del crecimiento de la flora y sobre la actividad de las enzimas, así como sobre las enzimas del cuajo (Gastalver Robles, 2020). En la etapa posterior a la maduración, se debe mantener de forma general una temperatura de entre 5 - 16 °C dependiendo de la tipología de queso y de los microorganismos de afinado que intervengan. Por último, una vez se alcance el estado óptimo de maduración, los quesos se deben mantener en almacenamiento a 4 °C, esto para evitar el desarrollo excesivo microbiano asegura (Lopez Rios, 2020).

4.2.4.2. Humedad

La humedad variara según el tipo de queso y el tiempo de maduración. En quesos de pastas blanda la humedad relativa de las cámaras o espacios naturales deben tener una humedad relativa alta debe oscilar entre 90%, para evitar una perdida extrema de agua, se debe considerar las condiciones ambientales indicadas (Gastalver Robles, 2020).

4.2.4.3. Tiempo

(Sanchez Gamboa, 2017) en su investigación indica que el tiempo de maduración depende del tipo de queso y las características que se desean obtener, pudiendo variar este periodo desde días, meses e incluso años, dependiendo de las condiciones en que se almacena.

4.3. Microorganismos nativos como cultivos iniciadores.

Los cultivos iniciadores, también conocidos como “de arranque o starters”, se definen como preparaciones de gran número de células, ya sea de un solo tipo o mezcla de dos o más microorganismos que son aplicados a los alimentos con el fin de aprovechar los compuestos o productos derivados de su metabolismo o actividad enzimática (Leroy, F., y L. De-Vuyst., 2004). Estos son un constante objeto de estudio y se han empleado con el fin de reducir los tiempos de fermentación, homogenizar procesos, potenciar sabores, aromas, contribuir a la salud y bienestar y lograr características sensoriales deseables en los productos finales (Karimi, Mortazavian, & Amiri-Rigi, 2019).

(Alegria, 2019) indica que se ha reportado que el uso de microorganismos aislados de los mismos procesos artesanales de elaboración del queso (cepas nativas) resultan convenientes, debido a que presentan actividad metabólica adaptada, lo que influye en que las propiedades organolépticas típicas de los quesos puedan ser reintegradas y la preferencia de los consumidores no se vea alterada.

4.4. Principales agentes microbiológicos presentes en el queso.

(González Martínez , 2020) en su tesis doctoral señala que los microorganismos son componentes esenciales de varios tipos de queso y juegan un papel importante en la producción, maduración y almacenamiento del queso. Se pueden distinguir dos grupos principales: la microbiota inicial y secundaria. Dependiendo del tipo de queso, estos microorganismos se pueden utilizar individualmente o en diversas combinaciones. A medida que el queso madura, la flora utilizada como flora inicial es responsable de la formación de ácido, y la flora secundaria desencadena una serie de reacciones bioquímicas responsables de desarrollar el sabor y la textura requeridos.

(Ortiz Estrada, 2020) asegura en su estudio que, sin embargo, a pesar de una infinidad de investigaciones, a la fecha, se desconoce la totalidad de la microbiota del queso chihuahua, debido a que sólo se ha logrado identificar aquellos microorganismos que pueden crecer en medios de cultivo sintéticos, lo cual ha limitado el conocimiento del papel que tienen estos microorganismos en las características típicas de este queso.

4.4.1. Microbiota primaria.

4.4.1.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).

El género *Lactobacillus* es el grupo más grande y heterogéneo dentro de las bacterias lácticas, comparten varias características como son bajo contenido de G + C (<55% en moles), alta tolerancia al ácido, no forman esporas, son aerotolerantes, pero no aeróbicas, con requerimientos nutricionales muy exigentes, catalasa negativa y productores de ácido láctico como principal producto de la fermentación (Van Hekken, Tunick, Tomasula, & Molina-Corral, 2020).

Los diversos géneros de bacterias ácido-lácticas se han definido sobre la base de su morfología celular, ADN y tipo de fermentación. Según el metabolismo de los carbohidratos las bacterias lácticas se dividen en dos grupos principales de especies según la naturaleza y

la concentración de los productos finales resultantes de la fermentación de la glucosa: homofermentativas y heterofermentativas (facultativos y obligados) (Ortiz Estrada, 2020).

4.4.1.2. Cultivos iniciadores.

En este sentido, *Lactococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus. delbrueckii* y *Lactobacillus helveticus* son considerados como SLAB, las cuales pueden ser añadidas deliberadamente como CIs durante la manufactura o bien pueden ser contaminantes naturales de la leche, como en el caso de muchos quesos artesanales elaborados con LC todo esto debido a la gran diversidad de microorganismos que pueden ser usados como CIs, la caracterización de su funcionalidad en la producción de alimentos fermentados es motivo de una exhaustiva investigación (González Martínez , 2020).

4.4.2. Microbiota secundaria

(González Martínez , 2020) menciona en su estudio de la vida anaquel en el queso madurado chihuahua que la microbiota secundaria son microorganismos que no forman parte de las SLAB, por lo tanto, no están involucrados en la producción de ácido. Sin embargo, su presencia y desarrollo en el queso se debe a que estos microorganismos están presentes en la materia prima, utensilios, ambiente de procesamiento y/o almacenamiento. Por otro lado, el microbiota secundaria puede estar presente en el queso como cultivos secundarios o adjuntos incorporados en forma intencional.

4.4.2.1. Hongos.

(Viljoen, 2015) Los hongos, en general crecen en un amplio rango de temperaturas, que puede ir desde -4°C hasta alcanzar temperaturas máximas de 60-65°C. Algunos hongos son imprescindibles en la elaboración de distintas variedades de quesos, debido a que son esenciales para alcanzar las características deseables de algunos quesos madurados hongos como *Penicillium camemberti* y *Penicillium roqueforti*.

(Ruiz Navarro, 2023) menciona que los hongos son importantes en la maduración de ciertas variedades de queso, dando lugar a dos grupos. Los que se someten a maduración debido a la presencia de *Penicillium roqueforti* que crece en el interior del queso y *Penicillium camemberti* que crece en la superficie del queso.

(Ruiz Navarro, 2023) en su tesis final de grado señala que el desarrollo de hongos es necesario en quesos donde su presencia es características, como en el queso chihuahua *Penicillium commune* (especie derivada de *P. camemberti*) tiene un papel activo y modifica por sí mismo la humedad del queso, favoreciendo el desarrollo de una corteza semidura, es responsable de la descomposición de las proteínas y grasas del queso, lo que le da su textura cremosa y sabor característicos. En estos casos, la presencia de hongos es fundamental para que el queso adquiriera determinadas características sensoriales deseadas, como apariencia, sabor, olor y textura.

4.4.2.2. Levaduras.

Las levaduras pueden estar presentes en otros tipos de quesos diferentes a los de superficie maduradas. De hecho, en muchos casos la presencia de estos microorganismos es indeseable, debido a que producen sabores y olores desagradables (Viljoen, 2015). Sin embargo, en otros casos su presencia es deseable, debido a que imparten características de olor y sabor en algunos quesos (N., 2015). Incluso, algunas especies de los géneros *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* y *Saccharomyces* son usadas como cultivos adjuntos para acelerar el proceso de maduración (Karimi, Mortazavian, & Amiri-Rigi, 2019).

4.5. Método de identificación de microorganismos: MALDI-TOF.

El método de identificación mediante MALDI-TOF se basa en análisis del espectro proteico generado por un microorganismo y la comparación de su espectro con los perfiles proteicos existentes en la base de datos. Sus siglas son denominadas por la ionización por desorción

laser asistida por matriz (MALDI), seguida de la detección en un analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Cercenado Mansilla & Cantón Moreno, 2019),

V. MATERIALES Y METODO

5.1. Ubicación

La elaboración del queso chihuahua de manera artesanal se llevará a cabo en la planta de lácteos (*Figura 3*) ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional de Agricultura localizada en el Barrio, El Espino, de la ciudad de Catacamas, Olancho.



Figura 3. Planta Procesadora de lácteos, UNAG, Olancho

Posteriormente la investigación que comprende en los análisis fisicoquímicos y microbiológicos serán realizados en el Laboratorio tecnología de la leche y Laboratorio de biotecnología ambos ubicados en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia, con sede en Palmira, en el municipio de Valle del Cauca.



Figura 4. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

5.2. Materiales y equipo.

- **Materia prima:** Se utilizarán 20 litros de leche proveniente de la sección de bovinos de la Universidad Nacional de Agricultura, se utilizará cuajo líquido titanium de la marca Hansen, cultivo termófilo (R-704) y cloruro de calcio (sal) de la marca la tortuga adquirida en Catacamas.
- **Materiales de uso personal:** gabacha, redecilla, mascarilla, botas de hule.
- **Materiales:** Tinas de acero inoxidable, liras, molino, tamices, mesas, cuchillo, cucharas, coladores, recipientes, moldes de madera, bolsas plásticas
- **Materiales de laboratorio:** Matraz, beaker, micropipeta, Erlenmeyer, soporte, bureta.
- **Equipos e instrumentos:** Balanza analítica, termómetro, pH metro digital, balanza de humedad, estufa eléctrica, butirómetro.
- **Reactivos:** se utilizará agua destilada, solución NaOH 0.1N, ácido sulfúrico, alcohol isoamílico, fenolftaleína (indicador).

5.3. Metodología

5.3.1. Diseño experimental

Se realizará un diseño factorial de 2×1 , se evaluará el efecto de la temperatura (1 nivel: 16 °C), efecto del tiempo (2 niveles: 2 días y 5 días). Las diferencias estadísticas entre la evaluación fisicoquímica de las muestras se evaluarán mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararán mediante la prueba de Tukey a un nivel de probabilidad del 5% utilizando el software InfoStat 4.5. Para la agrupación estadística y la identificación microbiana, los espectros de masa se procesarán utilizando el paquete de software de MALDI Biotyper 3.0.

Tabla 1. Tratamientos.

Tiempo de maduración	Temperatura de maduración
2 días	16 °C
5 días	

Tabla 2. Niveles y variables de respuesta de los tratamientos.

Tratamientos	Tiempo (días)	Temperatura °C	Variables de respuesta
1	2	16	Presencia de microorganismos (UFC/g)
2	5	16	Propiedades fisicoquímicas (%)

La investigación se desarrollará en tres etapas (*Figura 5*).

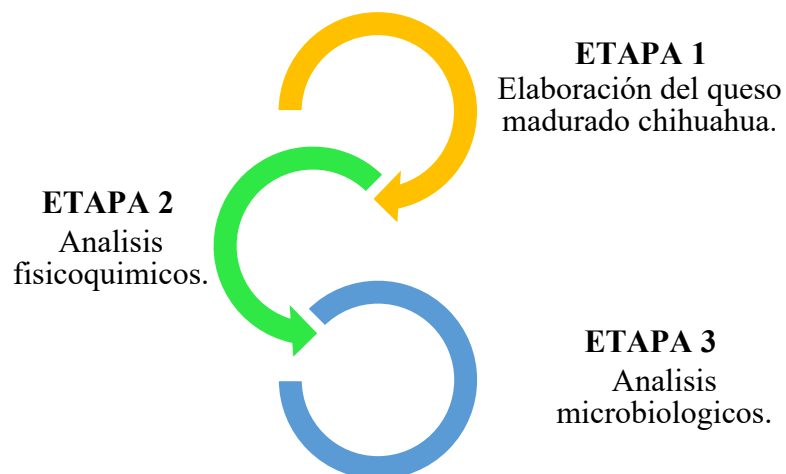


Figura 5. Etapas de la investigación.

5.3.2. Etapa 1: Elaboración del queso madurado chihuahua.

Para la elaboración el queso madurado chihuahua se llevará a cabo una formulación optimizada de una tesis de grado, tomando como valor los tiempos de prensado, cultivo termófilo (R-704), cuajo líquido titanium, tiempo y temperatura de maduración (Lopez Burgos, 2024).

Tabla 3. Formulación optimizada queso madurado chihuahua (Lopez Burgos, 2024).

Nº	Ingredientes	Cantidad
1	Leche de vaca	20 Lt
2	Cuajo liquido	4 ml
3	Cultivo termófilo (R-704)	4 g
4	Sal	100 g

5.3.3. Etapa 2: Análisis Fisicoquímicos.

5.3.3.1. Acidez titulable.

El análisis se realizará empleando la metodología de la NOM-243-SSA1-2010, se utilizara 5 g de muestra hasta obtener una mezcla homogénea con 50 ml de agua destilada con 2-3 gotas de indicador de fenolftaleína, luego se llenará la bureta con solución de NaOH 0.1N gota por gota haciendo movimientos suaves, la titulación debe continuar hasta la aparición de un color rosa permanente por lo menos 30 segundos, cada una por triplicado.

5.3.3.2. pH

El pH de la muestra se determinará utilizando un pH-metro previamente calibrado, introduciendo el electrodo directamente en 5g de la muestra homogénea con 50mL de agua destilada, por triplicado (AOAC, 2006).

5.3.3.3. Grasa

El porcentaje de lípidos se obtendrá por el método butirométrico, en un Erlenmeyer se agregara 5 g de muestra rallado o finalmente molida con 10 ml de ácido sulfúrico concentrado hasta homogenizar se añadirá 1 ml de solución NaOH 0.1N se someterá a calor en un baño maría a una temperatura entre 65-70 °C durante 5 minutos, enfriar a temperatura ambiente añadir 1 ml de alcohol isoamílico mezclar y transferir al butirómetro especial para quesos Van Gulik llenándolo hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad añadir ácido sulfúrico hasta que la columna inferior se llene completamente y se forme una capa transparente en la parte superior, tapar y agitar por 1 minuto, se procederá a centrifugar el butirómetro a 3,000 rpm durante 10 minutos, ya enfriado finalmente se tomara la lectura de la capa de grasa en la escala graduada del butirómetro y eso representara el porcentaje de grasa en la muestra, por triplicado.

5.3.3.4. Humedad

Se tomará una muestra de 5 g para determinar el porcentaje de humedad secando la muestra en una estufa a 102 ± 2 °C. Tras el secado, las muestras se mantendrán a temperatura ambiente en un desecador hasta obtener una masa constante.

5.3.3.5. Proteína

Para obtener el contenido de proteínas, se determinará en primer lugar el contenido de nitrógeno total mediante el método micro Kjeldahl, que comprende las fases de digestión, destilación y valoración, según el método (AOAC, 2006).

Tabla 4. Métodos para la determinación de los análisis fisicoquímicos.

Tipo de análisis fisicoquímicos	Método
Acidez	Titulación
pH	pH metro
Grasa (%)	M. Van Gulik
Humedad (%)	M. gravimétrico
Proteína (%)	M. micro Kjeldahl

5.3.4. Etapa 3: Análisis microbiológicos.

Tabla 5. Método para la identificación de microorganismos.

Tipo de análisis microbiológicos	Método
Recuento de bacterias ácidos lácticos.	MALDITOF-MS
Recuento de levaduras y hongos filamentosos.	

5.4. Variables por evaluar

5.4.1. Variables dependientes

- Carga en la flora microbiana (bacterias, hongos y levaduras).
- Propiedades fisicoquímicas (%grasa, %proteínas, %humedad, acidez, pH).

5.4.2. Variables independientes

- Tiempo de maduración y almacenamiento

- Temperatura de maduración y almacenamiento

5.5. Análisis estadístico.

Las diferencias estadísticas entre la evaluación fisicoquímica de las muestras se evaluarán mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararán mediante la prueba de Tukey a un nivel de probabilidad del 5% utilizando el software InfoStat 4.5 (FERREIRA & Sisvar, 2014).

Para la agrupación estadística y la identificación microbiana, los espectros de masa se procesarán utilizando el paquete de software de MALDI Biotyper 3.0 (CARVALHO, H., & et al, 2017).

VI. PRESUPUESTO

Tabla 6. Presupuesto desarrollo de investigación.

Descripción	Cantidad	Unidades	Precio Valor unitario	Costo total
Leche	20	Lt	15	300
Cloruro de calcio	1	Lbs	30	30
Cuajo liquido	1	Lt	200	200
Cultivo Láctico (R-704)	1	sobre	800	800
Total, Lps.				1,330

Tabla 7. Presupuesto gastos de viaje.

GASTOS DE VIAJE (3 meses)	
Actividad	Precio en (Lps)
Vuelo	11,680
Vivienda	10,382
Transporte	3,500
Alimentación	10,000
Seguro de vida	4,700
Total	40,262

VII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

[illegible]

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alegría, A. P.-B. (2019). *Characterization of the technological behavior of mixtures of mesophilic lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses made of raw milk without added starters*. Int. J. Dairy Technol., 69:507-519. doi:10.1111/1471-0307.12253.
- Carranco , L., & Rodriguez, J. (2015). *Incidencia del contenido de grasa de la leche de vaca, dosis del probiótico (Lactobacillus casei 01) y temperatura de inoculación del cultivo en la elaboración de queso fresco*. 102.
- CARVALHO, L., H., S., & et al. (2017). *Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeast of rehydrated corn kernel silage*. Journal of Applied Microbiology, v. 122, n.3 p. 589-600.
- Cercenado Mansilla, E., & Cantón Moreno, R. (2019). *Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 5-15.
- Cervantes Escoto, F., Villegas, A., Cesin Vargas, A., & Espinoza Ortega, A. (2008). *Los Quesos Mexicanos Genuinos*. Patrimonio cultural que debe rescatarse. Mexico.
- FERREIRA, D., & Sisvar , F. (2014). *Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons*. Ciencia e agrotecnologia, p. 109-112.
- Gastalver Robles, M. d. (2020). *Maduración y envasado de quesos*. España: ELEARNING S.L.

- Giraffa, G., & Carminati, D. (2008). *Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications*. Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented foods., 1-30.
- González Martínez , M. T. (2020). *Evaluación del desarrollo de aminos biógenas en queso chihuahua durante la vida de anaquel*. Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona.
- Karimi, R., Mortazavian, A., & Amiri-Rigi, A. (2019). *Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese*. Food Microbiol, 29:1-9. doi:doi:10.1016/j.fm.2011.08.008
- Leroy, F., y L. De-Vuyst. (2004). *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. Trends Food Sci. Technol., 15:67-78.
- Lopez Burgos, H. A. (2024). *Elaboración y evaluación sensorial de la calidad de queso madurado tipo chihuahua a escala de laboratorio*. Catacamas. Olancho, Honduras: Universidad Nacional de Agricultura.
- Lopez Rios, A. L. (2020). *Tecnología de afinado de quesos*. Sevilla: Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.
- Molina, D. (2010). *Análisis de la Cadena de Valor Láctea de Honduras*. PRONAGRO/SAG.
- N., N. Č.-V. (2015). *Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia*. International Journal of Food Microbiology, 166(2):294-300.
- Ortiz Estrada, Á. M. (2020). *Diversidad y dinamica de las poblaciones microbianas durante la manufactura y almacenamiento del queso chihuahua*. Hermosillo, Sonora: Centro de investigación en alimentación y desarrollo.

- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. (2012). *Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad*. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental.
- Ruiz Navarro, P. M. (2023). *Estudio de la degradacion de un medio analogo de queso por diferentes especies fungicas bajo la influencia de distintas condiciones ambientales*. Madrid: Tecnologia de las industrias agrarias y alimentarias.
- Sanchez Gamboa, C. (2017). Diversidad y dinámica del microbioma de bacterias lácticas del queso chihuahua. Nuevo Leon: Universidad Autonoma de Nuevo Leon.
- Tot Formatge. (2024). Obtenido de <https://totformatge.com/es/formatgepedia/el-queso-clasificaciones/>
- Van Hekken, D., Tunick, M., Tomasula, P., & Molina-Corral, F. y. (2020). Mexican queso Chihuahua: rheology of fresh. *International Journal of Dairy Technology*. , 60:5-12.
- Viljoen, B. (2015). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1–2):37-44.