



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN QUESOS  
MADURADOS: MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y  
METABOLITOS QUE APORTAN”**

**TESINA**

**QUE PRESENTA:**

**XIMENA MARTÍNEZ SÁNCHEZ**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**FRANCISCO RUIZ TERÁN**



**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	II
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	IV
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	V
1. Introducción .....	1
2. Marco teórico.....	2
3. Objetivos.....	4
3.1. Objetivo general.....	4
3.2. Objetivos particulares .....	4
4. Hipótesis .....	5
5. Metodología .....	5
6. Leche y productos lácteos.....	5
6.1. Composición.....	6
6.1.1. Lípidos.....	6
6.1.2. Proteínas .....	6
6.1.3. Lactosa .....	7
6.1.4. Vitaminas, sales y nutrimentos inorgánicos.....	7
6.2. Etapas del proceso de elaboración .....	10
6.2.1. Selección y estandarización de la leche .....	11
6.2.2. Acidificación .....	12
6.2.3. Coagulación de la leche (método enzimático y ácido) .....	13
6.2.4. Tratamientos post coagulación para favorecer la sinéresis del gel .....	14
6.2.5. Salado.....	14
6.2.6. Moldeado y prensado en quesos .....	15
6.2.7. Maduración .....	15
7. Métodos de identificación de levaduras dependientes de cultivo en quesos madurados.....	22
7.1. Medios de cultivo para levaduras.....	22
7.2. Pruebas bioquímicas .....	22
7.3. Métodos de Identificación Molecular .....	23
7.3.1. Método de agrupación de levaduras .....	24
7.3.1.1. PCR-RAPD .....	24
7.3.1.2. Método de identificación de levaduras empleando el gen ribosomal 26S .....	24
7.3.1.3. PCR-RFLP de las regiones ITS y del gen 5.8S rRNA.....	25
7.3.1.4. Espectroscopía de infrarrojo por transformada Fourier (FT-IR) .....	26
8. Métodos de identificación de levaduras independientes de cultivo en quesos madurados .....	27
8.1. PCR-DGGE.....	27

8.2.	PCR-TGGE .....	28
8.3.	NGS .....	28
8.4.	TGS .....	29
9.	Levaduras aisladas e identificadas en quesos madurados .....	30
10.	Metodologías analíticas empleadas en el análisis de los metabolitos en quesos .....	34
10.1.	Técnicas de extracción de compuestos volátiles.....	34
10.2.	Separación cromatográfica.....	36
10.3.	Sistema de detección de compuestos volátiles presentes en quesos .....	37
11.	Metabolitos producidos por las levaduras en quesos.....	38
11.1.	Metabolismo del ácido láctico y del lactato.....	38
11.2.	Lipólisis .....	39
11.3.	Proteólisis.....	42
12.	Aminas Biogénicas .....	45
13.	Actividad probiótica de las levaduras .....	48
14.	Interacción de microorganismos y producción de metabolitos .....	49
15.	Discusión .....	50
16.	Conclusiones .....	51
	<b>Referencias .....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Composición porcentual de diferentes leches utilizadas para la elaboración de quesos. ....	<b>8</b>
<b>Tabla 2.</b> Producción industrial de queso (x 1000 de toneladas) para países seleccionados entre 2018-2022. ....	<b>10</b>
<b>Tabla 3.</b> Evaluación morfológica para identificación de levaduras en queso Cabrales. ....	<b>23</b>
<b>Tabla 4.</b> Sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción HaeIII, CfoI y HinfI. ....	<b>26</b>
<b>Tabla 5.</b> Especies de levaduras aisladas en diferentes quesos madurados. ....	<b>32</b>
<b>Tabla 6.</b> Técnicas de extracción para el análisis de volátiles en alimentos y productos lácteos. ....	<b>35</b>
<b>Figura 1.</b> Producción industrial de queso (toneladas) en México del 2018-2021. ....	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> Diagrama del proceso general de elaboración de quesos. ....	<b>11</b>
<b>Figura 3.</b> Quesos madurados. ....	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Diagrama de cromatografía de dos dimensiones. ....	<b>37</b>
<b>Figura 5.</b> Esquema de los cambios que ocurren durante la maduración de un queso Camembert. ....	<b>39</b>
<b>Figura 6.</b> Rutas de formación de compuestos aportadores de sabor a partir de ácidos grasos durante la maduración de quesos. ....	<b>40</b>
<b>Figura 7.</b> Rutas del catabolismo de leucina para formación de compuestos volátiles. ....	<b>43</b>
<b>Figura 8.</b> Rutas del catabolismo de metionina para la formación de compuestos volátiles azufrados. ....	<b>44</b>
<b>Figura 9.</b> Compuestos producidos por el metabolismo de levaduras. ....	<b>45</b>
<b>Figura 10.</b> Formación de aminas biogénicas por enzimas descarboxilasas. ....	<b>47</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS

### *A*

aw: actividad acuosa

### *C*

CG: Cromatografía de Gases

### *D*

DOP: Denominación de Origen Protegido

### *E*

Eh: potencial redox

### *F*

FAO: Food Agricultural Organization

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojo por transformada Fourier

### *G*

GC: Guanina Citosina

### *H*

HS- SPME: Microextracción de fase sólida en espacio de cabeza

### *L*

LPL: lipoproteína lipasa

### *M*

m/m: masa sobre masa

### *N*

NCBI: Instituto de Investigación Nacional del Genoma Humano

NGS: Secuenciación de segunda generación

NOM: Norma Oficial Mexicana

### *O*

OMS: Organización Mundial de la Salud

### *P*

Pa: Pascal

PCR-DGGE: Reacción en Cadena de la Polimerasa - Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización

PCR-RAPD: Reacción en cadena de la polimerasa- Amplificación al azar de ADN polimórfico

PCR-RFLP: Reacción en cadena de la polimerasa-Polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción

PCR-TGGE: Reacción en Cadena de la Polimerasa- Electroforesis en gel con gradiente de temperatura

pH: potencial de hidrógeno

### *T*

TGS: Secuenciación de Tercera Generación

### *U*

UFC: Unidad Formadora de Colonias

## 1. Introducción

El queso es un producto biotecnológico producido alrededor del mundo con diferentes sabores, texturas, perfiles aromáticos y composición. A pesar de que la principal materia prima es la leche; desde este punto comienzan las diferencias, ya que hay quesos elaborados con leche de oveja (Pecorino, Feta y el Roquefort), cabra (queso de cabra y queso cabrero) y vaca (Cotija, Panela, Oaxaca, Chihuahua, Grana Padano, entre otros).

Durante su elaboración y el madurado ocurren una serie de cambios bioquímicos, causados por las propias enzimas presentes en la leche, pero también por la diversa microbiota que presenta; desde bacterias ácido-lácticas, hasta levaduras y hongos que pueden provenir de la materia prima, del cultivo iniciador o del medio donde se producirá el queso (Biagiotti et al., 2018).

Para obtener un queso con las características deseadas de aroma, textura y sabor es necesario analizar la matriz alimentaria, evaluar el papel fundamental de cada componente y controlar la presencia de ciertos microorganismos que producen metabolitos deseables en el queso, como diacetilo (Fox et al., 2016). Las modificaciones en los componentes, así como la cantidad presente de cada uno darán como resultado la vasta variedad de quesos existente hoy en el mundo.

Dentro de la microbiota presente en el queso, las levaduras son importantes por el aumento de pH, la producción de metabolitos con contribución en el perfil aromático, su alta actividad enzimática y su actividad antifúngica, características que repercuten en su calidad (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019).

La presente tesina aborda la explicación de la elaboración de quesos, la descripción de los métodos de identificación y caracterización de levaduras, seguido de la recopilación de la información sobre las levaduras aisladas en diferentes quesos madurados. Se recabó información sobre los metabolitos producidos por estos microorganismos, mediante catabolismo de lactato, lipólisis y proteólisis, y su aporte al perfil aromático y sobre la calidad del producto lácteo, describiendo las metodologías analíticas para su detección. También se investigó la interacción entre las levaduras con diferentes microorganismos como bacterias ácido-lácticas y algunos hongos, y su efecto antifúngico en quesos madurados.

## 2. Marco teórico

La microbiota presente en los quesos contribuye en el proceso de maduración, ya sea de forma directa por actividad metabólica o indirecta por liberación de enzimas en la matriz alimentaria (Fox et al., 2004). Los compuestos que se producen durante la maduración juegan un papel fundamental en la textura y aroma del producto terminado y, por consiguiente, en la preferencia del consumidor que busca un perfil aromático y apariencia característicos.

Estos compuestos varían dependiendo del microorganismo y su abundancia en la matriz alimentaria. Dentro de los microorganismos encontrados en el producto lácteo, las levaduras son consideradas cultivos secundarios relacionados con la maduración de los quesos y también con su deterioro (en caso de una elevada concentración). Dependiendo de la materia prima utilizada y el medio ambiente durante la producción del queso la biodiversidad de las levaduras varía, siendo *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Candida zeylanoides* y *Kluyveromyces lactis* las más comunes que se encuentran en la superficie de quesos madurados (Atanassova et al., 2016; Biagiotti et al., 2018; Esen & Çetin , 2021).

Debido a esto, se reconoce la importancia de la identificación de las levaduras y al paso de los años se ha profundizado sobre los diferentes métodos que pueden utilizarse; actualmente se dividen en dos grupos: los métodos dependientes de cultivo y los métodos independientes de cultivo. El primero hace referencia a la necesidad de un aislamiento en medios de cultivo previo al método de identificación, el cual puede ser mediante pruebas bioquímicas o métodos moleculares. Con lo que respecta al segundo grupo, no requiere un paso previo de cultivo de microorganismos y directamente de la muestra puede llevarse a cabo la identificación (Fox et al., 2004).

Dentro de los métodos independientes de cultivo se utilizan para el análisis de este producto lácteo la PCR-DGGE, NGS y TGS (por sus siglas en inglés) porque son métodos sensibles que permiten la identificación de microorganismos no cultivables (Ceugniez et al., 2017; Biagiotti et al., 2018; Ianni et al., 2020) y en los casos específicos de la secuenciación de segunda y la de tercera generación requieren menor tiempo y generan fragmentos de pares de bases más pequeños.

Una vez identificadas las levaduras se busca evaluar cómo su desarrollo en el proceso de maduración influye en el queso madurado, por lo que se analizan los compuestos producidos y cómo afectan en las características del producto. Para este análisis se han desarrollado

metodologías analíticas para la detección de compuestos volátiles y no volátiles que son productos del metabolismo de levaduras y otros microorganismos presentes en el queso (Bertuzzi et al., 2018).

En el desarrollo del sabor del queso, predomina la presencia de compuestos volátiles y para su detección e identificación se sigue el procedimiento de extracción/concentración, separación y posterior identificación. Hoy en día existen diversas técnicas de extracción utilizadas para aislar y concentrar los volátiles que se encuentran en diversos quesos como el Cheddar; y su elección influye en el tipo de compuesto extraído e identificado, por lo que es importante determinar el analito en cuestión y la técnica para su extracción (Bertuzzi et al., 2018). Las técnicas más utilizadas para la extracción de volátiles presentes en muestras de quesos es la destilación-extracción simultánea que se utiliza para compuestos de baja volatilidad y la micro extracción en fase sólida (Alewijn, Sliwinski, & Wouters, 2003). Otras técnicas desarrolladas son la extracción en tubo y la extracción dinámica en fase sólida que pueden ser automatizadas y presentan grandes volúmenes de adsorción (Bertuzzi et al., 2018).

Siguiendo con la separación de compuestos volátiles que aportarán el característico perfil aromático al queso madurado, la metodología más utilizada es la cromatografía de gases. Sin embargo, se ha desarrollado la cromatografía de gases de dos dimensiones que permite la identificación de una mayor cantidad de compuestos volátiles ya que cuenta con dos columnas, cada una con diferente polaridad (Gogus, Ozel, & Lewis, 2006).

Para la detección de compuestos la selección del método depende del producto a analizar y la variedad de los analitos de interés. En el caso de los productos lácteos en un inicio se usaba el detector de ionización de flama, pero ha sido reemplazado por espectrometría de masas (Gogus, Ozel, & Lewis, 2006) y actualmente por la cromatografía de gases-olfatometría asociada con la espectrometría de masas (Sádecká et al., 2016).

Dicha detección permite elaborar un perfil de los compuestos volátiles presentes en cada queso madurado; siendo los más comunes los alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, etil ésteres y metil cetonas. Estos compuestos pueden ser producidos por el metabolismo del lactato, la actividad lipolítica y/o proteolítica de las levaduras.

Además de la identificación de estos compuestos es importante conocer la cantidad en la que están presentes, ya que cada especie de levadura producirá una variedad de estos compuestos y en diferente proporción a comparación de las demás. Por ejemplo, un exceso de ácido

sulfhídrico puede producir aromas desagradables a “huevo podrido” (Landaud, Helinck, & Bonnarne, 2008).

Además de la identificación de los compuestos volátiles y no volátiles presentes en los quesos por causa de las levaduras, conocer la interacción de estos microorganismos con otros como hongos, bacterias y otras levaduras presentes en el producto permite comprender el comportamiento de la levadura en cuestión. Por ejemplo, si presenta actividad antimicrobiana e inhibe bacterias patógenas (Esen & Çetin, 2021), o bien si tendrá efecto sinérgico con un microorganismo para la producción de compuestos volátiles y no volátiles de interés. Esta interacción con otros microorganismos puede afectar su metabolismo o hasta su presencia en el queso (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

Recopilar y presentar la información sobre las levaduras identificadas en diferentes variedades de quesos madurados y analizar el papel que aportan en el producto lácteo, como la formación de compuestos aromáticos, actividad probiótica y su interacción con otros microorganismos presentes. La búsqueda de información será de artículos publicados en los años 2000-2021.

#### 3.2. Objetivos particulares

- Analizar la información publicada en revistas científicas y las plataformas *Google Scholar* y biblioteca digital de la Universidad sobre las levaduras identificadas en quesos madurados, los metabolitos producidos y las tecnologías utilizadas para su identificación.
- Relacionar las levaduras identificadas en diferentes quesos madurados con las rutas bioquímicas de estos microorganismos y la producción de compuestos volátiles y no volátiles que influyen en el sabor, textura y aroma de los quesos.
- Conocer sobre los efectos probióticos de las levaduras, su interacción con la microbiota presente en los quesos y los efectos que conlleva dicha interacción.

#### 4. Hipótesis

Existe suficiente información para determinar el papel que juegan las levaduras en los quesos madurados provenientes de leches de diferente origen y por variaciones en el proceso de elaboración.

#### 5. Metodología

La investigación bibliográfica se llevó a cabo mediante la búsqueda de palabras clave: queso madurado, métodos de identificación dependientes, métodos de identificación independientes, levaduras, lipólisis, proteólisis, aminas biogénicas, entre otras, y una combinación entre las palabras. La búsqueda se realizó a través de la biblioteca digital de la Universidad y de revistas científicas, acotándola a los años 2000-2021.

Los resultados encontrados se basan en artículos académicos, libros, tesis y páginas de internet reconocidas como el Instituto de Investigación Nacional del Genoma Humano (NCBI).

Una vez obtenida la información se abordó la investigación con una explicación de las técnicas de identificación, las levaduras encontradas en diez diferentes variedades de queso y las metodologías analíticas empleadas para la detección de compuestos volátiles en productos lácteos. Además, se aborda la presencia de aminas biogénicas, la interacción que presentan las levaduras con diferentes microorganismos encontrados en el queso y cómo estas interacciones pueden ser benéficas.

#### 6. Leche y productos lácteos

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, la leche es “la secreción de las glándulas mamarias de las vacas sin calostro”. Su composición es compleja y sus componentes principales son agua, grasa, proteínas y azúcares, y en menor proporción se encuentran las vitaminas, minerales y otros compuestos como enzimas y ácidos orgánicos.

La leche es considerada una emulsión de aceite en agua y es la fuente principal de alimentación para el becerro, además de que constituye un alimento con un gran aporte de nutrientes para la alimentación humana.

## 6.1. Composición

### 6.1.1. Lípidos

Los lípidos que principalmente están presentes en la leche son los triglicéridos en un 96 % - 98 % y en menor proporción se encuentran los diacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, entre otros.

Los triglicéridos se encuentran como glóbulos en la leche y contienen ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, de cadena corta, mediana y larga. Dependiendo la fuente de la leche difieren la cantidad de los ácidos grasos presentes. Por ejemplo, en la leche de vaca se encuentran en mayor cantidad que las demás leches los ácidos grasos: palmítico, esteárico y oleico, para la leche de cabra el contenido de ácidos grasos cáprico y láurico es mayor, y por último la leche de oveja presenta un mayor contenido del ácido graso mirístico con respecto a las otras dos leches (Bautista, 2014; Badui, 2006; Mollica et al., 2021).

La relación de ácidos grasos saturados a insaturados y los ácidos de cadena corta determinarán el estado físico de la grasa al igual que la susceptibilidad a reacciones químicas que tienen impacto en el sabor del producto lácteo.

### 6.1.2. Proteínas

Son los componentes más importantes de la leche desde el punto de vista nutritivo y se dividen en dos grupos: las caseínas que representan el 80 % del total de las proteínas y las proteínas del suero con el 20 % restante.

Las caseínas se constituyen por micelas que se encuentran suspendidas en la leche y contienen fosfatos que esterifican a los hidroxilos de las serinas. Estas proteínas a su vez se dividen en cuatro: alfa (s1 y s2), beta, kappa y gamma caseínas que cuentan con propiedades diferentes.

- Las alfa, beta y gamma caseínas son sensibles a altas concentraciones del ion calcio propio de la leche o añadido en el caso del proceso de elaboración de queso.
- La kappa caseína cumple con la función estabilizadora y evita que naturalmente precipiten las caseínas sensibles al calcio. Tiene una sección hidrófoba y una hidrofílica, por lo que su mecanismo de acción es como el de un agente emulsionante que interacciona en dos fases inmiscibles (Badui, 2006).

Todas las caseínas tienen regiones con hidrofobicidad (debido a los aminoácidos aromáticos y alifáticos) y regiones con carga negativa debido a los aminoácidos glutámico y aspártico; estas características le confieren estabilidad y solubilidad (Badui, 2006).

Dependiendo del origen de la leche (vaca, cabra, oveja, camella, etc.) la fracción de las caseínas presente varía; por ejemplo, en la leche de cabra la fracción alfa s2 es más abundante, mientras que en la leche de vaca lo es la variante alfa s1 .

Por otro lado, las proteínas del suero que son compactas, globulares y solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso pH ácido, siempre y cuando no se hayan desnaturalizado por el calor, ya que son sensibles a temperaturas elevadas). Las fracciones que destacan son beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, inmunoglobulinas y proteosomas peptonas.

### 6.1.3. Lactosa

La lactosa es el carbohidrato presente en la leche, formado por galactosa y glucosa unidos por el enlace glucosídico beta (1,4). Es sintetizada en la glándula mamaria y junto con las sales, contribuye al sabor de la leche.

Dentro de las leches producidas por diferentes especies de rumiantes, la de oveja es la que presenta mayor porcentaje de lactosa en comparación con la de cabra y vaca (Tabla 1). Para la leche de vaca la lactosa varía dentro del 4.7 % al 5 % dependiendo la raza (Badui, 2006).

### 6.1.4. Vitaminas, sales y nutrientes inorgánicos

Las vitaminas presentes en la leche son hidrosolubles y liposolubles. En el caso de las vitaminas liposolubles como la A, D, E y K interactúan con los glóbulos de grasa, mientras que las hidrosolubles como la riboflavina, B6, B12, C, niacina, biotina, ácido pantoténico, entre otras, se encuentran en el suero.

Los factores que impactan en la concentración de vitaminas liposolubles encontradas en la leche son la alimentación del animal y el origen de la leche; por ejemplo la leche de cabra contiene mayor contenido de vitamina A que las demás, sin embargo; contiene bajo contenido de vitamina B12. Pero en el caso de las hidrosolubles, independientemente de la dieta del animal

se mantendrán más o menos constantes (Badui, 2006). Aunque, durante la elaboración de quesos las vitaminas hidrosolubles se pierden ya que se quedan en el suero.

Dentro de las sales que se encuentran en la leche destacan los citratos, bicarbonatos, cloruros y fosfatos de calcio, magnesio, sodio y potasio. De los compuestos inorgánicos el fósforo se encuentra principalmente esterificado con las fosfoserinas que tienen las caseínas y en el caso del calcio se puede encontrar en su forma coloidal (unido por el fosfato a las caseínas) o soluble en el suero.

Las sales juegan un papel muy importante en los productos lácteos. Por ejemplo, una adición de calcio desestabiliza el sistema proteínico pero los citratos y fosfatos lo estabilizan (Badui, 2006).

Respecto a las diferencias en composición, las leches de cabra y oveja contienen mayor contenido de calcio que la de vaca, mientras que la leche de oveja tiene un mayor contenido de magnesio y fósforo (Verduci et al., 2019).

**Tabla 1.** Composición porcentual de diferentes leches utilizadas para la elaboración de quesos-

<b>Tipo de leche</b>	<b>Agua</b>	<b>Grasa</b>	<b>Lactosa</b>	<b>Minerales</b>	<b>Proteínas del suero</b>	<b>Caseína</b>
Vaca	87.8	3.4	4.8	0.7	0.7	2.6
Oveja	82.1	6.4	5.1	0.9	1.0	4.5
Cabra	87.7	3.8	4.3	0.8	0.7	2.7

Fuente: Elaboración propia con información de FAO, 2013.

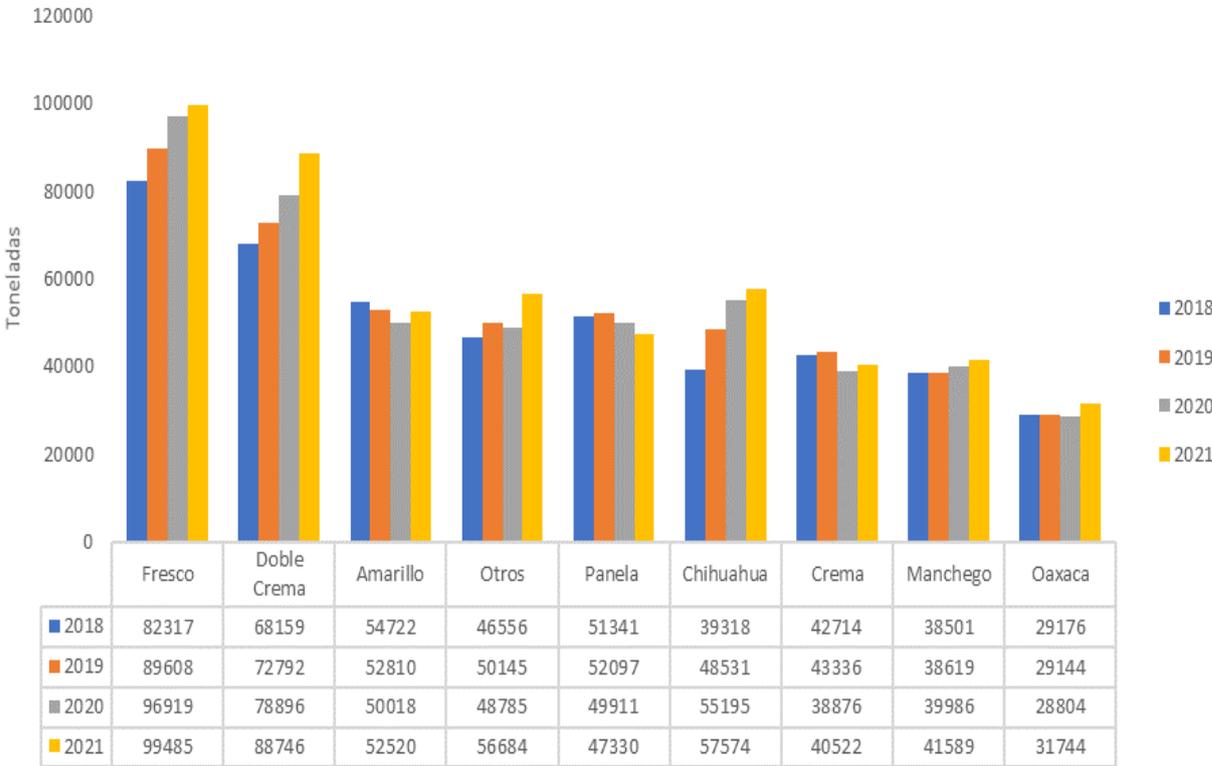
#### Proceso de elaboración de quesos madurados

En nuestro país, la definición de “queso” se encuentra descrita en la NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018 como “el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado, en el que la proporción de proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche; y es obtenido mediante la coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, mantequilla, crema o la combinación de estos productos mediante la acción del cuajo u otros coagulantes”. La cuajada puede ser cortada, drenada, salada, prensada o no, y puede ser sometida a procesos de maduración con condiciones de temperatura, humedad y tiempo controlados para generar cambios físicos y bioquímicos que producirán un producto con un perfil de aroma, sabor y textura característicos.

En México existen gran variedad de quesos, aunque los más producidos son los frescos y en menor cantidad los semi-madurados como el queso Manchego y Chihuahua (Figura 1).

Con lo que respecta a la producción mundial, México con alrededor de 460,000 toneladas de queso producidas al año se encuentra por debajo de los principales productores como la Unión Europea que tiene aproximadamente una producción anual de 10.5 millones de toneladas y Estados Unidos con una producción de 6 millones de toneladas al año (Tabla 2).

Sin embargo; comparado con Latinoamérica se encuentra en tercer lugar después de Brasil y Argentina que producen alrededor del 790,000 y 550,000 toneladas, respectivamente (USDA, 2022).



**Figura 1.** Producción industrial de queso (toneladas) en México del 2018-2021. Fuente: Elaboración propia con información de INEGI, 2023.

**Tabla 2.** Producción industrial de queso (x 1000 de toneladas) para países seleccionados entre 2018-2022.

<b>Año</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>	<b>2022</b>
Unión Europea	9872	10155	10362	10550	10550
Estados Unidos	5914	5959	6005	6217	6350
Rusia	970	983	1059	1075	1085
Brasil	760	770	790	790	745
Canadá	510	515	523	522	530
Argentina	444	523	488	530	535
Reino Unido	472	472	488	503	515
México	419	437	446	448	455
Australia	366	364	379	385	390
Bielorrusia	275	300	346	355	370
Nueva Zelanda	370	365	350	380	375
Otros	284	285	289	296	267
<b>Total</b>	<b>20656</b>	<b>21128</b>	<b>21525</b>	<b>22051</b>	<b>22167</b>

Fuente: Elaboración propia con información de USDA, 2022.

## 6.2. Etapas del proceso de elaboración

La producción de quesos se basa en un mismo proceso, aunque con pequeñas variaciones como: el origen de la leche, el modo de salado, tipo de coagulación, condiciones de maduración (tiempo y humedad), etc. Lo cual genera el producto con las características deseadas (Fox et al., 2016).

La elaboración de este producto lácteo consiste en pasos fundamentales que incluyen la coagulación, corte del coágulo, desuerado, salado, prensado y maduración (si se requiere) (Figura 2). Aunque también existen pasos opcionales como el pretratamiento a la leche e incorporación de cultivos lácticos y aditivos como el cloruro de calcio y colorantes (Badui, 2006).



**Figura 2.** Diagrama del proceso general de elaboración de quesos. Fuente: Elaboración propia

### 6.2.1. Selección y estandarización de la leche

Dentro de las más de 2000 variedades de queso existentes en el mundo (Zheng, Shi, & Wang, 2021) el primer factor de cambio es la selección de leche porque dependiendo su origen la cantidad de grasa, proteína y lactosa será diferente. Esto se debe a que su composición depende de factores genéticos (especie, raza y variedad) y medioambientales (especialmente su alimentación). Por ejemplo, los quesos Pecorino y Manchego hacen uso de leche de oveja para su producción, mientras que el Parmesano, Oaxaca, Emmental y Cotija están elaborados con leche de vaca; y para el caso exclusivo del queso Emmental la leche proviene de vacas alimentadas con hierba y/o heno.

Dependiendo de la composición de la leche los sustratos que serán metabolizados por microorganismos y/o enzimas endógenas varía y si agregamos la variable de las condiciones de producción, nos da como resultado la gran variedad de quesos en el mundo.

Seguido de la selección de la leche se realiza una estandarización para obtener un producto homogéneo, ya que variaciones en la composición afectan el producto final. Por ejemplo, un exceso de grasa en la leche puede resultar en una baja expulsión de suero durante el desuerado

y una baja concentración de grasa con respecto a la relación caseína/grasa en la leche puede ocasionar una textura firme y elástica del queso (Kalit et al., 2021). La estandarización se puede realizar mediante la adición de crema, separación parcial de la grasa presente o adición de leche descremada. Por ejemplo, en la elaboración del queso Parmesano se separa la grasa para su elaboración.

Dependiendo del tipo de queso la leche estandarizada se pasteuriza como en el caso del queso Gouda. Sin embargo, hoy en día por temas de inocuidad alimentaria y legislación del producto lácteo se emplea leche pasteurizada para su elaboración en la mayoría de las variedades de queso. Este proceso tecnológico permite eliminar bacterias patógenas presentes como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ser. Typhi y *Listeria monocytogenes* (Bastam et al., 2021) y asegurar una calidad uniforme del producto.

La pasteurización es realizada bajo las condiciones de 63 °C por 30 minutos o 72 °C por 15 segundos y elimina bacterias patógenas y casi todas las bacterias con capacidad de fermentar lactosa, por lo que en ocasiones se utiliza la adición de cultivos iniciadores para una fermentación adecuada.

### 6.2.2. Acidificación

Una vez que la leche es estandarizada y pasteurizada, previo a la adición de cultivos iniciadores se hacen la prueba de fosfatasa (para comprobar la correcta pasteurización de la leche) y pruebas microbiológicas para asegurar que no estén presentes microorganismos no deseados que puedan afectar la estabilidad de la acidificación y calidad (Badui, 2006; Zheng, Shi, & Wang, 2021).

Dentro de la microbiota nativa de quesos se encuentran las bacterias ácido-lácticas, las no ácido lácticas y levaduras. Por ejemplo, en el caso del queso madurado Cotija se encuentran algunas especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* (principales encargadas de la acidificación), también bacterias no ácido lácticas y levaduras como *Kluyveromyces lactis* y *Candida etchellsii* (Chombo-Morales et al., 2016).

A diferencia de los quesos Cotija y Parmesano que presentan una fermentación causada por la microbiota nativa del queso, existen otras variedades de quesos como el Cheddar y Gouda en los que se utiliza una fermentación dirigida para su elaboración; es decir, se adicionan cultivos

iniciadores, principalmente *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* para obtener sabores característicos.

Específicamente para la elaboración del queso Parmesano el suero fermentado procedente de la producción de quesos del día anterior actúa como cultivo iniciador.

### 6.2.3. Coagulación de la leche (método enzimático y ácido)

La coagulación se lleva a cabo por adición de renina, acidificación, acidificación con calor o mezcla de ellos.

Utilizando el método de acidificación la coagulación comienza a un pH de 5.2 y al alcanzar un pH de 4.6 ocurre la precipitación, debido a que se alcanza el punto isoeléctrico de las caseínas. Este pH puede ser alcanzado por una acidificación rápida como adición de ácido láctico, cítrico y/o acético, o por acidificación lenta por intervención de bacterias ácido-lácticas que llevarán a cabo la fermentación de la lactosa y disminución del pH.

El principal método de coagulación es la adición de cuajo obtenido del estómago de los rumiantes (quimosina), de plantas (cuajo vegetal) y de origen microbiano. La quimosina hidroliza el enlace peptídico 105-106 entre la fenilalanina y la metionina de la kappa caseína, produciendo la para-k-caseína (1-105) y el macropéptido (106-169). Esta hidrólisis provoca la pérdida de estabilidad de la micela de caseína y la precipitación de caseína alfa y beta (sensibles al calcio proveniente de la leche o adicionado como cloruro de calcio); y por consiguiente la formación de un gel donde quedan atrapados glóbulos de grasa (Badui, 2006).

Los dos métodos mencionados anteriormente pueden ser combinados, dando como resultado la coagulación mixta.

Para los quesos Pecorino y Parmesano la coagulación se lleva a cabo mediante adición de cuajo y calentamiento entre 38 °C y 40 °C, específicamente para la elaboración del queso Parmesano con DOP (Denominación de Origen Protegida) el calentamiento se realiza en un recipiente de cobre ya que este material transfiere uniformemente el calor y permite una cocción homogénea.

#### 6.2.4. Tratamientos post coagulación para favorecer la sinéresis del gel

El corte de la cuajada permite obtener gránulos de menor tamaño, lo que favorece la sinéresis y por consiguiente la separación del suero. Se realiza principalmente con liras metálicas con cortes transversales y longitudinales.

El desuerado puede realizarse por drenado, con coladores o ejerciendo presión y debe controlarse la temperatura al realizarlo porque mientras más elevada sea, el contenido de humedad del gránulo será mayor. Los gránulos se deforman rápidamente a temperaturas elevadas y se generan interacciones entre sus partículas que impiden la salida del agua (Zheng, Shi, & Wang, 2021).

Durante la elaboración de quesos de pasta lavada como el Gouda, se realiza un lavado de los gránulos de la cuajada con el fin de eliminar parte de la lactosa y así controlar la acidificación del queso. También puede realizarse una cocción de la cuajada como ocurre en la elaboración de los quesos Parmesano y Pecorino.

Esta etapa es fundamental en el contenido mineral, de lactosa y humedad del producto final.

#### 6.2.5. Salado

Se añade sal directamente a la cuajada y esto permite inhibir el crecimiento de microorganismos no deseables, ya que al añadir la sal se deja menor cantidad de agua disponible y disminuye la actividad acuosa ( $a_w$ ) por un aumento de la presión osmótica volviendo al queso en un medio selectivo para microorganismos. Además de que este proceso mejora las propiedades de textura y sabor (Hernández, 2010; Zheng, Shi, & Wang, 2021).

La relación entre la concentración de sal y  $a_w$  se representa con la siguiente ecuación lineal:

$$a_w = -0.0007x + 1.0042$$

Donde “x” es la cantidad de sal en g/1000 g de agua. Se considera que un  $a_w$  menor a 0.92 es necesario para prevenir el crecimiento microbiológico lo que es equivalente a un 12 % de sal (Fox et al., 2017).

Existen otros métodos de adición de sal, como el proceso de inmersión en salmuera en la elaboración del queso Gouda o la adición de sal al exterior del queso ya formado como ocurre en la elaboración del queso Limburger.

#### 6.2.6. Moldeado y prensado en quesos

Tiene como finalidad darle forma al queso y los métodos utilizados dependen de cada variedad.

En la elaboración del queso Oaxaca se amasa la cuajada con agua caliente entre 70 °C y 80 °C para ir formando las hebras que se depositan en otro recipiente con agua fría a 4 °C donde reposan.

El queso Cotija es envuelto en yute o ixtle para ser moldeado, el queso Limburger en papel o papel aluminio para favorecer el proceso de maduración, mientras que el Fossa es moldeado dentro de una tela que posteriormente se coloca en un pozo de toba excavado en el suelo (de ahí su nombre en italiano Fossa) para su maduración (Biagiotti et al., 2018).

#### 6.2.7. Maduración

Durante la maduración se desarrollan productos de la actividad lipolítica (lipólisis), proteolítica (proteólisis) y el metabolismo de carbohidratos por acción de enzimas endógenas, microbianas y/o añadidas, lo que resulta en una textura, perfil aromático y del sabor característicos del queso a elaborar.

También ocurren cambios fisicoquímicos importantes como la pérdida de agua por evaporación superficial que lleva a la concentración de sólidos totales, y la disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ) que depende de muchos factores como la cantidad de sal, la interacción proteína-sal y la acumulación de compuestos solubles (derivados de la proteólisis y lipólisis). Cuando se hidrolizan proteínas y lípidos a péptidos y ácidos grasos respectivamente, se reduce el  $a_w$  porque para hidrolizar cada enlace se requiere una molécula de agua (Fox et al., 2017).

El  $a_w$  corresponde al agua utilizada por los microorganismos para su crecimiento y mantenimiento de funciones metabólicas; por lo que específicamente, esta etapa contribuye al control del crecimiento microbiano y actividad metabólica porque al disminuir el  $a_w$  de 0.99 presente en las primeras etapas de elaboración del queso a valores de hasta 0.8 alcanzados en el salado y madurado algunas bacterias no son capaces de crecer a valores tan bajos de  $a_w$ . Sin

embargo, las levaduras pueden crecer a  $a_w$  bajos con un límite de alrededor de 0.83 y para las levaduras osmófilas pueden crecer a valores de  $a_w$  de hasta 0.60.

El  $a_w$  y el contenido de humedad determinarán la velocidad de las reacciones y el desarrollo de ciertos microorganismos durante la etapa de maduración; así como también lo hacen las condiciones de temperatura y el tiempo. Por eso es importante contar con controles de estos parámetros en esta etapa, con el fin de prevenir la presencia de microorganismos no deseados que afecten la acidez, textura, sabor y aroma del producto final.

Otro cambio que ocurre durante la maduración es uno en la textura por la hidrólisis de las proteínas del queso y cambios de pH. Un ejemplo es el queso Camembert denominado de “pasta blanda” por su estructura final obtenida mediante la hidrólisis de proteínas del queso durante la maduración (McSweeney, 2004). El pH también afectará indirectamente el sabor del queso debido a que influye en la actividad de las enzimas importantes en esta etapa del proceso.

El potencial redox del queso también es modificado durante la maduración. Este potencial (Eh) es una medida de la capacidad de un sistema químico-biológico para oxidarse (perder electrones) o reducirse (ganar electrones). La leche presenta un potencial redox de alrededor de +150 a +300 mV; mientras que el queso presenta un valor alrededor de -250 mV (estado reducido). Esta diferencia del potencial redox entre la leche y el queso puede deberse a la producción de ácido láctico durante la fermentación de la lactosa y por la reducción del oxígeno a agua, generando un ambiente anaerobio en el interior del queso que sólo permite el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos o anaerobios (Fox et al., 2017)

La maduración puede llevarse a cabo en diversas condiciones dependiendo de la variedad del queso. En el caso de los quesos Cheddar y Fossa son madurados en condiciones que limitan el crecimiento de microorganismos en la superficie, ya que son colocados en fosas/cuevas, confiriendo un sabor complejo debido a la proteólisis, lipólisis y fermentación anaeróbica (Biagiotti et al., 2018; Krishnan et al., 2019).

Por otro lado, el queso Cotija es “fajado” antes de la maduración con una lámina o tela para mantener su forma y en esta etapa se desfaja cuando se adquiere la textura deseada, volteando el queso y limpiándolo con un lienzo limpio cada tercer día durante el proceso de maduración que va de tres a seis meses (Hernández, 2010).

Durante la maduración, etapa importante para el desarrollo del sabor de quesos (como el Cheddar, Cotija, Fossa Pecorino, etc), se favorece el crecimiento de diferentes especies de

levaduras como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida zeylanoides*, entre otras; que afectarán de manera distinta al producto y su identificación puede realizarse mediante dos tipos de métodos (Sádecká et al., 2016) (Figura 3).



**Figura 3.** Quesos madurados. a) Cheddar b) Limburger c) Fossa Pecorino DOP<sup>1</sup> d) Queso verde, Cherni Vit e) Tomme d'Orchies f) Cotija g) Tetilla h) Cabrales i) Fiore Sardo<sup>1</sup> j) Bryndza. Tomadas de: Canva, 2023; Varna University of Management, 2021; Marmoutier Création, 2023 y Laore Sardegna, fecha de publicación desconocida.

<sup>1</sup> País de Origen: Italia de la Región Autónoma de Sardegna

## 7. Métodos de identificación de levaduras dependientes de cultivo en quesos madurados

Para llevar a cabo una identificación por métodos dependientes de cultivo primero se utilizan medios ricos en nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes en la muestra; seguido se realiza el aislamiento, donde pueden usarse diferentes medios de cultivo selectivos con antibióticos como el agar papa dextrosa con cloranfenicol al 0.01 %. Una vez obtenido el cultivo puro se pueden utilizar diferentes métodos de identificación como la morfológica, bioquímica o con métodos moleculares (Biagiotti et al., 2018).

### 7.1. Medios de cultivo para levaduras

Existen diferentes medios de cultivo debido a los requerimientos de crecimiento de cada levadura. En general, crecen mejor con un alto contenido de humedad y en sustratos con elevadas concentraciones de soluto (osmotolerantes) (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019).

Los medios de cultivo más utilizados en diversas investigaciones fueron: Agar Wallerstein con 0.02 % bifenilo, Agar YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa), Agar PDA (papa dextrosa) y Agar MYPG (extracto de malta, extracto de levadura, peptona y glucosa) (Atanassova et al., 2016; Biagiotti et al., 2018; Esen & Çetin, 2021).

Las colonias representativas que crecen en los medios se escogen con base en una evaluación micro- y macro-morfológica. Una vez aisladas las levaduras existen varios métodos de identificación, ya sean moleculares o bioquímicos.

La identificación fenotípica se basa en las características observables como morfología microscópica, propiedades bioquímicas y metabólicas.

### 7.2. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de los microorganismos presentes en un cultivo. Pisano et al. (2006) identificaron las levaduras del queso Fiore Sardo, aisladas previamente en un agar papa dextrosa con cloranfenicol (0.01 %), con el sistema API ID 32C.

Por otro lado, para la identificación de levaduras presentes en el queso Cabrales Álvarez-Martín et al. (2007) usaron las colonias aisladas del medio de cultivo agar extracto de levadura, glucosa cloranfenicol para ser purificadas en el medio agar dextrosa Sabouraud y posteriormente evaluadas en el sistema Vitek. Las cepas estudiadas se compararon con especies conocidas y las que presentaron un porcentaje de concordancia del 95 % o mayor se consideraron identificadas. Mientras que, las cepas que presentaron un porcentaje de concordancia menor fueron analizadas con el sistema API ID 32C y criterios morfológicos (Tabla 3).

La galería API ID 32C es un sistema de identificación de levaduras compuesto por test de asimilación estandarizados. Contiene pruebas bioquímicas como la fermentación/oxidación de los carbohidratos glucosa, manosa, ramnosa, galactosa, sacarosa y lactosa.

Este sistema permite identificar 63 especies diferentes de levaduras (en su mayoría pertenecen al género *Candida*, aunque también se pueden identificar especies de los géneros *Debaryomyces*, *Pichia* y *Saccharomyces*) al compararlas con una base de datos del sistema de identificación (BioMérieux, 2022).

**Tabla 3.** Evaluación morfológica para identificación de levaduras en queso Cabrales.

Prueba	Medio de cultivo utilizado
Crecimiento en medio sólido y líquido	Caldo extracto de malta y agar dextrosa Sabouraud
Formación de micelio y pseudomicelio	Agar harina de maíz
Formación de ascosporas	Agar de acetato y Gorodkova

Fuente: Elaboración propia con información de Álvarez-Martín et al., 2007.

Sin embargo, este tipo de caracterización puede llevar a que no todas las levaduras sean identificadas y el estudio tenga que ser complementado con otros métodos como los moleculares.

### 7.3. Métodos de Identificación Molecular

La identificación de las levaduras mediante caracterización molecular consiste en la extracción del ADN, de un cultivo previamente aislado y purificado, seguido del método molecular.

### 7.3.1. Método de agrupación de levaduras

#### 7.3.1.1. PCR-RAPD

La RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA, por sus siglas en inglés) es una técnica que consiste en la amplificación de segmentos de ADN con oligonucleótidos pequeños (generalmente de 10 nucleótidos de longitud) de secuencias aleatorias no-palindrómicas, con un contenido de G + C entre 50 % y 80 %.

El método propuesto por Esen & Çetin (2021) es una modificación de la PCR-RAPD donde se hace uso de un oligonucleótido microsatélite del bacteriófago M13 (5'-GAGGAGGGTGGCGGTTCT-3').

Los productos obtenidos de la PCR se separaron en un gel de agarosa y fueron teñidos con bromuro de etidio; las bandas obtenidas se compararon con marcadores moleculares y de esta manera se agruparon de acuerdo con su similitud con el marcador correspondiente. Este método permite obtener “huellas digitales” que son las diferencias de número y tamaño en los fragmentos de ADN amplificado, específicos de cada especie e incluso cepa.

Esen & Çetin (2021) utilizaron la cepa representativa de cada grupo para realizar la identificación de la levadura mediante una segunda PCR con amplificación en la región D1/D2 del gen 26S rRNA.

#### 7.3.1.2. Método de identificación de levaduras empleando el gen ribosomal 26S

Debido a la especificidad de la secuencia de ácidos nucleicos se han desarrollado métodos para la identificación de especies, donde se comparan secuencias de nucleótidos con el fin de analizar las similitudes o diferencias entre organismos. El gen ribosomal 26S de los eucariotas ha evolucionado lentamente, es funcionalmente constante y está distribuido universalmente, lo que permite comparar con organismos distantes (Barclay, 2023).

Para el estudio de las levaduras y su identificación se utiliza el dominio D1/D2 de la región 26S del gen rRNA por ser una región altamente variable y mostrar diferencias entre levaduras, así pueden hacerse relaciones intra- o inter-especie (Martínez, 2009).

Esen & Çetin (2021) amplificaron 600 bp de la región D1/D2 de gen 26S rRNA con los oligonucleótidos NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Se alinean los amplicones con el programa BLAST del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI), lo cual permite llevar a cabo la identificación utilizando un banco de datos.

Por otro lado, diferentes autores analizan los dominios D1/D2 del gen ribosomal 26S con el fin de obtener certeza sobre las cepas identificadas mediante otros métodos y complementar los estudios para tener una evaluación más exacta; debido a que esta región (de alrededor de 800 pb) permite diferenciar microorganismos por su alta variabilidad. Por ejemplo, Biagiotti et al. (2018) corroboraron las levaduras identificadas en el queso Fossa y Atanassova et al. (2016) amplificaron y secuenciaron la región D1/D2 del gen 26S rRNA de *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Debaromyces hansenii* presentes en los quesos Arzúa-Ulloa, Tetilla y Cebreiro de Galicia después de haber separado los productos obtenidos de la PCR-RFLP.

#### 7.3.1.3. PCR-RFLP de las regiones ITS y del gen 5.8S rRNA

La técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa – Polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés) permite la diferenciación de microorganismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, como consecuencia de la acción de enzimas de restricción (National Human Genome Research Institute, 2023).

Atanassova et al. (2016) y Biagiotti et al. (2018) hacen el uso de PCR-RFLP de las regiones ITS (espaciador transcrito interno por sus siglas en inglés) y del gen 5.8S rRNA para el estudio de los quesos Arzúa-Ulloa, Tetilla, Cebreiro y Fossa. Debido a que las regiones ITS1 e ITS2 son no codificantes y variables, mientras que el gen 5.8S rRNA es codificante y conservado; y el uso de ambos permite comparar e identificar organismos porque presentan mayores diferencias entre sí que los genes 18S y 26S rRNA (Esteve-Zarzos et al., 1999).

Para la PCR utilizaron los oligonucleótidos ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') y el ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para amplificar la región del gen rRNA que contiene las dos regiones ITS y el gen rRNA 5.8S.

Una vez que se obtienen los productos de PCR se aplica la técnica RFLP, la cual consiste en el uso de enzimas de restricción para identificar variaciones en el tamaño de la región amplificada.

Dichas enzimas reconocen secuencias específicas de nucleótidos en los amplicones y hacen un corte en los enlaces fosfodiéster de la secuencia reconocida.

En los trabajos mencionados se utilizan las endonucleasas de restricción CfoI, HaeIII y HinfI. En el caso de la endonucleasa HaeIII reconoce una secuencia palindrómica y genera extremos romos, es decir, corta a la mitad la secuencia y no deja extremos de cadena sencilla. Mientras que las endonucleasas CfoI y HinfI hacen cortes escalonados que producen extremos sobresalientes de la cadena sencilla (“extremos cohesivos”) (Tabla 4).

Los productos de restricción obtenidos fueron agrupados mediante una comparación con un banco de datos publicados para la identificación de los microorganismos.

**Tabla 4.** Sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción HaeIII, CfoI y HinfI.

Enzimas de restricción	Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
HaeIII	5' GGCC 3' 3' CCGG 5'	5' GG CC 3' 3' CC GG 5'
CfoI	5' GCGC 3' 3' CGCG 5'	5' GCG C 3' 3' C GCG 5'
HinfI	5' GANTC 3' 3' CTNAG 5'	5' G ANTC 3' 3' CTNA G 5'

Fuente: Elaboración propia con información de New England BioLabs, 2023.

Este método aún es utilizado por ser rápido y sencillo. Sin embargo, presenta ciertas desventajas como la dificultad de identificación de las especies cuando las bandas obtenidas son muy similares (Atanassova et al., 2016).

#### 7.3.1.4. Espectroscopía de infrarrojo por transformada Fourier (FT-IR)

Este método consiste en la absorción de luz infrarroja a frecuencias específicas por compuestos celulares previamente aislados en un medio de cultivo específico (Colabella et al., 2017).

Permite la detección de grupos funcionales (OH, COH, etc.) de sustancias orgánicas e inorgánicas directamente de las células intactas, generando un espectro de “huellas digitales metabólicas” únicas para cada especie de levadura; esto se puede lograr comparando el espectro de la especie de interés con las bases de datos de referencia (Geronikou et al., 2020).

A pesar de ser un método relativamente rápido por los avances en tecnología de la preparación de muestras el problema radica en la sensibilidad del método a condiciones de crecimiento y la falta de espectros de referencia, ya que principalmente se cuenta con identificación de levaduras por FT-IR con aplicación clínica (Wenning, Seiler, & Scherer, 2002), aunque con los años se ha actualizado gradualmente para incluir especies de levaduras encontradas en los alimentos como *Debaryomyces hansenii* y *Kluyveromyces marxianus*.

En la industria alimentaria los componentes que generalmente son medidos con este método para establecer intervalos de control durante la elaboración de productos son: el agua, los carbohidratos, las proteínas o los lípidos.

## 8. Métodos de identificación de levaduras independientes de cultivo en quesos madurados

Los métodos que requieren del cultivo y aislamiento de microorganismos presentan dificultades en la identificación de especies que no pueden ser cultivadas con las técnicas tradicionales, las especies que dependen de otras para su crecimiento o que no se conocen exactamente las condiciones necesarias para su cultivo; por lo tanto, debe tomarse en cuenta el ecosistema completo (Martínez, 2009).

Es por eso que en las últimas décadas se han desarrollado métodos de identificación que no requieren de un aislamiento y que extraen los ácidos nucleicos de los microorganismos presentes directamente del alimento (Bintsis, 2021).

### 8.1. PCR-DGGE

La técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa- Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE, por sus siglas en inglés) es una electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de

nucleótidos. Se usa un gradiente de agentes desnaturalizantes (urea-formamida) que se distribuyen en el gel de poliacrilamida a una temperatura de 50 °C – 65 °C.

La concentración a la cual las cadenas se separan depende de los nucleótidos y el número de puentes de hidrógeno que presente (dobles para el par adenina-timina y triples para el par citosina-guanina).

Biagiotti et al. (2018) utilizaron el ADN directamente extraído de las muestras de queso y tela con la que es envuelto después del madurado y usaron los oligonucleótidos NL1 y LS2 para la reacción de PCR, con una grapa GC en el extremo 5' (lo cual evita la separación completa de las dos cadenas). Los amplicones fueron analizados por DGGE, usando como marcadores el ADN purificado de las cepas aisladas y obteniendo “huellas génicas o digitales” de la comunidad microbiana presente.

Este método permite detectar múltiples especies de manera simultánea y especies de baja detección con los métodos dependientes de cultivo.

## 8.2. PCR-TGGE

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE, por sus siglas en inglés) es un método de identificación que presenta las mismas bases que la técnica DGGE a diferencia de que la separación de la doble cadena de ADN es por medio de un gradiente de temperatura, disminuyendo la velocidad de migración en el gel (Martínez, 2009).

La TGGE es utilizada principalmente cuando los fragmentos de ADN presentan la misma longitud. Las moléculas son separadas de acuerdo con sus características de fusión, por lo que es posible separar fragmentos de ADN de la misma longitud que difieren en su estructura primaria por tan sólo un par de bases (Viglasky, 2013).

## 8.3. NGS

La secuenciación de segunda generación (NGS, por sus siglas en inglés) es un tipo de secuenciación masiva paralela del ADN. Para el estudio de levaduras se usan el gen 26S rRNA y las regiones ITS (Geronikou et al., 2020).

Ceugniez et al. (2017) y Dimov et al. (2021) se basan en la región ITS2 para el estudio de levaduras presentes en el queso francés Tomme d'Orchies y el queso verde de Cherni Vit respectivamente. Se extrae el ADN y llevan a cabo la secuenciación con el sistema de lecturas emparejadas Illumina HiSeq 2 × 250 bp; usando para la amplificación y generación de clústers a los oligonucleótidos ITS3KYO2 (5'- GATGAAGAACGYAGYRAA-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para el estudio del queso francés (Ceugniez et al., 2017) y los oligonucleótidos ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') y el ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para el estudio del queso de Cherni Vit (Dimov et al., 2021).

La secuenciación por medio del sistema Illumina consiste en la amplificación de los fragmentos de ADN para la formación de un clúster, mediante el método de PCR en puente y la detección de bases en cada secuenciación se lleva a cabo a través de etiquetas fluorescentes.

Dentro de las ventajas de este método está el permitir realizar el análisis en menor cantidad de tiempo y un menor costo por base debido a su secuenciación masiva de fragmentos de ADN, aunque la cobertura de las lecturas de un mismo fragmento es menor. Esto se refiere a que el porcentaje de las bases de la ADN de referencia que está siendo secuenciado es menor (Rubio et al., 2020).

#### 8.4. TGS

La Secuenciación de Tercera Generación (TGS, por sus siglas en inglés) permite secuenciar el ADN de manera individual y obtener secuencias de mayor longitud, sin la necesidad de amplificar los fragmentos de ADN, lo que reduce el tiempo de trabajo y disminuye el costo de la secuenciación (Brancaccio et al., 2021).

Esta secuenciación del ADN puede lograrse por dos metodologías. La primera por una síntesis acoplada a fluoróforo que consiste en un chip con miles de nanoporos por donde atraviesa la luz y se introduce e inmoviliza un complejo de ADN polimerasa. Nucleótidos unidos a fluoróforos son introducidos y su unión al complejo de ADN polimerasa libera el fluoróforo y produce un pulso de luz que permite obtener la identificación de la secuencia (Rhoads & Au, 2015).

La segunda metodología consiste en una membrana electro-conductora que contiene poros por los que se introduce el ADN. Al cruzar cada nucleótido genera disrupciones de carga eléctrica,

y esto permite la identificación de las bases que conforman el ADN (Oxford Nanopore Technologies, 2023).

Ianni et al. (2020) utilizaron la secuenciación de tercera generación para la identificación de microorganismos presentes en un queso Pecorino. El proceso consiste en extraer el ADN, para posteriormente ser analizado en el secuenciador MinION. El principio de este secuenciador se basa en la segunda metodología.

#### 9. Levaduras aisladas e identificadas en quesos madurados

Como se ha mencionado anteriormente, las levaduras son microorganismos pertenecientes a la microbiota secundaria en la maduración del queso y tienen un papel fundamental en esta etapa del proceso de fabricación. Mediante diferentes métodos de identificación, ya sean dependientes o independientes, es posible determinar las presentes en cada variedad de queso.

En la tabla 5 se muestran las levaduras aisladas en diferentes variedades.

**Tabla 5.** Especies de levaduras aisladas en diferentes quesos madurados.

<b>Levadura (especie)</b>	<b>Queso</b>	<b>Método de identificación</b>	<b>Referencia</b>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Surk	Gen ribosomal 26S	Esen & Çetin, 2021
	Cebreiro	PCR-RFLP Gen ribosomal 26S	Atanassova et al., 2016
	Queso verde, Cherni Vit	NGS	Dimov et al., 2021
	Fossa, pecorino	PCR-DGGE	Biagiotti et al., 2018
	Cabrales	Pruebas bioquímicas PCR-RFLP	Álvarez-Martín et al., 2007
	Fiore Sardo	Pruebas bioquímicas	Pisano et al., 2006
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Surk	Gen ribosomal 26S	Esen & Çetin, 2021
	Tetilla, Cebreiro y Arzúa Ulloa (Galicia)	PCR-RFLP Gen ribosomal 26S	Atanassova et al., 2016
	Queso verde, Cherni Vit	NGS	Dimov et al., 2021
	Cabrales	Pruebas bioquímicas PCR-RFLP	Álvarez-Martín et al., 2007
	Cotija	PCR-DGGE	Chombo-Morales et al., 2016
	Fiore Sardo	Pruebas bioquímicas	Pisano et al., 2006
	Bryndza	PCR-DGGE	Sádecká et al., 2016
<i>Candida zeylanoides</i>	Surk	Gen ribosomal 26S	Esen & Çetin, 2021
	Queso verde, Cherni Vit	NGS	Dimov et al., 2021
	Fossa, pecorino	PCR-DGGE	Biagiotti et al., 2018
	Cotija	PCR-DGGE PCR-RFLP	Martínez Fernández, 2009

<b>Levadura (especie)</b>	<b>Queso</b>	<b>Método de identificación</b>	<b>Referencia</b>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Surk	Gen ribosomal 26S	Esen & Çetin, 2021
	Tetilla, Cebreiro y Arzúa Ulloa (Galicia)	PCR-RFLP Gen ribosomal 26S	Atanassova et al., 2016
	Tomme d'Orchies	NGS	Ceugniez et al., 2017
<i>Geotrichum candidum</i>	Fiore Sardo	Pruebas bioquímicas	Pisano et al., 2006
	Bryndza	PCR-DGGE	Sádecká et al., 2016
<i>Pichia fermentans</i>	Cebreiro y Arzúa Ulloa Cabrales (Galicia)	PCR- RFLP Gen ribosomal 26S	Atanassova et al., 2016
	Cabrales	Pruebas bioquímicas PCR-RFLP	Álvarez-Martín et al., 2007
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cebreiro	PCR- RFLP Gen ribosomal 26S	Atanassova et al., 2016
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Tomme d'Orchies	NGS	Ceugniez et al., 2017
<i>Pichia membranifaciens</i>	Queso verde Cherni Vit	NGS	Dimov et al., 2021
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Queso verde Cherni Vit	NGS	Dimov et al., 2021
<i>Wickerhamomyces anomalous</i>	Fossa pecorino	PCR-DGGE	Biagiotti et al., 2018
<i>Candida homilentoma</i>	Fossa pecorino	PCR-DGGE	Biagiotti et al., 2018
<i>Candida etchellsii</i>	Cotija	PCR-DGGE	Chombo-Morales et al., 2016
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Cotija	PCR-DGGE	Chombo-Morales et al., 2016
<i>Candida parapsilosis</i>	Cotija	PCR-DGGE PCR-RFLP	Martínez Fernández, 2009
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Fiore Sardo	Pruebas bioquímicas	Pisano et al., 2006

Acrónimos: PCR-DGGE: Reacción en cadena de la Polimerasa- Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, PCR-RFLP: Reacción en cadena de la Polimerasa-Polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción, NGS: Secuenciación de Segunda Generación

*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida zeylanoides* y *Yarrowia lipolytica* son las principales levaduras encontradas en diversas variedades de queso (Surk, Cabrales, Cebreiro, Tetilla, Queso verde Cherni Vit y Fossa Pecorino) (Figura 3). La levadura *Debaryomyces hansenii* es la predominante en los quesos Fossa Pecorino, Cebreiro (un tipo de queso de Galicia), Surk, Fiore Sardo y Cabrales.

Sin embargo, especies como *Candida etchellsii*, y *Pichia kudriavzevii*; *Wickerhamomyces anomalus* y *Candida homilentoma* fueron específicas de los quesos Cotija y Fossa Pecorino respectivamente (Chombo-Morales et al., 2016; Biagiotti et al., 2018).

Biagiotti et al. (2018) estudiaron el crecimiento de levaduras presentes en el queso Fossa Pecorino antes de la maduración en el pozo y después de la maduración, el cual presentó un aumento de una orden de magnitud en las UFC, que señala cambios en la comunidad microbiana de la superficie del queso durante la maduración; este aumento puede deberse en gran parte a la carga microbiana que aporta el ambiente ya que el pozo en el que se madura el queso está recubierto de madera y paja (ambos portadores de microorganismos).

De manera similar, el queso Cotija estudiado por Chombo-Morales et al. (2016) presentó un aumento del 15 % en el crecimiento de las levaduras para el queso con 8 días de maduración, pero conforme aumentaban los días de madurado las UFC/g disminuyeron.

El queso Fiore Sardo por el contrario presenta una baja población de las levaduras *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* y *Geotrichum candidum* debido a la matriz compacta que presenta, dificultando la difusión del oxígeno molecular necesario para su crecimiento. Además de que este producto es sometido a un ahumado en los primeros días que favorece una rápida reducción de humedad y una estructura compacta (Pisano et al., 2006).

En todas las variedades de queso mostradas el crecimiento de levaduras disminuye conforme avanza el proceso de maduración debido a las condiciones, y durante este tiempo producen metabolitos que contribuyen de forma positiva en el producto lácteo.

## 10. Metodologías analíticas empleadas en el análisis de los metabolitos en quesos

Las levaduras presentes en los quesos tienen enzimas lipolíticas y proteolíticas como la esterasa, lipasa y peptidasa que por su acción forman compuestos como péptidos de cadena corta, aminoácidos y compuestos volátiles que contribuyen al desarrollo del sabor y aroma del producto lácteo (Fox et al., 2004). Además, estos microorganismos son capaces de metabolizar el ácido láctico producido por la fermentación de lactosa de bacterias ácido-lácticas.

El análisis de los compuestos volátiles formados en el queso consiste en un proceso conformado por técnicas de extracción, separación cromatográfica e identificación del compuesto.

### 10.1. Técnicas de extracción de compuestos volátiles

Debido a la gran variedad de compuestos volátiles involucrados en el sabor y aroma de los quesos se han desarrollado diferentes técnicas de extracción para aislar y concentrar estos compuestos. La técnica de extracción va a influir en el tipo de compuestos extraídos y la pureza de estos, por lo cual su selección adecuada es importante. Para el análisis de productos lácteos como los quesos las más utilizadas son destilación, microextracción en fase sólida, desorción térmica, purga y trampa y extracción con barra de agitación (Bertuzzi et al., 2018) (Tabla 6).

En el análisis de los quesos Tilsit y el oveja de barril, producto intermediario del queso Bryndza, se utilizó la microextracción en fase sólida y posteriormente los compuestos extraídos fueron analizados por cromatografía de gases (Fuchsmann et al., 2015; Sádecká et al., 2016).

**Tabla 6.** Técnicas de extracción para el análisis de volátiles en alimentos y productos lácteos.

<b>Técnica de extracción</b>	<b>Muestra colocada en</b>	<b>Principio</b>
Destilación	Matraz	Matraz al vacío para liberar volátiles
Microextracción fase sólida	Vial sellado	Fase de fibra de sílice revestida, expuesta a la fase líquida o al espacio de cabeza
Barra de agitación	Vial sellado	Barra de agitación magnética recubierta, en contacto con la fase líquida
Purga y trampa	Rociador en forma de “U”	Gas inerte se purga a través de rociador en “U”
Extracción dinámica de fase sólida	Vial sellado	Jeringa con la aguja recubierta succiona los volátiles del espacio de cabeza
Extracción en tubo	Vial sellado	Jeringa con aguja y trampa arriba succiona los volátiles del espacio de cabeza

Fuente: Bertuzzi et al., 2018.

Dentro de las dos técnicas principales para el estudio de quesos, la técnica de destilación presenta diversas variantes. Se encuentra la destilación a vacío la cual se realiza a una presión reducida para prevenir la degradación térmica de compuestos volátiles y donde la muestra es mezclada con agua y posteriormente destilada bajo vacío. También se encuentra la destilación realizada directamente en el solvente (ideal para compuestos de baja volatilidad), la cual es más rápida que la destilación tradicional y ha sido empleada para el análisis de los quesos Edam, Parmesano y Pecorino (Bertuzzi et al., 2018).

La microextracción de fase sólida en espacio de cabeza (HS- SPME, por sus siglas en inglés) consiste en calentar la muestra de queso, colocada en un vial, por un tiempo específico para permitir que los compuestos volátiles saturen el espacio de cabeza. Seguido de esto, se introduce una fibra revestida en el vial por un tiempo determinado y a una temperatura específica para permitir la captura de los compuestos. El tipo de fibra utilizado es el factor principal que influye en la eficiencia y discriminación de la extracción.

Esta técnica de extracción permite la detección de compuestos azufrados en bajas concentraciones presentes en los quesos como el Tilsit y no requiere solventes para el análisis.

Sin embargo, la desventaja de este método es la limitada capacidad de la fibra, ya que la cantidad de recubrimiento es poca (Fuchsmann et al., 2015; Bertuzzi et al., 2018).

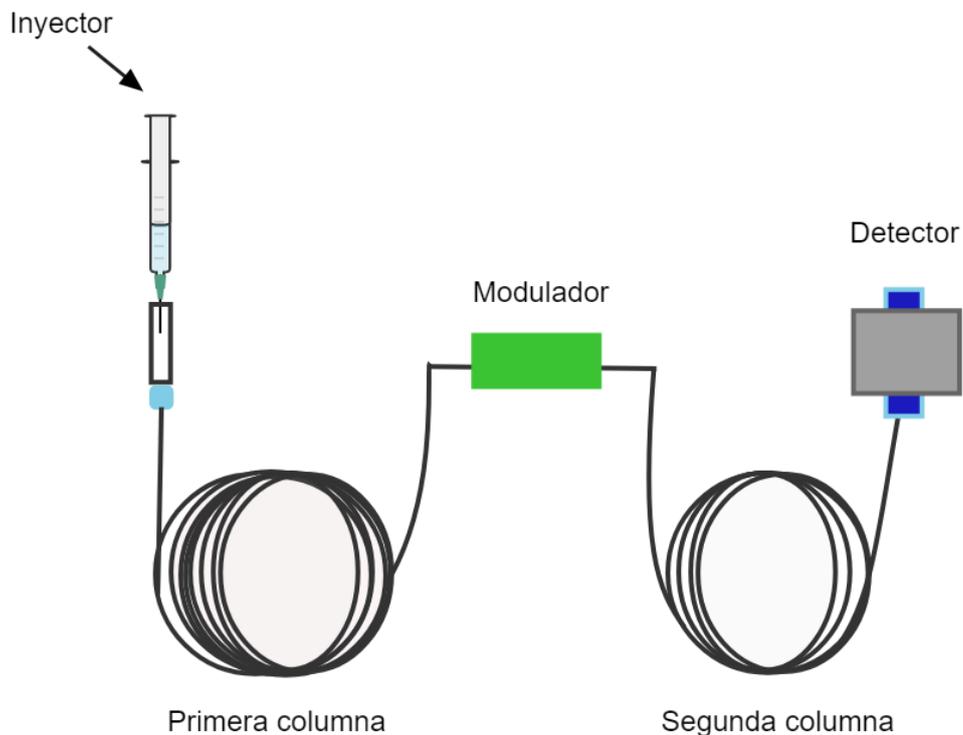
## 10.2. Separación cromatográfica

Una vez extraídos los compuestos son analizados. La cromatografía de gases es la más utilizada para esta etapa y requiere de una fase móvil (gas inerte como helio, argón, hidrógeno o nitrógeno) que acarrea el compuesto extraído a través de una columna.

Dentro de la columna los compuestos volátiles presentan interacciones electrostáticas con la fase estacionaria de acuerdo con la polaridad de los compuestos. Dependiendo de los analitos de interés la columna puede tener fase estacionaria polar, no polar o intermedia, esta última permite una detección de mayor variedad de compuestos polares y no polares (Bertuzzi et al., 2018).

Sin embargo, muchos analitos son similares estructuralmente y pueden coeluir dificultando su identificación. Para este caso existe la cromatografía de dos dimensiones que consiste en pasar completa o parcialmente al analito de la primera columna a una segunda de menor longitud y diferente polaridad mediante un modulador térmico y posteriormente llegar al detector (Figura 4).

Gogus, Ozel, & Lewis (2006) analizaron mediante cromatografía de dos dimensiones, con una columna no polar seguida de una columna con polaridad intermedia, los componentes volátiles presentes en el queso Cheddar con diferente tiempo de maduración. Identificando hexanal, etil-lactato, 3-octanol y octano, compuestos coeluidos en su separación cromatográfica de una dimensión.



**Figura 4.** Diagrama de cromatografía de dos dimensiones. Fuente: Elaboración propia con información de Bertuzzi et al., 2018.

### 10.3. Sistema de detección de compuestos volátiles presentes en quesos

Una vez llevada a cabo la separación de compuestos mediante cromatografía, se realiza la identificación y cuantificación de los analitos. En el estudio de productos lácteos los sistemas de detección más utilizados son la espectrometría de masas, detector fotométrico de flama pulsada, ionización de flama, detector fotométrico de flama y olfatometría (Bertuzzi et al., 2018).

El detector fotométrico de flama pulsada se diferencia del detector fotométrico de flama por la continuidad; el primero permite identificar compuestos con azufre y fósforo ya que estos presentan una demora en su emisión de flama. Es más selectivo a estos compuestos y por eso se prefiere para análisis de compuestos azufrados que son los principales contribuyentes al aroma de quesos madurados como el Swiss Tilsit con compuestos como el metanotiol, dimetil trisulfuro, bis (metiltio) metano y dimetil disulfuro (Fuchsmann et al., 2015).

Con lo que respecta a la espectrometría de masas el principio se basa en la ionización de las moléculas, donde los iones obtenidos se separan de acuerdo con su masa y su carga; cada

muestra analizada con cromatografía de gases-espectrometría de masas genera un espectro de masas donde se tabula la abundancia de los iones. La calidad del espectro facilita la identificación de todos los compuestos volátiles que se encuentran en la muestra, ya que se compara con espectros de referencia.

Con lo que respecta a la olfatometría (cromatografía de gases-olfatometría), el gas al final de la columna de CG se divide en dos flujos, uno pasa a un olfatómetro donde un panelista puede dar información sobre la presencia de un aroma y el otro a un detector (por lo general de masas). De esta manera se relacionan el espectro y percepciones sensoriales del panelista (Bertuzzi et al., 2018). Se utiliza como método de confirmación para los resultados obtenidos por otros métodos como detección fotométrica de flama pulsada (Fuchsmann et al., 2015) o espectrometría de masas (Sádecká et al., 2016).

## 11. Metabolitos producidos por las levaduras en quesos

Algunos de los compuestos volátiles presentes en los quesos son producidos por las levaduras. Estos microorganismos producen etanol, ácidos grasos de cadena corta, aldehídos, compuestos carbonílicos, ésteres, amoníaco y sus cetoácidos; esto se debe a la actividad enzimática que presentan y dichos compuestos son aportadores determinantes para el sabor y aroma de los quesos.

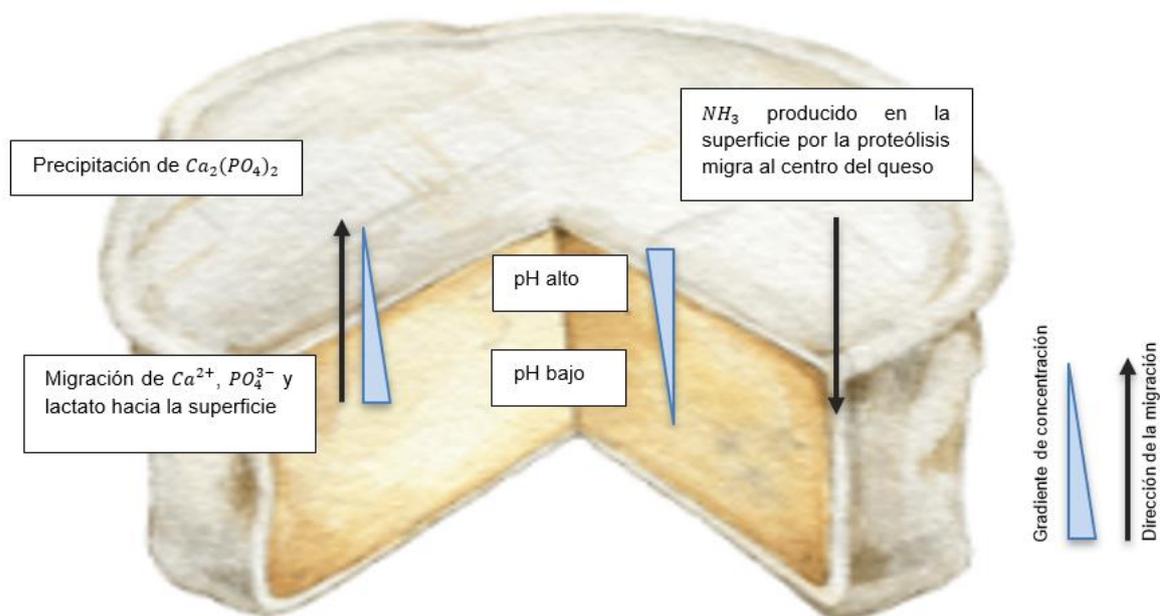
Dependiendo de la variedad de queso y la microbiota presente se desarrollarán diferentes compuestos volátiles y no volátiles derivados principalmente de la proteólisis, conversión de aminoácidos, lipólisis y metabolismo de lactato (Yvon & Rijnen, 2001).

### 11.1. Metabolismo del ácido láctico y del lactato

El metabolismo del ácido láctico llevado a cabo por bacterias ácido-lácticas genera lactato, sustrato de gran importancia para reacciones que ocurren durante la maduración.

*Geotrichum candidum* metaboliza el lactato a dióxido de carbono y agua en los quesos de pasta blanda como el Camembert y Brie (McSweeney, 2004). La textura de estos quesos se debe en parte al aumento de pH causado por el metabolismo del compuesto y por la formación de amoníaco en la superficie (debido a la proteólisis), lo que ocasiona la precipitación del fosfato

de calcio y se genera un gradiente del centro a la superficie y una migración del compuesto. La reducción del fosfato de calcio en el centro del producto, junto con el aumento de pH y la proteólisis generan que el interior del queso se ablande (característica de estas variedades de quesos) (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema de los cambios que ocurren durante la maduración del queso Camembert. Fuente: Elaboración propia con información de McSweeney, 2004

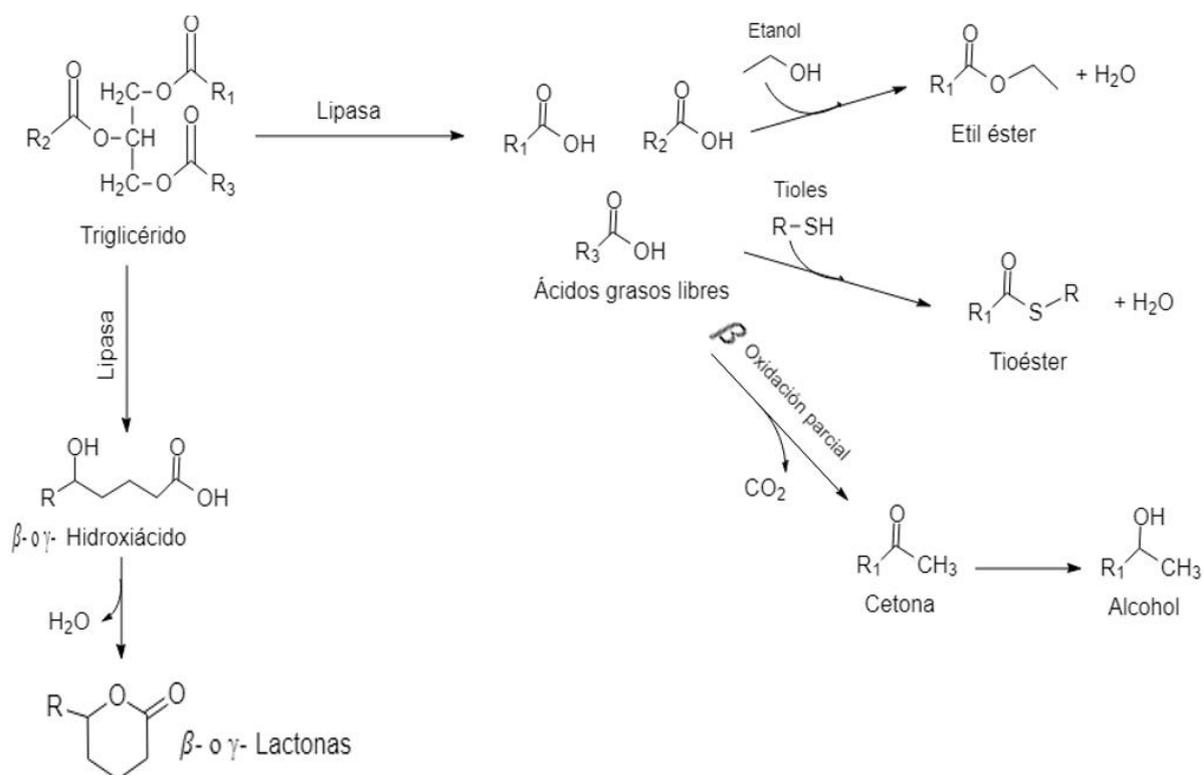
## 11.2. Lipólisis

Los triglicéridos presentes en los quesos son sustrato de las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por las lipasas, enzimas que pueden provenir de la leche, de coagulantes como el cuajo, de cultivos iniciadores o ser exógenas (McSweeney, 2004; Zheng, Shi, & Wang, 2021). Como producto de la reacción de hidrólisis se liberan ácidos grasos que contribuyen significativamente al sabor del queso, además de ser precursores de compuestos volátiles que igualmente aportan al sabor (Figura 6).

La leche tiene una lipoproteína endógena llamada lipoproteína lipasa (LPL) que está presente como homodímero. Esta enzima en las condiciones óptimas puede causar la rancidez de la leche

en periodos cortos de tiempo y tiene preferencia por los triglicéridos que contienen ácidos grasos de cadena media (C6-C12), actuando preferentemente en las posiciones sn1 y sn3. Los quesos elaborados con leche bronca presentan una mayor actividad de esta enzima, ya que para los quesos elaborados con leche pasteurizada la lipoproteína lipasa es inactivada durante la pasteurización (se requiere aplicar un proceso térmico de 78 °C por 10 s para inactivar completamente a la enzima) (Zheng, Shi, & Wang, 2021).

Los ácidos grasos pueden ser sustrato de diferentes rutas para la producción de compuestos impartidores del sabor. Por ejemplo, la formación de ésteres proviene de la reacción de esterificación entre el ácido graso libre y un alcohol; el etanol es el alcohol presente en mayor proporción debido a la fermentación de lactosa y el catabolismo de aminoácidos por lo que predominarán etil ésteres en los quesos, aunque también puede haber presencia de metil- propil- y butil- ésteres.



**Figura 6.** Rutas de formación de compuestos aportadores de sabor a partir de ácidos grasos durante la maduración de quesos. Fuente: Elaboración propia a partir de información de McSweeney, 2004

Para la formación de tioésteres reacciona el ácido graso con compuestos sulfhidrilo como el metanotiol proveniente del catabolismo de la metionina. Estos tioésteres impartirán sabores y aromas relacionados al ajo y huevo.

Otra ruta para producir compuestos que influyen en el sabor es la formación de lactonas que requieren como sustrato delta o gamma-hidroxiácidos y que se esterifican intramolecularmente para formar delta o gamma-lactonas con anillos de 5 a 6 átomos de carbono. La formación de estos compuestos está limitada por la cantidad de hidroxiácidos presente (McSweeney, 2004; Zheng, Shi, & Wang, 2021).

Finalmente, la ruta de beta-oxidación seguida de la descarboxilación de los ácidos grasos en algunos quesos como el azul forma cetonas (como la heptanona) y alcoholes.

Referente a los microorganismos presentes en la elaboración de quesos, la esterasa de las bacterias ácido-lácticas es activa para mono acilglicéridos menores de C18 y a pH entre 7 y 8.5; es una enzima intracelular por lo que se libera en la matriz del queso cuando hay lisis y causa la liberación de ácidos grasos en el queso durante la maduración (McSweeney, 2004).

*Debaryomyces hansenii* presenta actividad lipolítica, aunque es baja en comparación con *Y. lipolytica* y otras levaduras; por lo que no contribuye significativamente en la producción de ácidos grasos pero si produce compuestos volátiles como aldehídos y alcoholes (Bertuzzi et al., 2017; Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019).

*Y. lipolytica* presenta una de las mayores actividades lipolíticas además de su actividad proteolítica, influyendo considerablemente en la maduración de este producto lácteo. Es capaz de producir compuestos volátiles como ácidos orgánicos, furanos, cetonas de cadena corta y compuestos azufrados. Por ejemplo, el metanotiol que puede ser sustrato junto con los ácidos grasos producidos para la formación de tioésteres. Esta levadura produce aromas con notas rancias, butíricas y azufradas debido a los compuestos formados en la lipólisis y posterior hidrólisis de los ácidos grasos presentes en la leche (Atanassova et al., 2016).

*G. candidum* presenta una lipasa extracelular, aunque la expresión de genes de esta enzima es baja a comparación de otras enzimas que presenta y que están involucradas con diferentes rutas metabólicas como la proteólisis (Lessard et al., 2014).

### 11.3. Proteólisis

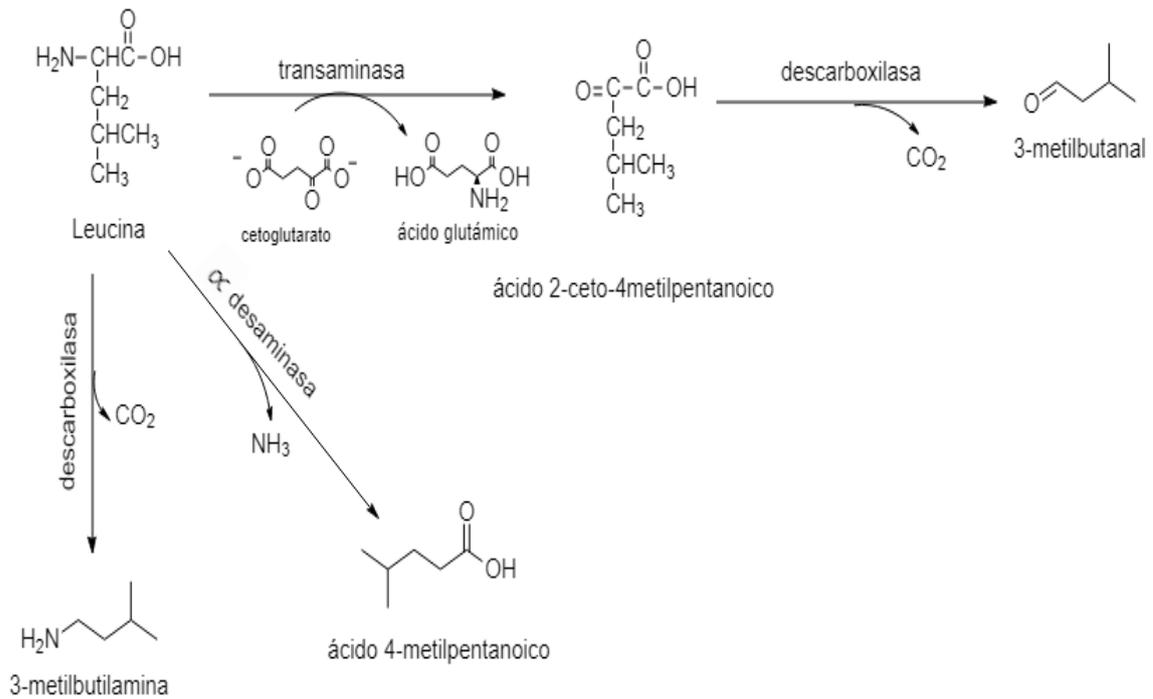
La hidrólisis de las proteínas es una reacción bioquímica crucial para la formación de compuestos que impartirán sabor al queso porque los péptidos y aminoácidos obtenidos por acción de las proteasas son los sustratos de reacciones subsecuentes que producirán compuestos impartidores de sabor.

La principal proteína de la leche es la caseína y su hidrólisis es la ruta principal para la obtención de estos compuestos además de que contribuye para una textura más suave (McSweeney, 2004; Zheng, Shi, & Wang, 2021). La caseína puede ser hidrolizada por enzimas provenientes de la leche como la plasmina, por coagulantes añadidos, enzimas de bacterias ácido y no ácido lácticas y por enzimas de microbiota secundaria como las levaduras.

Una vez ocurrida la hidrólisis mediante la acción de las enzimas transaminasa, descarboxilasa, desaminasa y otras, los aminoácidos son transformados en compuestos volátiles y no volátiles que influyen en el sabor del queso como los aldehídos, cetonas y alcoholes (Zheng, Shi, & Wang, 2021).

Dentro de las levaduras presentes en los quesos, *G. candidum* metaboliza isoleucina, leucina, valina y fenilalanina para producir alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos y amoníaco mediante reacciones de transaminación, descarboxilación y desaminación (Figura 7). El amoníaco producido se distribuye hacia el centro del queso y genera también un aumento de pH (Yvon & Rijnen, 2001; Bertuzzi et al., 2018). La desacidificación del producto lácteo permite el crecimiento de bacterias Gram positivas halotolerantes pero sensibles a la acidez, creando un biofilm formado por bacterias y hongos conocido como “corteza del queso” y que confiere características típicas a cada variedad (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019).

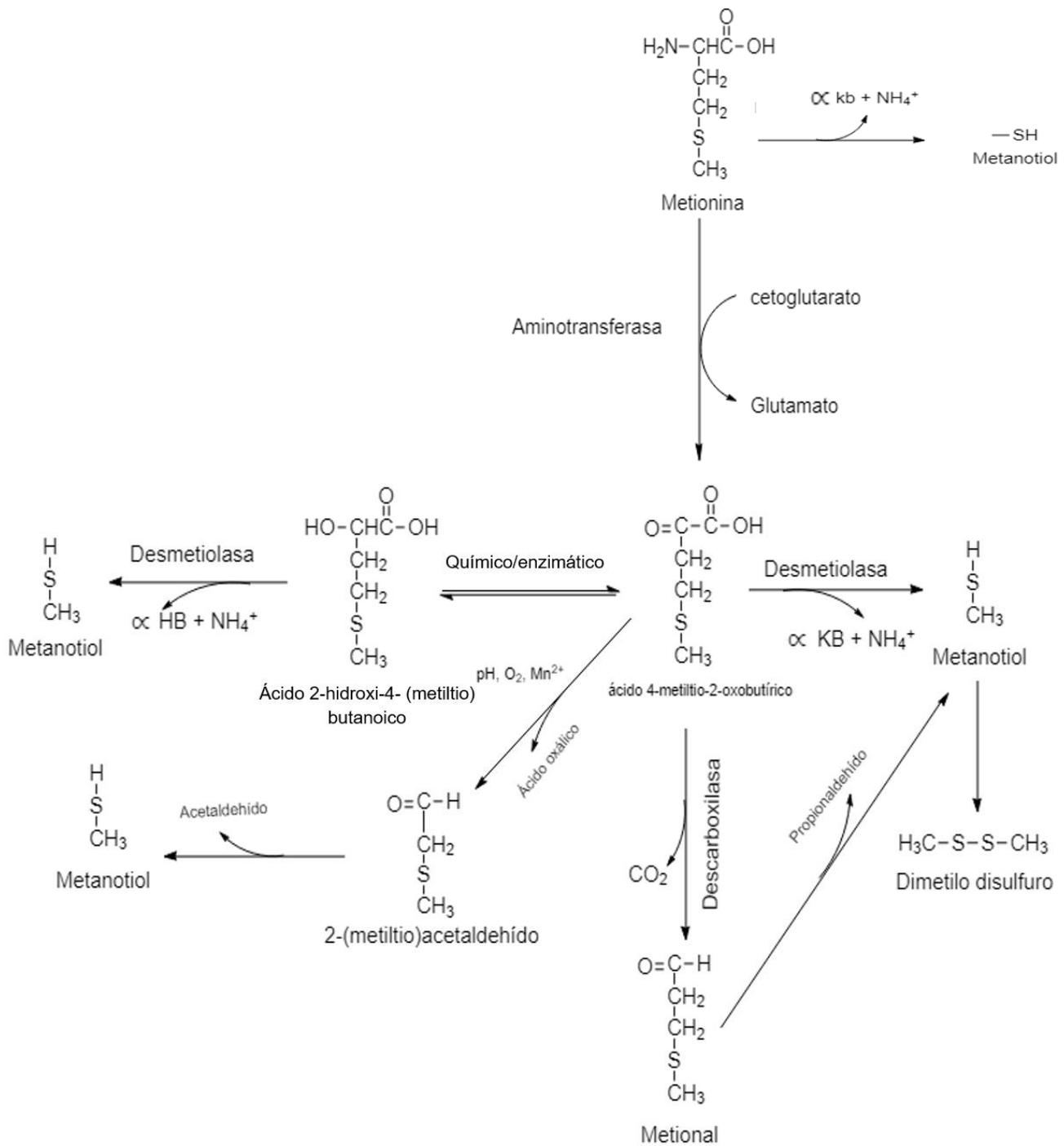
Además, Lessard et al. (2014) señalan que *G. candidum* presenta la enzima cistationina-gamma-liasa relacionada con la producción de metanotiol y dimetilsulfuro, compuestos que confieren un aroma azufrado y a coliflor en los quesos tipo Camembert. Estos compuestos azufrados pueden provenir de dos vías: por reacción de eliminación (donde está involucrada la enzima cistationina-gamma-liasa) o por transaminación (vía Ehlrich) de la metionina.



**Figura 7.** Rutas del catabolismo de leucina para formación de compuestos volátiles. Rutas similares de catabolismo se pueden aplicar a otros aminoácidos de cadena ramificada como isoleucina y valina. Fuente: Elaboración propia con información de McSweeney, 2004.

*Debaryomyces hansenii* presenta actividad proteolítica y también lipolítica, aunque su intensidad varía de acuerdo con la cepa por lo que su influencia sobre la textura y sabor del queso es diversa (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019). Su enzima peptidasa presenta actividad y produce aminoácidos libres (precursores de compuestos relacionados con el sabor) y amoníaco a través de la proteólisis de beta-caseína durante la maduración del queso; específicamente valina, prolina, leucina, lisina y glutamato (Unno et al., 2021).

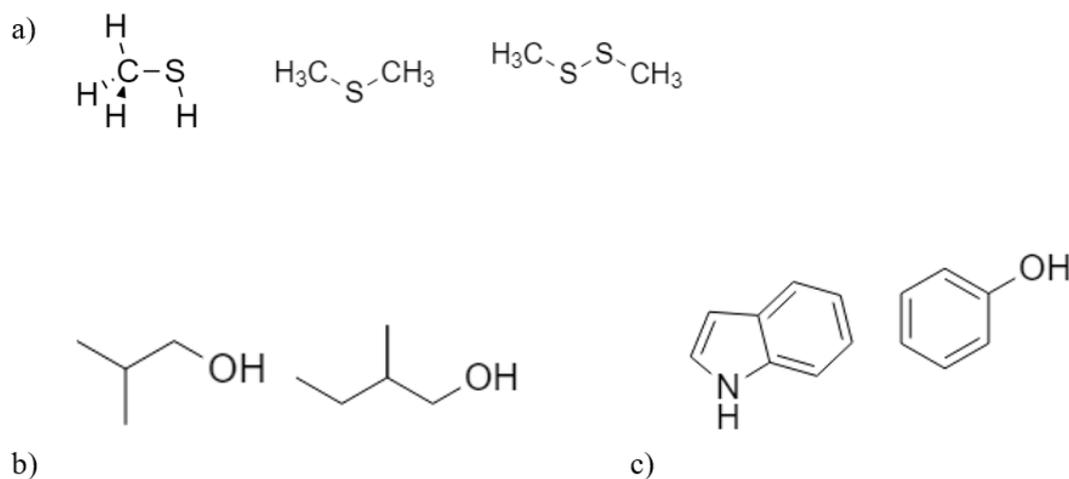
Atanassova et al. (2016) señalan que el catabolismo de L-metionina por parte de *Yarrowia lipolytica* genera amoníaco que es el principal contribuidor del aumento de pH en el queso Arzúa-Ulloa (en lugar del metabolismo del lactato), ya que *Y. lipolytica* degrada este compuesto una vez agotado los aminoácidos (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019). El catabolismo de este aminoácido también lleva a la formación de compuestos azufrados como metanotiol y sus compuestos oxidados dimetil disulfuro y dimetilsulfuro (Figura 8); los tres compuestos principales para el desarrollo del aroma a ajo presente en quesos como el Cheddar (Yvon & Rijnen, 2001).



**Figura 8.** Rutas del catabolismo de metionina para la formación de compuestos volátiles azufrados. Donde Akb: ácido  $\alpha$ -ceto butírico, Ahb: ácido  $\alpha$ -hidroxibutírico. Fuente: Elaboración propia con información de Landaud, Helinck, & Bonnarme, 2008.

Algunas cepas de *Yarrowia lipolytica* también tienen la enzima tirosinasa la cual es responsable de pigmentos marrones llamados piomelanina en la superficie de algunas variedades de quesos que causa el rechazo por parte de los consumidores (Groenewald et al., 2014).

Algunas levaduras producen compuestos aromáticos como indol y fenol a través de la ruptura de la cadena lateral de aminoácidos aromáticos mediante liasas. Aunque también pueden producir aldehídos a partir de la descarboxilación de alfa-cetoácidos, y dichos compuestos pueden ser reducidos a alcoholes por enzimas alcohol-deshidrogenasas, como 2-metil-1-propanol y 2-metil-1-butanol (Yvon & Rijnen, 2001) (Figura 9).



**Figura 9.** Compuestos producidos por el metabolismo de levaduras. A) Compuestos azufrados metanotiol, dimetilsulfuro y dimetil disulfuro b) Compuestos aromáticos indol y fenol c) 2-metil-1-propanol y 2-metil-1-butanol. Fuente: Elaboración propia con información de Yvon & Rijnen, 2001.

## 12. Aminas Biogénicas

Las aminas biogénicas son compuestos orgánicos y nitrogenados de bajo peso molecular producidos por el metabolismo endógeno o de microorganismos presentes en alimentos fermentados vegetales y animales como el vino, quesos, salsa de soya, embutidos, y en alimentos que contienen sangre y vísceras como la carne y el pescado (Doeun, Davaatseren, &

Chung, 2017). Su importancia deriva de su potencial toxicidad para la salud y por ser indicadores de la calidad alimentaria.

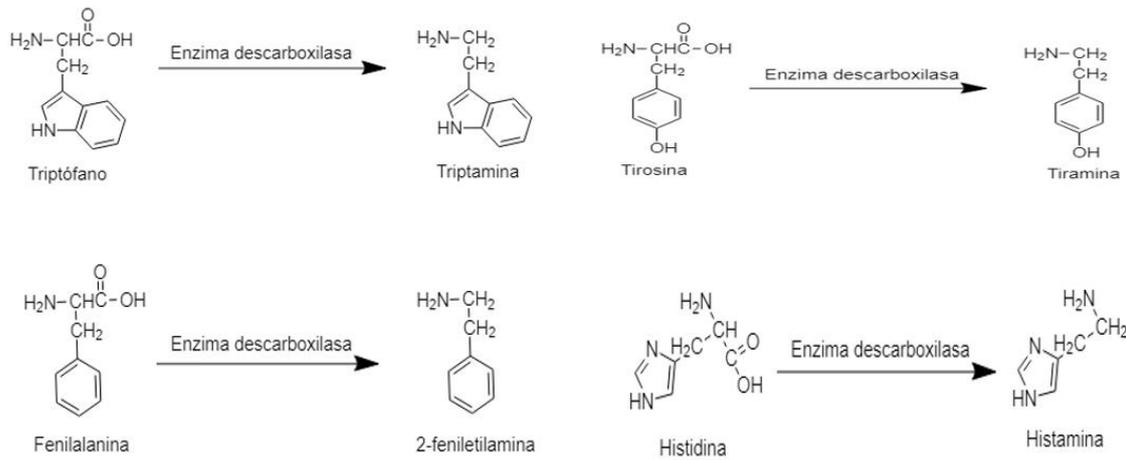
Se forman como resultado de la descarboxilación de los aminoácidos por medio de bacterias y levaduras presentes en los alimentos; ya sea que estén presentes como microorganismos utilizados para la fermentación o por contaminación del producto. Principalmente se forman en condiciones de temperatura superiores a 19 °C, aunque también puede presentarse a temperaturas de refrigeración (González, 2013).

La actividad y expresión de la enzima amino descarboxilasa depende de diferentes condiciones como el pH (óptimo alrededor de 5.5), la disponibilidad de los aminoácidos, presencia de carbohidratos fermentables, presencia de fosfato de piridoxal (cofactor de la reacción de descarboxilación) y temperatura de maduración. En el caso de los quesos, se reúnen las condiciones necesarias para su actividad ya que debido a la fermentación de lactosa y metabolismo del lactato se producen carbohidratos fermentables, además se genera la condición de un pH ligeramente ácido al inicio de la maduración y por acción de la proteólisis los aminoácidos están disponibles.

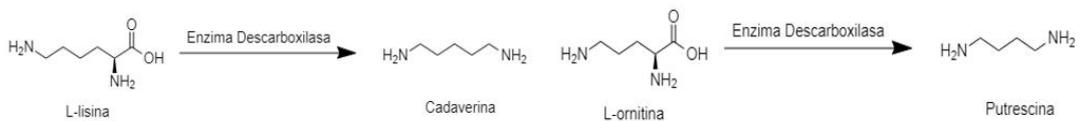
También existen factores de producción que influyen en la formación de aminas biogénicas como el tipo de leche y su tratamiento (si es cruda o pasteurizada), los cultivos iniciadores, tiempo de maduración y condiciones de almacenamiento (González, 2013).

Los aminoácidos tirosina, histidina, triptófano y fenilalanina por acción de la enzima descarboxilasa generan las monoaminas tiramina, histamina, triptamina y 2-feniletilamina; mientras que los aminoácidos lisina y ornitina generan las diaminas cadaverina y putrescina. El nivel de toxicidad de las aminas biogénicas depende de la cantidad ingerida y la sensibilidad de la persona, causando desde vómito, dolor abdominal, dolor de cabeza hasta problemas más severos de salud (Doeun, Davaatseren, & Chung, 2017) (Figura 10).

a)



b)



**Figura 10.** Formación de aminas biogénicas por enzimas descarboxilasas. A) formación de monoaminas (triptamina, tiramina, 2-feniletilamina e histamina). B) formación de diaminas (cadaverina y putrescina). Fuente: Elaboración propia

*Y. lipolytica* es la levadura con mayor potencial para la producción de aminas biogénicas incluidas la cadaverina, putrescina, tiramina y 2-feniletilamina. Mientras que ciertas cepas de *D. hansenii*, *Y. lipolytica* y *G. candidum* son capaces de su degradación (Bäumlisberger et al., 2015).

Atanassova et al. (2016) identificaron que las levaduras *D. hansenii*, *P. guilliermondii*, *P. fermentans* y *S. cerevisiae* presentes en tres variedades de quesos en Galicia (Cebreiro, Arzúa Ullóa y Tetilla) producen la amina triptamina. También *P. guilliermondii* y *P. fermentans* producen en conjunto con *Y. lipolytica* y *K. lactis* la tiramina; con *K. lactis* y *Y. lipolytica* produciendo la máxima cantidad de esta amina (205 mg/L y 198 mg/L respectivamente).

Debido a que la producción y/o degradación de estas aminas es dependiente de la cepa presente, es importante un estudio de la matriz alimentaria y la determinación de su microbiota para mantener los niveles de aminas biogénicas dentro de los límites.

### 13. Actividad probiótica de las levaduras

De acuerdo con la FAO (Food Agricultural Organization, por sus siglas en inglés), OMS (Organización Mundial de la Salud) y reforzado por un consenso internacional de científicos en 2014 (Hill et al., 2014) los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas como parte de un alimento, confieren al huésped un beneficio para la salud.

Presentan una serie de características como tolerancia a un pH ácido, a enzimas digestivas, adhesión a la pared intestinal, actividad antimutagénica y anticarcinogénica, estimulación del sistema inmune sin efectos inflamatorios; además de ser antioxidantes, conservar la estabilidad de la mucosa, producir vitaminas y enzimas, mejorar la motilidad intestinal, entre otras (Tamang & Lama, 2022).

Los probióticos que son administrados oralmente pasan por un estrés debido a las condiciones que se encuentran en el tracto gastrointestinal por lo que deben de presentar una resistencia a Ph ácido y sales biliares para sobrevivir en el intestino, además de previamente haber tolerado las condiciones en las que se encuentran en los productos lácteos fermentados como el queso (estrés por el oxígeno, temperatura y condiciones de almacenamiento).

De acuerdo con el estudio realizado por Tamang & Lama (2022), *W. anomalus*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* son levaduras con propiedades probióticas *in vitro* deseables como la auto-agregación, co-agregación y falta de actividad hemolítica. Los quesos como el Surk, Cebreiro, Tetilla, Tomme d'Orchies, Fossa Pecorino y Fiore Sardo, son ejemplos donde se encuentran dichas levaduras.

Por otro lado, Karasu-Yalcin, Senses-Ergul, & Ozbas (2019) estudiaron las propiedades probióticas: tolerancia a sales biliares e inhibición de algunas bacterias patógenas por parte de levaduras presentes en el queso Mihalic de Turquía. La cepa más resistente a las sales biliares fue *Candida inconspicua*, seguida de *Candida tropicalis*; mientras que las levaduras con actividad antimicrobiana registradas en el estudio fueron *C. catenulata* (inhibición de *S. aureus* e inhibición débil de *E. coli* y *L. monocytogenes*), *G. silvicola* con inhibición de *S. aureus* y *L. monocytogenes*; y *C. guilliermondii* con inhibición de *S. aureus*.

El conocer las propiedades probióticas y tecnológicas de las levaduras permite que la elección de cultivos iniciadores para la elaboración de quesos sea sustentada; sin embargo, también debe tomarse en cuenta la interacción que tendrán con otros microorganismos y cómo esto afecta al producto.

#### 14. Interacción de microorganismos y producción de metabolitos

Debido a que el queso presenta una gran diversidad microbiana es importante estudiar las interacciones entre las especies presentes y su efecto en el producto, ya que puede repercutir de manera positiva o negativa.

Las levaduras están estrechamente relacionadas con las bacterias ácido-lácticas durante la maduración del queso. Las bacterias metabolizan la lactosa en el ácido láctico disminuyendo el pH y posteriormente produciendo lactato que es utilizado por las levaduras para la formación de nuevos productos debido a su metabolismo (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019).

Este beneficio por parte de las levaduras sin afectar a las bacterias ácido-lácticas es dado por una interacción llamada comensalismo químico, donde las bacterias ácido-lácticas metabolizan un compuesto no útil para las levaduras, pero producen un metabolito (lactato) que será fuente de energía para este microorganismo (Veiga, 2016).

Además, el aumento de pH esta vez ocasionado por el metabolismo del lactato y la producción de factores de crecimiento (aminoácidos y vitaminas como niacina y riboflavina) por parte de las levaduras favorece el crecimiento de bacterias Gram positivas no tolerantes a la acidez como *Staphylococcus spp.* y *Brevibacterium spp.* en la superficie del producto lácteo, generando una interacción más compleja (Bertuzzi et al., 2017).

Algunas especies como *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides* presentan actividades antifúngicas y/o antimicrobianas (Biagiotti et al., 2018; Esen & Çetin, 2021) lo cual es un factor para la inocuidad alimentaria del producto. En el caso de *Geotrichum candidum*, Fox et al. (2004) reportan que con la producción de los ácidos D-3 feniláctico y D-3 indoláctico se inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, bacilo Gram positivo causante de la listeriosis; además *G. candidum* tiene la habilidad de inhibir el crecimiento de *Mucor spp.*, hongo que produce un defecto en quesos llamado “pelo de gato” por el crecimiento de un micelio color negro en la superficie.

Por otro lado, *K. lactis* co-cultivado con bacterias en un modelo de fermento láctico desarrolla fuertes notas aromáticas frutales, atribuidas a la gran concentración de etil ésteres y alcoholes.

Mientras que su interacción con *P. roqueforti*, de acuerdo al estudio realizado por Price et al. (2014) en el queso Stilton de Denominación de Origen Protegido (DOP), demuestra que una elevada concentración de la levadura disminuye la cantidad de cetonas derivadas de *P. roqueforti* presentes en el queso, pero aumenta la concentración de éster etílico del ácido 2-metilpropanoico (compuesto que imparte aromas frutales y en elevadas concentraciones puede perjudicar el perfil aromático del queso Stilton).

En el caso de las aminas biogénicas que pueden ser producidas por algunas levaduras, especies de bacterias corineformes como *B. linens* (que posee actividad desaminasa) metabolizan las aminas degradándolas (Fox et al., 2004).

Referente a la interacción levadura-levadura, *D. hansenii* y *Y. lipolytica* pueden dominar la biota superficial de quesos madurados (Atanassova et al., 2016), aunque en ciertas condiciones *Y. lipolytica* puede presentar mayor crecimiento que *D. hansenii*; esto puede ocurrir si ésta última no se favorece en las primeras etapas de maduración de su rápida asimilación de lactosa, lactato y su halotolerancia (Fröhlich-Wyder, Arias-Roth, & Jakob, 2019).

## 15. Discusión

Para el estudio de las levaduras presentes en los quesos se han utilizado diferentes métodos: entre los dependientes de cultivo, el método de identificación empleando el gen ribosomal 26S es el seleccionado por diversos autores (Atanassova et al., 2016; Biagiotti et al., 2018) para obtener certeza de los resultados obtenidos mediante otros métodos como PCR-RAPD y PCR-RFLP; ya que el gen 26S RNA ha evolucionado lentamente y el estudio de su dominio D1/D2 permite hacer relaciones intra- e inter-especie. Sin embargo, la desventaja que presentan los métodos dependientes de cultivo es la dificultad en la identificación de especies que no pueden ser cultivadas con técnicas tradicionales.

Actualmente no sólo se usan los métodos dependientes de cultivo sino también los independientes que se basan en la metagenómica para el análisis e identificación, ya que se extraen los ácidos nucleicos de muchos microorganismos directamente de una muestra. Los más utilizados son: la secuenciación de segunda y tercera generación que se diferencian por la longitud de la secuencia de ADN obtenida porque se obtienen de mayor longitud con la

secuenciación de tercera generación. Ambos métodos permiten realizar el análisis en un menor tiempo y a un menor costo que otros métodos como el de Sanger.

De acuerdo con la literatura, las principales levaduras presentes en diversos quesos madurados son *D. hansenii*, *K. lactis*, *C. zeylanoides* y *Y. lipolytica*. Se ha descrito la presencia de las cuatro especies en el queso Surk (Medio Oriente) (Esen & Çetin , 2021); mientras que para los quesos Fossa Pecorino (Italia) (Biagiotti et al., 2018), Cotija (México) (Álvarez-Martín et al., 2007), Cebreiro y Tetilla de Galicia (España) (Atanassova et al., 2016) Cherni Vit (Bulgaria) (Dimov et al., 2021) sólo algunas de las cuatro especies de levaduras están presentes. Asimismo, estos microorganismos se caracterizan por contribuir en la producción de compuestos de sabor a partir de sus capacidades proteolíticas, peptídicas y lipolíticas; a parte de su capacidad de metabolizar el ácido láctico.

Específicamente *Y. lipolytica* y *D. hansenii* presentan actividad lipolítica y proteolítica. Como resultado de la lipólisis se producen compuestos volátiles como ácidos orgánicos, furanos, compuestos azufrados (*Y. lipolytica*) y aldehídos (*D. hansenii*); como producto de la proteólisis se genera amoníaco que causa un aumento en el pH del queso y provoca diferentes efectos en la textura, así como el favorecimiento del crecimiento de otros microorganismos como bacterias Gram positivas no tolerantes a la acidez.

Este tipo de interacción con otros microorganismos y entre especies es estudiado con el fin de entender sus efectos; algunas levaduras como *D. hansenii* y *C. zeylanoides* han sido descritas por presentar actividades antifúngicas y/o antimicrobianas (Bertuzzi et al., 2018). Por otro lado, se ha registrado que especies de bacterias corineformes como *Brevibacterium linens* presente en algunos quesos como el Limburger poseen actividad desaminasa que permite degradar aminas biogénicas producidas por algunas levaduras como *Y. lipolytica* (Bäumlisberger et al., 2015; Fox et al., 2004).

## 16. Conclusiones

Las levaduras principalmente encontradas en los quesos madurados son *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida zeylanoides* y *Yarrowia lipolytica*. Cada especie presente debido a su actividad metabólica genera compuestos volátiles y no volátiles que afectan el producto lácteo en su perfil sensorial y por lo tanto en la calidad del producto final.

Algunas especies como *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides* presentan propiedades probióticas, por lo que su presencia en los quesos madurados puede significar un beneficio para la salud. Sin embargo, se requiere un mayor conocimiento de las propiedades probióticas de las especies de levaduras presentes en los quesos (como la auto-agregación, adhesión a la pared intestinal, entre otras) y las condiciones que se requieren para que estas sean preservadas durante el proceso de elaboración del queso.

La información analizada demuestra el papel fundamental de las levaduras en los quesos madurados como: su función de disminución de pH en el producto lácteo, la producción de metabolitos que impactan en el sabor y aroma (como ácidos orgánicos y algunos compuestos azufrados como el metanotiol) derivados de la actividad lipolítica y proteolítica que presentan, y el efecto probiótico que representa un beneficio a la salud. Aunque se requiere ahondar en las interacciones complejas de las levaduras con otros microorganismos, ya que igualmente pueden producir efectos benéficos como el efecto antimicrobiano.

## Referencias

1. Alewijn, M., Sliwinski, E., & Wouters, J. (2003). A fast and simple method for quantitative determination of fat-derived medium and low-volatile compounds in cheese. *International Dairy Journal*, 13(9), 733-741. Doi:10.1016/S0958-6946(03)00098-0
2. Álvarez-Martín, P., Flórez, A., López-Díaz, T., & Mayo, B. (2007). Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 17(8), 961-967. Doi:10.1016/j.idairyj.2006.11.005
3. Atanassova, M., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I., Garabal, J., & Centeno, J. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiology*(53), 172-181. Doi:10.1016/j.fm.2015.09.012
4. Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta ed.). México: Pearson. ISBN:970-26-0670-5.
5. Barclay, C. (2023, Marzo 12). *Progressive Gardening*. Recuperado de <https://www.progressivegardening.com/biological-control/methods-for-yeast-identification.html>
6. Bastam, M., Jalili, M., Pakzad, I., Maleki, A., & Ghafourian, S. (2021). Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk. *Veterinary Medicine and Science*, 2445-2449. Doi:10.1002/vms3.604
7. Bäumlisberger, M., Moelleken, U., König, H., & Claus, H. (2015). The potential of the yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to degrade biogenic amines in food. *Microorganisms*, 3(4), 839-850. Doi:10.3390/microorganisms3040839
8. Bautista, M. (2014). *Elaboración de un queso tipo petit – suisse de leche de cabra, adicionado con Lactobacillus casei con probiótico*. Xalapa: Universidad Veracruzana.
9. Bertuzzi, A., Kilcawley, K., Sheehan, J., O'Sullivan, M., Kennedy, D., McSweeney, P., & Rea, M. (2017). Use of smear bacteria and yeasts to modify flavour and appearance of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 72, 44-54. Doi:10.1016/j.idairyj.2017.04.001
10. Bertuzzi, A., McSweeney, P., Rea, M., & Kilcawley, K. (2018). Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-

- Ripened Cheese. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(2), 371-390. Doi:10.1111/1541-4337.12332
11. Biagiotti, C., Ciani, M., Canonico, L., & Comitini, F. (2018). Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. *European Food Research and Technology*, 1921-1931.
  12. Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS microbiology*, 7(4), 447-470. Doi:10.3934/microbiol.2021027
  13. BioMérieux. (2022). *BioMérieux México*. Recuperado el 26 de junio 2023 de <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/apirid32-1>
  14. Brancaccio, R. N., Robitaille, A., Dutta, S., Rollison, D. E., Tommasino, M., & Gheit, T. (2021). MinION nanopore sequencing and assembly of a complete human papillomavirus genome. *Journal of Virological Methods*, 294. Doi:10.1016/j.jviromet.2021.114180
  15. Canva (2023). *Canva*. Recuperado el 12 de junio de 2023, de <https://www.canva.com/>
  16. Ceugniz, A., Taminiou, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., & Drider, D. (2017). Fungal diversity of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. *International journal of food microbiology*, 89-93. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.015
  17. Chombo-Morales, P., Kirchmayr, M., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E., & Villanueva-Rodríguez, S. (2016). Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT – Food Science and Technology*, 65, 1153-1161. Doi:10.1016/j.lwt.2015.09.044
  18. Colabella, C., Corte, L., Roscini, L., Shapaval, V., Kohler, A., Tafintseva, V., . . . Cardinali, G. (2017). Merging FT-IR and NGS for simultaneous phenotypic and genotypic identification of pathogenic *Candida* species. *PloS one*, 12(12). Doi:10.1371/journal.pone.0188104
  19. Dimov, S. G., Gyurova, A., Zagorchev, L., Dimitrov, T., Georgieva-Miteva, D., & Peykov, S. (2021). NGS-Based Metagenomic Study of Four Traditional Bulgarian Green Cheeses from Tcherni Vit. *LWT*. Doi:10.1016/j.lwt.2021.112278.
  20. Doeun, D., Davaatseren, M., & Chung, M.-S. (2017). Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1463-1474. Doi:10.1007/s10068-017-0239-3
  21. Esen, Y., & Çetin, B. (2021). Bacterial and yeast microbial diversity of the ripened traditional middle east surk cheese. *International Dairy Journal*, 117, 1-10. Doi:10.1016/j.idairyj.2021.105004

22. Esteve-Zarzoso , B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S Rna gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International journal of systematic bacteriology*, 49(1), 329-337. Doi:10.1099/00207713-49-1-329
23. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *Milk and Dairy products in human nutrition*. (E. Muehlhoff, A. Bennett, & D. McMahon, Eds.) Roma. Doi:978-92-5-107863-1
24. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2016). Biochemistry of cheese ripening. In *Fundamentals of Cheese Science* (Vol. 2, pp. 391-442). New York: Springer New York, NY. Doi:10.1007/978-1-4899-7681-9
25. Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., & McSweeney, P. (2017). Microbiology of cheese ripening. In *Fundamentals of Cheese Science* (Vol. 2, pp. 333-390). Nueva York: Springer. Doi:10.1007/978-1-4899-7681-9
26. Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., & Guinee, T. (2004). Cheese: An overview. In P. Fox, & P. McSweeney, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Tercera ed., Vol. 1, pp. 2-18). Ireland. Doi:9780080500935
27. Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, 36(3), 129-141. Doi:10.1002/yea.3368
28. Fuchsmann, P., Stern, M. T., Brügger, Y.-A., & Breme, K. (2015). Olfactometry Profiles and Quantitation of Volatile Sulfur Compounds of Swiss Tilsit Cheeses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 7511-7521. Doi:10.1021/acs.jafc.5b02536
29. Geronikou, A., Srimahaeak, T., Rantsiou, K., Triantafillidis, G., Larsen, N., & Jespersen, L. (2020). Occurrence of Yeasts in White-Brined Cheeses: Methodologies for Identification, Spoilage Potential and Good Manufacturing Practices. *Frontiers in microbiology*, 11(522778). Doi:10.3389/fmicb.2020.582778
30. Gogus, F., Ozel, M., & Lewis, A. (2006). Analysis of the volatile components of cheddar cheese by direct thermal desorption-GC x GC-TOF/MS. *Journal of separation science*, 29(9), 1217-1222. Doi:10.1002/jssc.200500400
31. González, M. (2013). *Evaluación del desarrollo de aminos biógenas en queso chihuahua durante la vida de anaquel*. Barcelona: (Tesis de Licenciatura). Universitat Autònoma de Barcelona.
32. Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P., & Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical reviews in microbiology*, 40(3), 187-206. Doi:10.3109/1040841X.2013.770386

33. Hernández, V. (2010). *Composición nutrimental de queso Cotija Región de Origen en función de condiciones de producción y maduración*. Ciudad de México: (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México
34. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., . . . Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506-514. Doi:10.1038/nrgastro.2014.66
35. Ianni, A., Di Domenico, M., Bennato, F., Peserico, A., Martino, C., Rinaldi, A., . . . Martino, G. (2020). Metagenomic and volatile profiles of ripened cheese obtained from dairy ewes fed a dietary hemp seed supplementation. *Journal of dairy science*, 103(7), 5882-5892. Doi:10.3168/jds.2019-17954
36. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2023, marzo). *Encuesta mensual de la industria manufacturera (EMIM). Base 2013- Volumen y valor de ventas por clase de actividad y producto*. Recuperado 23 de abril 2023, de Banco de Información Económica (BIE). INEGI: <https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/?tm=0&ind=651888#tabMCcollapse-Indicadores#D651888>
37. Kalit, S., Tudor Kalit, M., Dolenčić Špehar, I., Salajpal, K., Samaržija, D., Anušić, J., & Rako, A. (2021). The Influence of Milk Standardization on Chemical Composition, Fat and Protein Recovery, Yield and Sensory Properties of Croatian PGI Lički Škripavac Cheese. *Foods*, 10(4). Doi:10.3390/foods10040690.
38. Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergul, S., & Ozbas, Z. Y. (2019). Yeast strains with technological and probiotic traits isolated from Mihalic cheese. *International Food Research Journal*, 26(4), 1359-1370.
39. Krishnan, K., Campbell, Y., Virell To, K., Lima, G., Byron, M., Zhang, X., . . . Schilling, M. (2019). Effects of temperature, relative humidity, and protective netting on *Tyrophagus putrescentiae* (schrank) (sarcoptiformes: Acaridae) infestation, fungal growth, and product quality of cave-aged Cheddar cheese. *Journal of Stored Products Research*, 83, 44-53. Doi:10.1016/j.jspr.2019.05.014
40. Landaud, S., Helinck, S., & Bonnarme, P. (2008). Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(6), 1191-1205. Doi:10.1007/s00253-007-1288-y
41. Laore Sardegna (fecha de publicación desconocida). *Cheeses of Sardinia*. Sardegna. Recuperado el 15 de agosto del 2023, de [http://www.sardegnaagricoltura.it/documenti/14\\_43\\_20091216131002.pdf](http://www.sardegnaagricoltura.it/documenti/14_43_20091216131002.pdf)

42. Lessard, M.-H., Viel, C., Boyle, B., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2014). Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics*, *15*(235). Doi:10.1186/1471-2164-15-235
43. Marmoutier Création. (2023). *Aux Sauvers de Notre Région*. Recuperado el 21 de agosto de 2023, de <https://www.lagraineriedhannapes.com/tome-tomme/27-tomme-d-orchies-3720001106002.html>
44. Martínez, P. (2009). *Identificación de levaduras en el queso cotija por métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP y DGGE)*. México: (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
45. McSweeney, P. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, *57*(2-3), 127-144. Doi:10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x
46. Mollica, M., Trinchese, G., Cimmino, F., Penna, E., Cavaliere, G., Tudisco, R., . . . Crispino, M. (2021). Milk Fatty Acid Profiles in Different Animal Species: Focus on the Potential Effect of Selected PUFAs on Metabolism and Brain Functions. *Nutrients*, *13*(4). Doi:10.3390/nu13041111
47. National Human Genome Research Institute. (2023, enero 1). *Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)*. Recuperado el 1 febrero 2023 de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fragmentos-de-restriccion-de-longitud-polimorfica>
48. New England BioLabs. (2023). *Restriction Endonucleases*. Recuperado 24 de enero 2023, from <https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases>
49. NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de mayo de 2012.
50. NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018. Queso-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de enero de 2019.
51. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura. (2006). *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. Roma. Doi:92-5-305513-8
52. Oxford Nanopore Technologies. (2023). *Oxford Nanopore Technologies*. Recuperado el 25 junio 2023, from <https://nanoporetech.com/products/minion>
53. Pisano, M., Fadda, M., DePlano, M., Corda, A., & Cosentino, S. (2006). Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional Sardinian

cheese made from ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59(3), 171-179. Doi:10.1111/j.1471-0307.2006.00260.x

54. Price, E. J., Linforth, R. S., Dodd, C. E., Phillips, C. A., Hewson, L., Hort, J., & Gkatzionis, K. (2014). Study of the influence of yeast inoculum concentration (*Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*) on blue cheese aroma development using microbiological models. *Food chemistry*, 145, 464-472. Doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.081
55. Rhoads, A., & Au, K. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 278-289. Doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002
56. Rubio, S., Pacheco Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., & García Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, 61(12).
57. Sádecká, J., Šaková, N., Pangallo, D., Koreňová, J., Kolek, E., Puškárová, A., . . . Kuchta, T. (2016). Microbial diversity and volatile odour-active compounds of barrelled ewes' cheese as an intermediate product that determines the quality of winter bryndza cheese. *LWT*, 70, 237-244. Doi:10.1016/j.lwt.2016.02.048
58. Sutherland, J., Cornelison, C., & Crow, S. (2014). *Candida / Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*). *Encyclopedia of Food Microbiology*. 374-378. Doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00056-2
59. Tamang, J. P., & Lama, S. (2022). Probiotic properties of yeasts in traditional fermented foods and beverages. *Journal of applied microbiology*, 132(5), 3533-3542. doi:10.1111/jam.15467
60. United States Department of Agriculture. (2022, Diciembre). *USDA Foreign Agricultural Services*. Retrieved from Dairy: World Markets and Trade: <https://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade>
61. Unno, R., Suzuki, T., Matsutani, M., & Ishikawa, M. (2021). Evaluation of the relationships between Microbiota and metabolites in soft-type ripened cheese using an integrated omics approach. *Frontiers in microbiology*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.681185
62. Varna University of Management. (2021). *Study on the Current Situation of Traditional Products in Bulgaria. Designation and Market Potential*. Recuperado el 17 de agosto de 2023 de: [https://www.blacksea-cbc.net/wp-content/uploads/2021/07/BSB1101\\_LOC-FOOD\\_Studies-on-the-current-situation-of-traditional-products-designation-market-potential-in-Bulgaria\\_EN.pdf](https://www.blacksea-cbc.net/wp-content/uploads/2021/07/BSB1101_LOC-FOOD_Studies-on-the-current-situation-of-traditional-products-designation-market-potential-in-Bulgaria_EN.pdf)
63. Viglasky, V. (2013). Polyacrylamide Temperature Gradient Gel Electrophoresis. En: Makovets, S. *DNA Electrophoresis. Methods in Molecular Biology*, vol 1054. Humana Press, Totowa, NJ. doi:2443/10.1007/978-1-62703-565-1\_10

64. Veiga, J. P. (2016). Commensalism, Amensalism, and Synnecrosis. doi:10.1016/B978-0-12-800049-6.00189-X
65. Verduci, E., D'Elia, S., Cerrato, L., Comberiati, P., Calvani, M., Palazzo, S., . . . Peroni, D. (2019). Cow's Milk Substitutes for Children: Nutritional Aspects of Milk from Different Mammalian Species, Special Formula and Plant-Based Beverages. *Nutrients*, *11*(8). doi:10.3390/nu11081739
66. Wenning, M., Seiler, H., & Scherer, S. (2002). Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Applied and Environment Microbiology*, *68*(10), 4717-4721. doi:10.1128/AEM.68.10.4717-4721.2002
67. Yvon, M., & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, *11*, 185-201. doi:10.1016/S0958-6946(01)00049-8
68. Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 1-17. doi:10.3389/fmicb.2021.703284