



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

FACULTAD DE QUIMICA

**IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN EL QUESO
COTIJA POR MÉTODOS MOLECULARES
DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO.
(ARDRA, RFLP Y DGGE)**

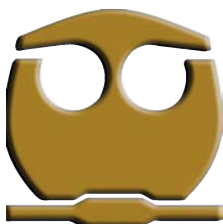
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A

BIÓL. PALOMA DOLORES MARTÍNEZ

Tutora: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch



México, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dra. Gloria Soberón Chávez.
Vocal:	Dra. María Esperanza Martínez Romero.
Secretario:	Dr. José Adelfo Escalante Lozada.
1er. Suplente:	Dra. Ma. Del Carmen Rodarte.
2do. Suplente:	Dr. Francisco Ruíz Terán.

Lugar físico donde de desarrolló este proyecto:

Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología; Conjunto E de la Facultad de Química; Ciudad Universitaria (C.U.); Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); México D.F.; México.

Este proyecto fue realizado bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y con el apoyo del programa PAPIIT IN200705 “Caracterización de la microbiota presente en quesos tradicionales mexicanos”.

Me hice un barquito de papel para irte a ver,

se hundió por culpa del rocío.

No me preguntes cómo vamos a cruzar el río

(Extremoduro; "Cuarto Movimiento: La Realidad")

Para mi primer mundo "En el ombligo de la Luna",... espero que cuando por fin me observe
en tú espejo siga siendo la misma de siempre, me recuerde a la que soy ahora.

Reconocimientos y agradecimientos al apoyo

A la Dra. Maricarmen Quirasco, por su gran paciencia, asesoría y confianza.

A Berenice Zuñiga por ser una gran maestra para mí y por contarme historias de este gran país, mi país.

Al Dr. Francisco Ruíz, a la Dra. Gloria Soberón, a la Dra. Carmen Wachter, y a la Dra. Gloria Díaz, por su confianza y orientación.

A la Dra. Amanda Gálvez y a los integrantes del PUAL por el apoyo obtenido para la realización escrita de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio 312, por las vivencias, compañías y consejos.

A “la Mari” (Mariana), “mi hermana adoptiva” y mi estrella de la suerte, por aguantarme, cuidarme, hacerme reír (y a veces llorar), por su tranquilidad y locura, su benevolencia y perversidad, su percepción, por esos recorridos hacia lugares inolvidables, por los viajes planeados y que seguro algún día haremos, por recordarme lo inocente que soy muchas veces,...

A Silvia y Ramón, mis “padres adoptivos”, por abrirme sus puertas cuando más lo necesité, por todo su apoyo, confianza y protección, y por enseñarme de forma directa en indirecta las costumbres mexicanas.

A mi “cucutana bailaora” Eliana Granados, por siempre dar y no siempre recibir, por su alegría, paciencia, porque nunca se rinde, por su gran generosidad y por pensar siempre en los demás, por ser tan directa, tan sensible y tan graciosa.

A la incansable Andrea, por conectarme con el mundo social, por escuchar, por preguntar, por llevarme a lugares que nunca hubiera entrado, por ese poder de unir a la gente, por su sonrisa eterna,....

A Eduardo y Jorge, por esa merendolas y comilonas inolvidables, por las pelis que nunca más se me ocurrirá volver a ver, por la paella que les debo, en Valencia claro,..

A Poncho y Nico, por las salidas nocturnas totalmente contraproducentes,...

A Carlos Cosa, por esos sueños místicos donde nace el sol y la luna, por esa visita lejana, por dejar enseñarte cuan mágico es estar “en el ombligo de la luna”.

A la inteligente y guapísima mujer que me dió la vida, me educó, me guió, me da consejos, y aunque yo siempre me rebelé ante sus enseñanzas, reconozco que muchas de las cosas que me gustan y me disgustan de mi es gracias a ella.

A mi padre, por enseñarme el sentido de ser práctico, por inculcarme de cierta manera el amor por la naturaleza y el poder de adaptación al cambio, a seguir adelante pase lo que pase.

Al alto, altísimo, el más alto de Torrent que tanto cariño me dió, que siempre vivió enamorado de Lolita y que me regaló mi primer gatito. A mi abuelo Ricardo (*“sempre romandrás en el meu cor”*).

A mi abuela Lola, por toda su alegría, por contarme tantas historias una y otra vez, por cantarme, por todos sus intentos fallidos de intentar enseñarme a coser, bordar, hacer ganchillo, hacer patronos, hilvanar,...

A mis hermanos J. Ricardo, Juan y mi hermana Miriam, por todas las aventuras vividas y por vivir, por esperar a que el barquito de papel llegue a la otra orilla del río.

A Caro “la meua cunya” y gran amiga.

A mis tíos y tías, Maricruz, Merche, Juanjo y Rica, por siempre estar tan pendientes de mí aún a miles de kilómetros de distancia.

**Identificación de levaduras en el queso Cotija por métodos moleculares
dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP y DGGE)**

Página

Resumen	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 DEFINICIÓN DE QUESO	7
3 ETAPAS GENERALES EN LA ELABORACIÓN DE LOS QUESOS	7
4 DEFINICIÓN DE QUESO COTIJA	9
5 ETAPAS DE LA ELABORACIÓN DEL QUESO COTIJA	9
5.1 ORDEÑA	10
5.2 REPOSO	10
5.3 ADICIÓN DEL CUAJO	10
5.4 CORTE	11
5.5 DESUERADO	11
5.6 DESMENUZADO Y AMASADO	11
5.7 ADICIÓN DE SAL	11
5.8 MOLDEADO	12
5.9 PRENSADO	12
5.10 DESFAJADO, OREADO Y MADURACIÓN	12
5.11 AÑEJAMIENTO	13
6 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS	14
6.1 <u>Parámetros fisicoquímicos que influyen en la maduración de los quesos</u>	14
6.2 <u>Procesos bioquímicos involucrados en la maduración de los quesos</u>	17
6.3 <u>Microbiota típica presente en los quesos</u>	19
7 CARACTERÍSTICAS GENERALES Y PROPIEDADES DE LAS LEVADURAS	20

8	LEVADURAS IDENTIFICADAS EN QUESOS	21
9	DIVERSIDAD MICROBIANA	25
10	MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN ALIMENTOS FERMENTADOS	26
10.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
10.2	Diversidad microbiana basada en secuencias conservadas	27
	<u>Identificación de levaduras basada en secuencias conservadas</u>	28
10.3	PCR-DGGE para el estudio de las comunidades microbianas	28
	<u>Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)</u>	30
	<u>DGGE aplicado en alimentos</u>	31
	<u>Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)</u>	32
10.4	PCR-Endonucleasas de restricción	32
	ARDRA (Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado)	33
	ITS-PCR (RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)	33
11	ANTECEDENTES EXPERIMENTALES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA DE LOS QUESOS MADURADOS	35
11.1	Análisis microbiológico	35
11.2	Determinaciones fisicoquímicas en el queso Cotija	35
12	JUSTIFICACIÓN	37
13	HIPÓTESIS	38
14	OBJETIVO	39
15	MATERIAL Y MÉTODOS	40
15.1	Muestras	40
	Esquema de la metodología general a seguir	41
	Estrategia general del método dependiente de cultivo	42

Estrategia del método independiente de cultivo	43
15.2 Análisis microbiológico y aislamiento de las levaduras en agar selectivo	43
15.3 Inoculación de las levaduras aisladas en agar selectivo (WLN, AT y ALD)	45
15.4 Metodología para la extracción y purificación del ADN	46
<u>Etapas de concentración de microorganismos para la obtención del ADN directamente del queso</u>	47
<u>Preparación paquete celular para extracción del ADN a partir de colonias aisladas de levaduras</u>	47
Extracción del ADN por método mecánico	48
Extracción del ADN por método enzimático	49
Purificación del ADN mediante Fenol-Clorofomo-Alcohol-isoamílico	49
Purificación del ADN mediante columnas de afinidad por el ADN	50
15.5 Determinación de la concentración y pureza del ADN total	51
15.6 Cebadores utilizados para la amplificación por PCR del ADN obtenido del queso Cotija por el método dependiente e independiente de cultivo	52
15.7 Programas del termociclador para la amplificación por PCR	52
15.8 Volúmenes y concentraciones de los reactivos para la PCR	53
15.9 ARDRA y RFLP	54
15.10 Montaje de la técnica de DGGE	55
15.11 Estudio de la huella génica, secuenciación e identificación de las levaduras	56
Resultados y discusión:	
16 Análisis microbiológico para la determinación de la calidad general de las ocho muestras de queso Cotija	58
17 Descripción morfológica de las colonias de levaduras obtenidas a partir de la inoculación de muestras de queso en medios de cultivo selectivos	60

18	Optimización del método de extracción y purificación del ADN a partir de los microorganismos aislados en medios selectivos. Prueba de PCR	64
19	Optimización del método de extracción y purificación del ADN a partir del queso. Prueba de PCR	67
20	Análisis de restricción de la región 26S (ARDRA) y la ITS (RFLP)	72
21	Optimización del gradiente desnaturizante mediante DGGE perpendicular para los amplicones obtenidos a partir de la amplificación de la región D1/D2 por el método independiente de cultivo	90
22	DGGE paralelo con gradiente desnaturizante 25-55% para los amplicones obtenidos a partir de la amplificación de la región D1/D2 por el método independiente de cultivo	91
23	DGGE paralelo a partir de los amplicones obtenidos por el método dependiente de cultivo	92
24	Análisis previo a la secuenciación de las diferentes muestras (microorganismos aislados/quesos)	99
25	Secuenciación e identificación	102
	Conclusiones	108
	Bibliografía	109
	Anexo I Medios de cultivo	115
	Anexo II Soluciones reactivos	117
	Anexo IV Matriz binaria de los fragmentos de restricción	119
	Anexo V Optimización del gradiente desnaturizante	121
	Anexo VI Alineamiento de las secuencias en GenBank	123
	Anexo VII Secuencias	133

El auténtico queso Cotija es uno de los pocos quesos mexicanos madurados con más de 400 años de historia. Durante todo este tiempo se ha elaborado en las regiones en los estados de Jalisco y Michoacán en la Sierra JalMich. Se define como un queso madurado, de leche bronca de bovino, de pasta cruda, ácida y prensada, salado, de consistencia firme, de gran formato y con aroma y sabor pronunciados.

Actualmente el auténtico queso Cotija se elabora por una organización social formada por grupos vecinales de la región nombrada *Asociación Regional de Productores de Queso Cotija*. En Marzo del 2005 el queso Cotija obtuvo la Marca Colectiva “*Queso Cotija Región de Origen*”. Esta denominación dió al Cotija una protección oficial y se diferencia de esta manera en el mercado al auténtico queso Cotija de otros productos industrializados o similares.

La elaboración es totalmente artesanal a partir de leche bronca procedente de ganado bovino alimentado por libre pastoreo, no se lleva a cabo ningún tratamiento térmico y no se utilizan químicos ni inóculos iniciadores por lo que la fermentación y la maduración de este queso depende de la microbiota nativa de la leche y del ambiente. Una población importante de la microbiota de muchos quesos madurados es la de las levaduras ya que son muchas veces clave en la producción de aromas y sabores en éstos.

En la última década se ha visto, a partir del estudio de ecosistemas complejos como lo son los océanos, las aguas termales, los suelos, los alimentos artesanales fermentados, etc. utilizando técnicas moleculares independientes de cultivo que sólo una pequeña parte de la población microbiana ha sido identificada.

El propósito de este proyecto fue comparar las posibles diferencias de la población de levaduras en ocho muestras de auténtico queso Cotija, de por lo menos tres meses de maduración, empleando métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo.

La identificación de levaduras presentes en muestras de auténtico queso Cotija se hizo mediante las técnicas ARDRA y RFLP para el método dependiente de cultivo y mediante DGGE para el método independiente de cultivo. La técnica de DGGE ha sido utilizada muy a menudo para el estudio del perfil microbiano de muestras con microambientes complejos.

Los resultados mostraron que el perfil de la población microbiana por DGGE fue mayor que el mostrado por las técnicas dependientes. Este estudio mostró que la información obtenida por ambos métodos se complementa.

Las levaduras identificadas fueron *Candida zeylanoides*, *Candida parapsilosis* y *Kluyveromyces lactis*. Estas levaduras poseen actividad lipolítica y/o proteolítica y se han encontrado en hábitats como carnes curadas, ambientes marinos, bebidas fermentadas, productos lácteos, entre otros.

1. INTRODUCCIÓN:

En México actualmente se elaboran más de treinta tipos diferentes de quesos, la mayor parte artesanales y de difusión local o nacional. Por otro lado la mayoría de los quesos que se producen se consumen frescos y son pocos los que se consumen maduros, dentro de estos últimos están los quesos Chapingo, Ranchero añejo, Adobera añejo, Queso de sal, Cotija, etc. (Villegas, 2004)

El auténtico queso Cotija es uno de los pocos quesos mexicanos con más de 400 años de historia. La elaboración del queso Cotija llegó con los primeros colonizadores a fines del siglo XVI. Los criadores de ganado se instalaron en lugares periféricos a los centros de población agrícola (Villegas, 2004). Durante todo este tiempo se ha elaborado en las regiones montañosas entre los estados de Jalisco y Michoacán, en la Sierra de JalMich (Figura 1, Barajas *et al.*, 2005).

La Sierra de JalMich es una zona montañosa ubicada en la cuenca del río Tepalcatepec, entre los estados de Michoacán y de Jalisco. Es la cuna y la zona de refugio del auténtico queso Cotija. Estas regiones debido a su clima templado, altitud y latitud, favorecen, entre otros aspectos, la maduración del queso en condiciones particulares. (http://www.mexicocampoadentro.org/quesos_cotija.php)

El queso Cotija genuino sólo se elabora durante la época de lluvias en los meses de julio a octubre y en ésta el ganado se alimenta por libre pastoreo en praderas naturales de esa zona geográfica en particular, dando una mayor producción de leche. Este ganado es bovino criollo (*Bos taurus*) principalmente raza Cebú encastado con otras razas de bovino. De acuerdo con los productores algunas de las mezclas son Cebú con Holstein, Suiza, Charolais, Limousin, etc. Este ganado criollo se utiliza preponderantemente para la producción de carne y tiene una baja producción de leche que asegura una cantidad de grasa y proteína de 3.7% y de 3.0% respectivamente. (Barajas *et al.*, 2005)

A principios del siglo XIX se comenzó a transportar el queso Cotija desde los poblados y ranchos productores de la sierra JalMich hacia la ciudad Cotija, Mich. para su venta ya que

éste era, y sigue siendo, el poblado con mayor auge económico en la zona, por eso el producto es conocido como queso Cotija. Aunque no está documentado los habitantes de la zona testimonian que este queso debía transportarse con mulas o caballos durante 2-3 días desde las regiones colindantes de Jalisco, Quitupan, Jilotlán de los Dolores y Sta. María del Oro y de Michoacán, Tocumbo y Los Reyes hacia la ciudad de Cotija. Así una de las razones por las que las piezas de queso se dejaban madurar durante 3-4 meses era porque las condiciones del transporte podrían afectar a la forma original de la pieza de queso, de esta manera mediante la maduración por la pérdida del suero intersticial la pieza adquiriría firmeza manteniendo así el formato original. Otra de las razones está basada en el hecho de que a principios del mes de diciembre se celebraba la “Feria del Patrono de Cotija” en esta misma ciudad, donde los productores llevaban a vender las piezas de queso que se habían elaborado en la época de lluvias y con el fin de que se conservaran en buen estado se dejaban madurar durante esos meses. Cabe recalcar que hasta la fecha se sigue celebrando esta feria en el mes de Diciembre y que los productores todavía llevan a vender sus productos (Barajas *et al.*, 2005).

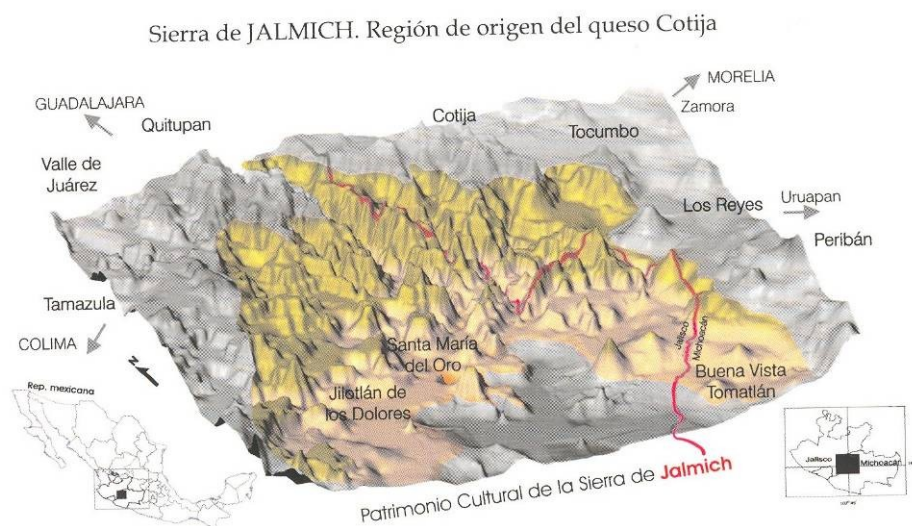


Figura 1: Mapa Sierra Jalmich. Región de origen del queso Cotija (Barajas *et al.*, 2005).

La tradición quesera de esta región se ha conservado prácticamente sin cambios en los cuatro siglos de elaboración. Esta tradición cultural actualmente está sustentada por aproximadamente 200 familias de productores a quienes corresponde mantener y seguir transmitiendo esta tradición de generación en generación (Poméon, 2007).

Debido a que la elaboración de este queso es totalmente artesanal y a que la materia prima es la leche cruda o bronca, la contaminación por microorganismos, de la leche y del queso, puede provenir de diversas fuentes como el ganado, utensilios y materiales con los que se elabora el queso, personas que lo elaboran, lugar de elaboración y almacenamiento, etc. Por ello es imprescindible que la elaboración de este queso sea lo más higiénica posible para que no afecte a su calidad sanitaria.

Actualmente el auténtico queso Cotija se elabora por una organización social formada por grupos vecinales de la región y nombrada *Asociación Regional de Productores de Queso Cotija*. En Marzo del 2005 el queso Cotija obtuvo la denominación de ¹Marca Colectiva “*Queso Cotija Región de Origen*”. Esta marca es un signo distintivo que sirve para diferenciar en el mercado los productos o servicios de los miembros de una asociación, en los que un producto ha sido elaborado en una región determinada. Se diferencia de esta manera en el mercado al auténtico queso Cotija de los no auténticos y que son denominados queso “tipo” Cotija. También representa una protección oficial tanto para los productores, en el que el queso tendrá un mayor valor, como para los consumidores como alimento de calidad. Para cumplir con la garantía de calidad sanitaria y autenticidad de este queso los productores tienen que elaborar el queso según las especificaciones establecidas en las “Reglas de uso de la Marca Colectiva Región de Origen”.

¹ **Marca Colectiva**, que según la ley mexicana es “aquel signo visible que distingue en el mercado los productos y servicios de las asociaciones, sociedades de productores, fabricantes, comerciantes o prestadores de servicios, legalmente constituidas, respecto de los productos o servicios de terceros”. [Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. LEY DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL De las Marcas y de los Avisos y Nombres Comerciales. CAPITULO II. De las Marcas Colectivas \(1991\)](#)

Esta Marca colectiva es el comienzo para la obtención de la ² Denominación de Origen, que daría una mayor protección oficial y mantendría las cualidades del producto, con lo que se aportaría mayores ventajas para los productores y los consumidores.

Las propiedades organolépticas y sensoriales del queso Cotija fueron reconocidas internacionalmente en Noviembre del 2006 en el concurso "[Queso del Año](#)" celebrado en el Festival Internacional de Cremona, Italia. El queso Cotija ganó entre 500 participantes de todo el mundo (La Jornada, 2006)

Debido a la elaboración artesanal de este producto en el que no se lleva a cabo ningún proceso térmico, no se inoculan cultivos iniciadores ni inóculos de maduración y la fermentación es espontánea, el queso Cotija representa un ambiente complejo, donde las funciones de la población de microorganismos son clave en las propiedades y características del producto y al mismo tiempo son desconocidas. Por tanto surgió el interés de conocer cuales son los microorganismos de esta población. En este proyecto se identificaron las levaduras, que tienen una función esencial en la producción del aroma y sabor de muchos quesos madurados.

La premisa en la que se basa esta tesis es que el proceso de elaboración, almacenamiento, condiciones ambientales, y las diferentes fuentes de inoculación natural de microorganismos en esta región harán que la microbiota de este queso sea exclusiva dándole al queso Cotija identidad y características sensoriales propias.

² **Denominación de Origen (DO):** según el Arreglo de Lisboa, se trata de "la denominación geográfica de un país, una región o de una localidad que sirva para designar un producto originario del mismo y cuya calidad o características se deben exclusiva o esencialmente al medio geográfico, comprendidos los factores naturales y los factores humanos". Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI). Arreglo de Lisboa relativo a la Protección de las Denominaciones de Origen y su Registro Internacional (1979).

2. DEFINICIÓN DE QUESO:

De acuerdo con Davis (1965), el queso es el producto resultante de la coagulación de la leche de ciertos mamíferos mediante la renina (presente en el cuajo) o enzimas similares, en presencia de ácido láctico producido por microorganismos agregados o propios de la leche, del cual se elimina una parte de la humedad por el corte de la cuajada, el calentamiento y/o prensado, y a continuación el moldeado, prensado, afinado y su conservación en condiciones convenientes.

Esta definición excluye a los “quesos” producidos por vía ácida exclusivamente, por ultrafiltración, y a los fabricados a partir de crema, leche parcialmente descremada, y aquellos elaborados, previa estandarización, con leche en polvo, caseinatos y grasa butírica.

3. ETAPAS GENERALES EN LA ELABORACIÓN DE LOS QUESOS:

Las características del queso están fuertemente influenciadas por la composición de la leche con la que se va a elaborar el queso, especialmente el contenido de grasa, proteína, calcio y pH. La leche de vaca físicoquímicamente es un fluido muy complejo constituido por una solución acuosa de lactosa (5%), sales (0.7%) y muchos otros elementos en estado de disolución, en donde se encuentran las proteínas (3.2%) en estado de suspensión y la materia grasa (3.3%-4.7%) en estado de emulsión.

Las principales variaciones en el contenido de materia grasa se deben a las características individuales de cada vaca (edad, alimentación, número de ordeñas,...). A medida que se va mezclando la leche procedente de distintos individuos, la composición de la materia grasa se va haciendo más constante (Amiot, 1991; Fox *et al.*, 2000).

Para elaborar queso, la leche puede someterse a diferentes tratamientos como desgrasado o desnatado, calor, adición de calcio, de cultivo iniciador, colorantes, blanqueadores y sal, dependiendo del producto final deseado. En la siguiente figura se muestran los diferentes

tratamientos durante las etapas de elaboración del queso que pueden darse dependiendo del tipo del producto a obtener, algunas de estas etapas son opcionales (*).

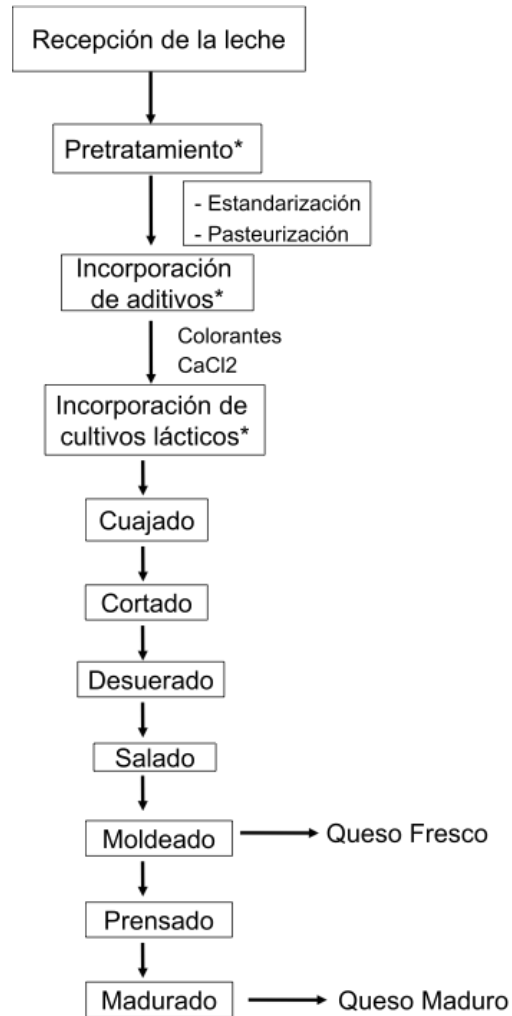


Figura 2. Etapas generales en la elaboración de los quesos.

La figura muestra las etapas generales de elaboración en los quesos (Villegas, 2004)

4. DEFINICIÓN DE QUESO COTIJA:

Es un queso madurado, de leche bronca de bovino, de pasta cruda, ácida y prensada, con un alto contenido en sal, de consistencia firme, dependiendo de la dureza de éste puede tener una consistencia rallable o rebanable. Esta consistencia está determinada por la concentración de grasa y sal. Por su porcentaje de humedad y debido al proceso de obtención, se le considera un queso seco. Tiene un gran formato, normalmente de unos 20 Kg aunque a veces puede llegar a 40 Kg. Tiene forma cilíndrica y presenta una corteza natural con la forma del relieve de la manta con la que fue prensado.

La zona geográfica de elaboración está localizada a una latitud norte 19 ° 30' norte y longitud oeste 102 ° 45'. La altitud se ubica entre 700 y 1700 msnm aproximadamente. La temperatura suele ser de 20-25 °C. La región se ubica en la sierra entre Jalisco y Michoacán (JalMich).

La elaboración se da en los meses de lluvias (Julio-Octubre), en este tiempo el ganado productor de la leche, criollo o híbrido, se alimenta por libre pastoreo. Se comercializa a partir de Diciembre. Toda la leche utilizada para la elaboración debe ser fresca (*Villegas, 2004; Barajas et.al., 2005;*).

5. ETAPAS DE ELABORACIÓN DEL QUESO COTIJA:

(*Barajas et.al., 2005; García, 2006*)

En la elaboración de este queso no se utiliza algún tratamiento térmico, sólo se esterilizan, con agua hirviendo, los utensilios y material con el que se va a elaborar el queso. También hay que destacar que no se lleva a cabo ninguna inoculación con microorganismos, es decir no se inoculan cultivos iniciadores u otro tipo de inóculos. Participa la microbiota típica del

ambiente, ya sea de la leche o de las distintas fuentes de inoculación natural. A continuación se muestran las diferentes etapas para la elaboración del queso Cotija.

5.1 ORDEÑA

En el mismo día se debe ordeñar y comenzar con la elaboración del queso.

La ordeña siempre se hace temprano, de 7 a 10 de la mañana.

La temperatura de la leche recién ordeñada es de 37-38° C, con un pH de 7.

La persona que se dedique a ordeñar las vacas se tiene que lavar bien las manos y debe limpiar la ubre de la vaca con un trapo limpio antes de la ordeña. Esa misma persona no debe acarrear el ganado o realizar otras actividades, por lo menos hasta que finalice la ordeña, con el fin de tener la mayor higiene posible.

El lugar de la ordeña debe limpiarse cada día, una vez que se haya terminado ésta.

5.2 REPOSO

La leche se mantiene en recipientes de acero inoxidable con tapa. Estos tienen que estar limpios, preferentemente estériles. La leche, conforme se va ordeñando, se va mezclando en estos recipientes. También se utilizan recipientes de plástico y cazos grandes para contener la leche.

La mezcla de la leche, de diferentes vacas, obtenida en un mismo día se hace pasar por cedazos limpios, previamente esterilizados, para retener cualquier materia extraña antes de su utilización.

5.3 ADICIÓN DEL CUAJO

Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima (alrededor 34 °C), se le incorpora el cuajo animal natural (Cuamex, Cuajo XXX estandarizado *Ch. Hansen*), enzimas coagulantes de leche bovina, mezclándolo rápidamente. Se deja reposar la leche con el cuajo de 30 a 45 minutos. La cantidad de cuajo agregada es de aproximadamente 1 mL/10 L de leche.



Figura 3. Etapa de adición de cuajo y corte

1.4 CORTE

La consistencia de la cuajada se prueba cruzándola con una cuchara ó cuchillo y, una vez alcanzado el punto deseado, se corta con utensilios esterilizados previamente en agua hirviendo, hasta obtener grumos equivalentes en tamaño aproximado a un grano de maíz.

Dependiendo del productor puede variar el tamaño y las veces que se corte la cuajada.

1.5 DESUERADO

La mezcla del suero y cuajada se deja reposar hasta que la cuajada cortada se asienta (o decanta) en el fondo del recipiente. Para eliminar el suero, se drena o cuela con ayuda de una manta limpia, previamente esterilizada en agua hirviendo, ejerciendo un poco de presión manual

1.6 DESMENUZADO Y AMASADO

La cuajada se separa del suero y se deja escurrir en una artesa que puede ser de madera apropiada o de acero inoxidable. Posteriormente se amasa o desmenuza de forma manual.

1.7 ADICIÓN DE SAL

Durante el amasado se le incorpora la sal (de 130 g- 150 g por cada 20 litros de leche, la cantidad varia según el productor).

Se utiliza sal de mar en grano procedente de Colima obtenida de forma artesanal. La cantidad de sal es relativa y no se pesa, se cuenta en número de tazas.

1.8 MOLDEADO

La masa salada se puede moldear el mismo día o dejar reposar sobre la artesa a temperatura ambiente, para que al día siguiente se incorpore otra cantidad equivalente a la del primer amasado y así juntas, obtener la cantidad suficiente para llenar el aro (molde del diámetro específico), cubierto en su interior con dos bandas de ixtle (fibra de maguey) o tela de manta con las que se envolverá la masa y darán el relieve característico de este queso, obteniendo la presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 Kg.

1.9 PRENSADO

En esta etapa se elimina parte del suero intersticial de la masa del queso. La masa salada que se ha incorporado al aro ejerciendo presión, se prensa de 18 a 24 horas. Se le puede aplicar un peso de aproximadamente 50 Kg. de acuerdo al fabricante.



Figura 4. Etapa de prensado

Una vez prensado se le quita el peso, se voltea sobre su propia cara y se cubren los quesos con una malla limpia para evitar que acerquen moscas u otros insectos, y se colocan al aire libre.

A partir de esta etapa se considera que inicia la vida de cada pieza de queso.

1.10 DESFAJADO, OREADO Y MADURACIÓN

La pasta prensada se mantiene fajada, dentro del aro que esta sostenido por un cincho, para que no pierda la forma cilíndrica, se voltea sobre su cara diariamente, se le quita el aro y se limpia la superficie del queso con un trapo limpio. Una vez limpio se vuelve a envolver con el aro y se aprieta para que el queso no pierda la forma al mismo tiempo que va drenando el suero intersticial (oreado).



Figura 5. Etapa de desfajado y oreado

Una vez que ha adquirido la consistencia o firmeza necesaria, y que el queso ha empezado a hacer costra, más o menos 15 días, se le quita el aro (desfajado) y se mantiene a temperatura ambiente en un cuarto lo más fresco posible (aproximadamente 20°C). Se limpia diariamente y se voltea sobre su propia cara. En esta etapa se considera que comienza la maduración.

El periodo de maduración es de tres meses como mínimo.

1.11 AÑEJAMIENTO

Se almacena el queso en condiciones ambientales a una temperatura de 20-25 ° C y aprox. 83% de humedad.

Se considera a la pieza de queso como añeja cuando el tiempo de maduración de ésta se encuentra entre los 3-6 meses, una vez la pieza de queso haya pasado de los 6 meses de maduración se le considera queso rendido.

6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS:

El paso esencial en la manufactura de los quesos implica la coagulación de la caseína, principal componente proteico de la leche, para formar un gel que retiene la grasa. Le seguiría la etapa de sinéresis (pérdida de suero), salado y maduración si es el caso.

La duración de la maduración está inversamente relacionada con el contenido de humedad del queso. Los cambios que ocurren durante la maduración, en el sabor, aroma y textura, están predeterminados en gran parte por las características de la cuajada (humedad, concentración del NaCl y pH), los niveles de actividad coagulante residual, el cultivo iniciador y la microbiota secundaria.

En la maduración están implicados factores internos y externos a la masa del queso.

- Los internos incluyen las propiedades fisicoquímicas del coágulo de queso y los agentes de maduración (microorganismos y enzimas). Las propiedades fisicoquímicas de la cuajada, como el pH y el a_w , tienen influencia directa sobre el desarrollo de la maduración. Los procesos bioquímicos causados por los microorganismos y enzimas son de gran importancia en la maduración del queso ya sea de manera directa o indirecta.
- Los externos son las condiciones del ambiente que dirigen la actividad de los agentes de maduración para obtener las características deseables de cada queso. Entre los factores externos se encuentra la temperatura y la humedad.

6.1 Parámetros fisicoquímicos que influyen en la maduración de los quesos

- El pH es un factor interno de maduración que determina el desarrollo de los microorganismos, la actividad enzimática y la textura del queso. Los microorganismos presentan una sensibilidad específica hacia el pH. Las levaduras y hongos, que forman parte de la microbiota secundaria, se desarrollan mejor en medios ácidos mientras que la mayoría de las bacterias prefieren medios próximos a la neutralidad.

La microbiota iniciadora, principalmente bacterias lácticas, es la responsable de la producción de ácidos orgánicos, disminuyendo el pH desde valores 6.5-6.7 hasta 4.5-5.3. El pH es un factor significativo en el control de crecimiento de la microbiota iniciadora y secundaria, ya que los hongos y las levaduras (microbiota secundaria), pueden crecer a valores de pH más bajos que las bacterias (microbiota primaria). A continuación se muestra una tabla con la relación entre diferentes valores de pH y el crecimiento de la microbiota:

Tabla 1. Valor del pH de crecimiento de los microorganismos (Cogan *et al*, 2000).

Microorganismo	pH
Bacterias	4-7
Levaduras	<3
Hongos	<3

- El a_w es un factor interno de maduración que está determinado al principio de la maduración por las condiciones de coagulación (o cuajado), del desuerado y del salado. En general las levaduras y hongos resisten mejor las condiciones bajas de a_w que las bacterias. La evolución del a_w en la maduración depende de muchos factores como la evaporación de agua, la cantidad de sal, la interacción proteínasal y la acumulación de compuestos solubles (derivados de la proteólisis y la lipólisis).

En el queso, los principales componentes hidrosolubles son el cloruro de sodio y las proteínas que se encuentran hidratadas disminuyendo el agua disponible (a_w). Cuando se hidrolizan proteínas y lípidos, a péptidos y ácidos grasos respectivamente, por los microorganismos durante la maduración, se reduce el a_w , ya que para hidrolizar cada enlace se necesita una molécula de agua.

Los ácidos orgánicos producidos por la microbiota iniciadora como el ácido láctico, el ácido acético, el ácido propiónico, etc., reducen el a_w .

A continuación se muestran los diferentes valores de a_w observados en quesos madurados:

Tabla 2. Cambio del a_w durante la maduración. Disminución de la actividad acuosa conforme aumenta el tiempo de maduración (Cogan, 2000).

Producto	Tiempo de maduración	a_w
Leche	0	0.995
Camembert	3 semanas	0.982
Gruyère	24 meses	0.948
Parmesano	24 meses	0.917

Tabla 3. Valor del a_w mínimo de crecimiento para diferentes microorganismos. Esta tabla muestra que las levaduras son capaces de crecer a menor actividad acuosa que las bacterias (Cogan, 2000).

Microorganismo	a_w mín.
Bacterias	0.92
Levaduras	0.6-0.83
Hongos	0.75

- La concentración de cloruro de sodio (NaCl) es el factor interno principal causante de la disminución del a_w . Una concentración del 10% de NaCl generalmente es suficiente para la inhibición de los organismos indicadores como los coliformes, aunque este porcentaje podría disminuir dependiendo del pH.
- La temperatura es un factor externo que determina en buena medida el desarrollo de los microorganismos y la actividad enzimática. Las temperaturas de maduración son generalmente más bajas porque así se controlan las reacciones enzimáticas y se favorece la función de microorganismos, como levaduras y hongos, característicos de esta.
- La humedad es un factor externo que influye en la maduración, por lo general un ambiente con baja humedad provoca una maduración corta y viceversa (Cogan, 2000).

6.21 Procesos bioquímicos involucrados en la maduración de los quesos

Durante la maduración del queso, las reacciones bioquímicas guían hacia la formación del sabor. Los atributos del sabor y aroma son producidos por tres principales componentes: lactosa, lípidos y proteínas a través de diferentes rutas metabólicas.

A continuación se enlistan los principales agentes encargados de la formación de aromas y sabor en la maduración de los quesos:

-Las lipasas nativas de la leche, están mayoritariamente asociadas con las micelas y pasan a solución acuosa por adición de sal. Pueden influir en la maduración para el caso en que se usa la leche no pasteurizada ya que tratamientos térmicos las inactivan. La lipólisis de los triglicéridos libera altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta e intermedia. Los ácidos grasos libres de cadena corta tienen un impacto considerable en el sabor, estos deben ser balanceados con otros componentes de sabor para desarrollar un aroma deseable. Los ácidos grasos libres son sustratos para otras reacciones bioquímicas como la *β-oxidación* que dará lugar a cetonas y alcoholes secundarios, la *esterificación* de ácidos grasos hidroxilados que producirán lactonas, y la producción de ésteres por la *reacción de los ácidos grasos* con los grupos alcohol. Los compuestos resultantes contribuirán al desarrollo del aroma.

-Las proteínas se hidrolizan durante la maduración por la acción de proteasas presentes en el coágulo. Se han identificado dos proteasas de la leche, una alcalina (plasmina) y otra ácida, ambas asociadas a micelas. Son selectivas hacia las caseínas. Las enzimas coagulantes son parcialmente retenidas en el coágulo y son capaces de continuar la proteólisis durante la maduración.

Las proteínas contribuyen directamente al aroma por liberación de péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos son sustratos para diversas reacciones (transaminación, deshidrogenación, decarboxilación, reducción) que producirán una amplia gama de compuestos de sabor y aroma.

6.3 Microbiota típica presente en los quesos

La microbiota presente en los quesos, como ya se ha mencionado, juega un importante papel en la formación de textura, aroma, sabor, etc., característico de cada queso. La microbiota típica que se presenta en los quesos se muestra a continuación:

-Cultivos iniciadores (starter): Tienen la función de producir ácido durante el proceso de fermentación; sin embargo, también contribuyen a la maduración donde sus enzimas están implicadas en la proteólisis y conversión de aminoácidos en compuestos implicados en el sabor. Producen suficiente ácido como para reducir el pH de la leche a <5.3 en 6 h a 30-37 ° C. Los utilizados más frecuentemente son especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, también conocidas como BAL o bacterias ácido lácticas.

Las bacterias lácticas limitan el crecimiento de otras bacterias, tanto por la disminución del pH (debido a la producción de ácido láctico) como por la producción de ciertas sustancias inhibidoras (ej. bacteriocinas).

Las bacterias propiónicas son las responsables del sabor y textura de muchos quesos debido a la producción de proteasas y peptidasas intra- o extracelulares. Pueden metabolizar la mayoría de los aminoácidos produciendo dióxido de carbono, ácidos propiónico y acético y amoníaco.

- Microbiota secundaria: formada por mohos, levaduras y bacterias no ácido lácticas.

Los mohos son muy importantes en la maduración de algunos quesos, como por ejemplo el queso roquefort en el que *Penicillium roqueforti* es el moho azul típico.

-Las levaduras contribuyen a la producción de compuestos de sabor a partir de sus capacidades proteolíticas, peptidásicas, lipolíticas y esterásicas. También metabolizan el ácido láctico, formado por la fermentación de las bacterias lácticas, crecen a altas concentraciones de sal y desde los primeros días de la

maduración, promoviendo la desacidificación que ayudará a que otras bacterias no ácido lácticas crezcan (*Micrococci* y *Coryneformes*) formando parte también de esta microbiota secundaria. (Beresford *et al.*, 2001; Lopandic *et al.*, 2006).

-Microbiota coliforme: microbiota no deseable, revela la falta de higiene, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, y son de origen fecal. Tiene la propiedad de fermentar la lactosa y producir gas (CO₂ e hidrógeno) y ácidos, principalmente ácidos mixtos, llevarían a cabo la “fermentación gaseosa” y el hinchamiento de los quesos (García *et al.*, 1999).

7. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y PROPIEDADES DE LAS LEVADURAS:

Las levaduras son microorganismos clasificados como hongos unicelulares que han perdido el crecimiento micelial, pueden pertenecer a la división Deuteromycetes, Ascomycetes o Basidiomycetes dependiendo del tipo de reproducción. (Ginnis 1980, Hoog *et al.*, 1995).

La clasificación de los hongos en el Reino Fungi se muestra en la Figura 7. Generalmente se reproducen asexualmente por gemación, aunque también pueden hacerlo por fisión binaria.

La reproducción sexual se da mediante la formación de ascosporas o basidiosporas. (<http://www.yeastgenome.org/>)

Son quimiótrofos, y usan como fuente de carbono principalmente hexosas (glucosa y fructosa) o disacáridos (sacarosa y maltosa), algunas pueden metabolizar alcoholes y ácidos orgánicos.

Poseen una pared celular principalmente formada por quitina y polisacáridos (glucanos) unidos por enlaces β -1,3-glucosa. Puede formar cápsulas o esporas resistentes. (Manners *et. al.*, 1973)

Propiedades generales levaduras (Fleet 1999, Beresford *et al.*, 2001):

- Acidófilas
- Tolerancia a elevadas concentraciones de sal (halófilas)
- Crecimiento a baja actividad acuosa ($\downarrow a_w$)
- Crecimiento a bajas temperaturas

- Asimilación de ácido cítrico
- Asimilación de ácido láctico
- Producción de enzimas proteolíticas
- Producción de enzimas lipolíticas
- Fermentación o asimilación de lactosa

La clasificación de las levaduras en el Reino Fungi:

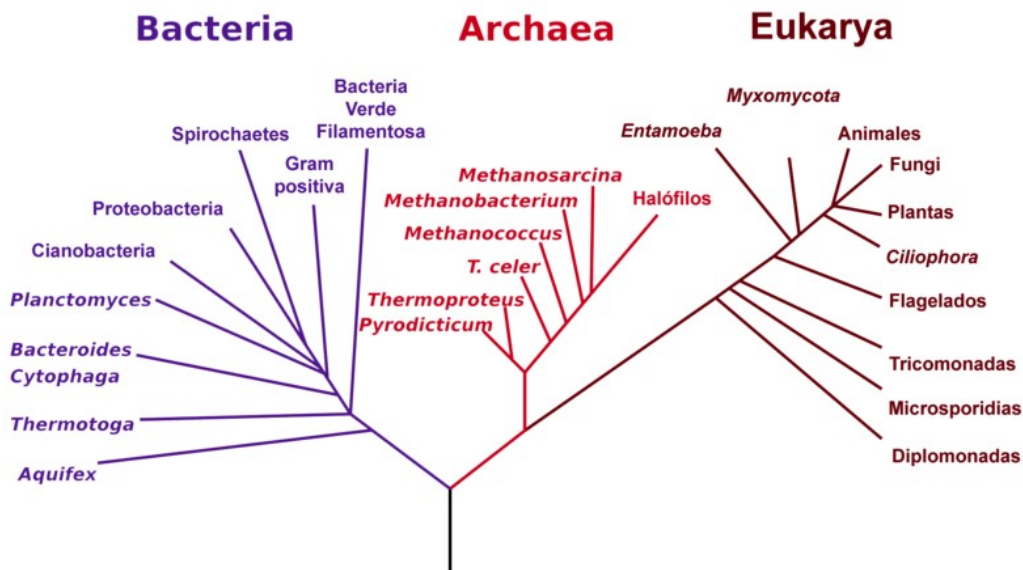


Figura 7. Árbol filogenético de la vida. (Woese et al., 1990)

8. LEVADURAS IDENTIFICADAS EN QUESOS:

Haciendo una revisión de la literatura aparecen una multitud de diferentes especies de levaduras que han sido aisladas de alimentos de consumo diario. Algunas de las propiedades por las que las levaduras crecen en estos productos se mencionaron en el punto anterior. Estas propiedades se relacionan con las propiedades fisicoquímicas que presentan muchos alimentos (Fleet, 1990).

Las levaduras pueden provenir de la materia prima, la leche, con la que se elabora el queso. El crecimiento de especies del género *Candida*, *Kluyveromyces* y *Cryptococcus* se explica

por la capacidad que tienen las levaduras de utilizar la lactosa, las proteínas o la grasa de la leche (Fleet, 1990).

El crecimiento de diferentes especies de levaduras en algunos quesos se ve favorecido por las propiedades fisicoquímicas de éste como son: pH ácido, bajo a_w , elevadas concentraciones de sal, etc.

Aunque muchas veces no se han considerado a las levaduras como un componente principal en la microbiota del queso, esto también depende del tipo de queso. Se conoce bien el papel de las levaduras en el desarrollo de aromas y sabores durante la maduración en muchos tipos de quesos, principalmente madurados. (Fleet, 1990)

Se han reportado a las especies *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, etc., como productoras de enzimas lipolíticas y/o proteolíticas para metabolizar las proteínas y la grasa de la leche o el queso. Por tanto estas especies tendrán una gran importancia en el desarrollo del aroma y sabor durante la maduración de los quesos (Fleet, 1990; Fox, 1987; Bolumar et al., 2008).

Hay un grupo de quesos que se caracterizan por tener una maduración adicional desde la superficie del queso hacia el interior. Quesos como el Limburger, Tilsiter, Port Salut, Trappist, Brick y el Danbo danés entrarían dentro de este grupo. La microbiota típica de estos quesos esta representada por especies de levaduras como *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Candida zeylanoides* (Fleet, 1990; Eliskases-Lechner and Ginizinger, 1995., Petersen et al., 2001).

Las levaduras que han sido asociadas en el desarrollo de la maduración del queso St. Nectaire han sido: *Debaryomyces hansenii*, *Torulopsis sphaerica*, *T. candida* y *Kluyveromyces lactis*, *Candida sake*, *C. intermedia*, y *Yarrowia lipolytica*. Se ha documentado también la aparición secuencial de levaduras en la corteza y en la cuajada en el queso St. Nectaire sin inocular cultivos iniciadores. Inicialmente predominan levaduras del género *Debaryomyces* y *Torulopsis*, tras esta etapa se suceden el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras (*Mucor* y *Geotrichum candidum*). A partir de los 20 días,

hasta el final de la maduración se observan bacterias coryneformes de los géneros *Arthrobacter* y *Brevibacterium* (Marcellino *et al.*, 1992).

La aparición de levaduras como *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* y otras especies de levaduras fueron reportadas en el queso Gouda (Welthagen and Viljoen, 1998).

En el queso Cheddar se monitoreó durante 48 horas la progresión de las diferentes especies de levaduras durante las etapas de elaboración y maduración. Las especies dominantes fueron *Debaryomyces hansenii* y *Cryptococcus albidus*, y las especies menos numerosas fueron *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula minuta*, *Torulaspora del brueckii*, *Rhodotorula glutinis* y *Kluyveromyces marxianus* (Welthagen and Viljoen., 1999).

En el queso Mozzarella los compuestos volátiles y ácidos orgánicos responsables del sabor son producidos por una mezcla de microorganismos. En particular *K. marxianus* y *K. lactis* que metabolizan la lactosa contribuyendo a la formación de CO₂ y compuestos del sabor como etanol, acetaldehído y acetato de etilo (Dahl *et al.*, 2000).

En el queso Camembert, las levaduras que comúnmente crecen sobre la superficie son las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *K. lactis* y *D.hansenii*. (Beresford *et. al*, 2001).

En el caso del queso madurado Fiore Sardo ("Flor de Cerdeña) que se elabora con leche de oveja se encontraron principalmente las especies *K. lactis*, *G. candidum* y *C. zeylanoides* (Fadda *et al.*, 2004).

En otro estudio sobre la identificación de levaduras asociadas a productos lácteos (yoghurt, queso fresco, queso madurado, cuajada,...) la levaduras aisladas más frecuentemente fueron *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides* (Lopandic *et al.* 2006).

Como se ha visto hasta ahora los microorganismos son de suma importancia en la maduración exclusiva y características específicas (organolépticas y sensoriales) de cada tipo de queso, esto crea la necesidad de conocer la composición microbiana de los

alimentos artesanales tradicionales con el fin relacionar un microorganismo o un grupo de ellos con cualidades que son deseables en el producto final.

9. DIVERSIDAD MICROBIANA

Durante mucho tiempo no se le dió demasiada importancia a los microorganismos, desde hace aproximadamente 300 años cuando Antonie van Leeuwenhoek inventó el microscopio se comenzó a tener evidencias sobre los procariotas y algunas de sus morfologías. A partir de este evento se comenzaron a desarrollar mejoras microscópicas y técnicas de laboratorio básicas. Cohn, Pasteur y Koch fueron los pioneros en el campo de la microbiología a partir del descubrimiento de endosporas resistentes (Cohn), del desarrollo de procedimientos de esterilización (Pasteur), de la introducción de medios solidificados con agar y del concepto de aislamiento de cultivos puros de microorganismos (Koch). A partir de aquí los microorganismos comenzaron a ser caracterizados y/o clasificados principalmente por criterios morfológicos y nutricionales.

De estos descubrimientos surgieron herramientas para el desarrollo de la taxonomía bacteriana y de la genética, también la utilización de cultivos enriquecidos y de técnicas analíticas permitió profundizar en la fisiología y bioquímica microbiana. El resultado fue la relación de algunos microorganismos y la enfermedad. En el siglo XX se conocieron numerosas aplicaciones de los microorganismos como la síntesis de antibióticos y la producción de enzimas y productos químicos (Keller and Zengler, 2004).

Llega un momento en el que la clasificación morfológica o nutricional de los microorganismos se vuelve insuficiente ya que fracasa a la hora de elaborar una taxonomía natural acorde con las relaciones evolutivas pero el uso de técnicas moleculares comenzó a elucidar estas relaciones.

Los microorganismos ocupan importantes nichos en todos los ecosistemas. Cumplen funciones únicas en los ciclos biogeoquímicos, en la formación del suelo, en la regulación del clima, en la composición atmosférica, etc., pero siguen existiendo una gran cantidad de

ambientes todavía sin explorar y que podrían ser el reservorio de microorganismos con funciones de importancia para la biotecnología.

Por tanto el estudio de la diversidad microbiana de diferentes ambientes puede llevar al conocimiento y descubrimiento de microorganismos que pueden ser utilizados en procesos biotecnológicos como la fabricación de nuevos antibióticos u otros agentes terapéuticos, nuevos productos químicos, enzimas o polímeros para su uso en aplicaciones industriales y científicas, para la biorremediación de ambientes contaminados, para el biotratamiento y recuperación de minerales. Por tanto el conocimiento y la comprensión de la diversidad y ecología microbiana se hace necesaria (Keller and Zengler, 2004).

El empleo de técnicas convencionales para el aislamiento y la identificación de los microorganismos en un ambiente dado es muy limitado ya que muchos de estos no pueden ser aislados en los medios de cultivo tradicionales, sólo un pequeño porcentaje de estos son recuperados. Por ello surge la necesidad de utilizar técnicas moleculares basadas en el análisis de secuencias parciales o totales del ADNr. (Díaz y Wachter, 2003)

El uso de técnicas moleculares desde hace aproximadamente 20 años mostró que de los diferentes hábitats, sólo una muy pequeña parte de los microorganismos habían sido aislados, cambiando así la percepción de la diversidad microbiana y dándole un papel mucho más importante que el que había tenido hasta ahora. (Pace, 1997)

Para el estudio de la diversidad microbiana de diferentes ambientes (suelo, sedimentos marinos, ríos, alimentos, rumen, aguas termales, etc.), se han utilizado técnicas moleculares como:

- FISH (Hibridación *in situ* fluorescente)
- DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante)
- TGGE (Electroforesis en gel con gradiente de temperatura)
- RFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción)
- ARDRA (Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado)
- Ribotipificación

Algunos de estos métodos se explicarán con mayor detalle en la siguiente sección.

10. MÉTODOS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN ALIMENTOS FERMENTADOS.

Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en los alimentos es importante un estudio con un enfoque ecológico. La caracterización fenotípica (tradicional) de levaduras puede llevar a una identificación insuficiente debido a que los estudios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos son a menudo difíciles de interpretar. (Lopandic *et al.*, 2006).

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación, esto ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana. Se sabe que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales. Muchas veces no se conocen las condiciones de cultivo de determinados microorganismos para su crecimiento o este depende de las actividades de otros microorganismos. El crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie pueden estar determinados por la presencia de otras especies, por ello se crea la necesidad de tomar en cuenta el ecosistema completo. (Díaz y Wachter, 2003)

Con el desarrollo, en los últimos años, de diferentes métodos moleculares sobre estudios de ADN comparativo se ha llegado a una gran agudización y aseguramiento en la caracterización e identificación de las levaduras u otros microorganismos. (Lopandic *et al.*, 2006).

Los alimentos fermentados, especialmente los que se producen de forma natural, como en el caso del queso Cotija, se obtienen mediante fermentaciones espontáneas, es decir no se añaden inóculos sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento. El uso de los métodos convencionales para la identificación de cada uno de sus miembros resulta insuficiente. Una alternativa para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos es aislar microorganismos y tipificarlos; otra es utilizar métodos que no dependan del cultivo, en los que se extraen los ácidos nucleicos directamente del alimento. (Díaz y Wachter, 2003)

A continuación se detallaran algunas de las metodologías moleculares utilizadas para conocer la diversidad en alimentos:

10.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Es una técnica muy utilizada en la biología molecular. Su fundamento es amplificar fragmentos de ADN de los que se conoce sus secuencias flanqueantes o sólo una de ellas. Es muy efectiva para obtener grandes cantidades de una secuencia específica de ADN *in vitro*. Está reacción “funciona” de igual forma a como lo hace la maquinaria de replicación del ADN de los organismos *in vivo* y necesita los mismos requerimientos que ésta. La PCR puede amplificar hasta un billón de veces, mediante un proceso de ciclos sucesivos de replicación, como si la célula *in vivo* replicará el ADN una y otra vez (Perera *et al.*, 2002.). Algunas de las aplicaciones de la PCR para el estudio e identificación de la diversidad microbiana serían: DGGE, TGGE, PCR-*multiplex*, PCR anidada, Ribotipificación, AFLP, ARDRA, RFLP,...

10.2 Diversidad microbiana basada en secuencias conservadas:

Ciertas subunidades de los ribosomas se utilizan como cronómetros evolutivos (indicadores de cambios evolutivos). Se puede medir la distancia evolutiva entre dos organismos por diferencias en la secuencia de nucleótidos. Los genes más utilizados para medir distancias evolutivas son los genes que codifican para el ARN ribosomal (ADNr). Estos genes son funcionalmente constantes, se encuentran distribuidos universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos.

En el caso de procariontes, el ADN ribosomal (ADNr) más utilizado es el 16S, y en eucariotes el 26S ya que tiene más información (Díaz y Wachter, 2003).

Para la identificación de los microorganismos, basada en la comparación de secuencias de nucleótidos de genes individuales, los genes que codifican para el ARN ribosomal (ARNr) son los más utilizados.

Las moléculas de ARN de las subunidades ribosómicas son utilizadas para establecer relaciones filogenéticas y para descubrir gradaciones sutiles en las relaciones evolutivas.

Esto debido a:

- Están codificadas en los genomas de todos los organismos.
- Los ARNr tendrán secuencias muy semejantes en especies muy relacionadas y diferirán mucho en aquellas especies más distantes.
- Son mosaicos, es decir tienen secuencias muy conservadas entre las especies, mientras que otras son variables. Las regiones conservadas nos servirán para la alineación con cebadores universales y las variables nos indicarán diferencias en las secuencias (McKee and McKee, 2003).

Identificación de levaduras basada en secuencias conservadas:

En las levaduras, normalmente se utiliza como blanco para la identificación el dominio D1/D2 de la región 26S del ARNr. El dominio D1/D2 muestra diferencias entre levaduras por lo que podrá ser utilizado en la predicción de las relaciones intra- o interespecie (Lopandic *et al.*, 2006). Este dominio es relativamente pequeño (aproximadamente 600pb), lo que permite obtener información del mismo sin dificultar su secuenciación. El dominio D2 es de los más variables del gen (D1-D12) y es pequeño, éste es adyacente a D1 que está altamente conservado. La amplificación de este dominio, D1/D2, posibilita la identificación hasta el nivel de especie (Michot and Bachellerie, 1987; Michot *et al.*, 1990; Ruíz Linares *et al.*, 1991; Nunn *et al.*, 1996; Kurtzman and Robnett, 1998).

10.3 PCR-DGGE para el estudio de las comunidades microbianas:

Esta técnica es muy utilizada para estudiar las comunidades microbianas presentes en alimentos fermentados. El estudio se hace mediante la obtención de ADN directamente a partir del alimento de modo que podremos estudiar los microorganismos que se encuentran en el alimento, en este caso el queso Cotija, que puede que no obtengamos por medios de cultivo selectivos ya que no se puede “imitar” o no se conocen las condiciones en las que los

microorganismos crecen en este queso. Tal vez haya microorganismos que sólo son capaces de crecer en su micro- o macroambiente determinado por las características del alimento o por la presencia de otros microorganismos dentro de este.

La metodología general a seguir sería (Figura 8): (1) Extracción directa del ADN del alimento. (2) Amplificación por PCR de los genes que codifican para la subunidad 26S del ARNr en el caso de eucariotas y de la 16S en el caso de procariontas. Los amplicones obtenidos tendrán el mismo tamaño. (3) Separación de los fragmentos de PCR (amplicones), con base en la secuencia, en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE). La separación de los fragmentos mostrará un patrón de bandas o “huellas génicas” de los microorganismos en las que deberemos interpretar la información dada. (4) Análisis del patrón de bandas. (5) Identificación de los microorganismos dados por las bandas de interés.

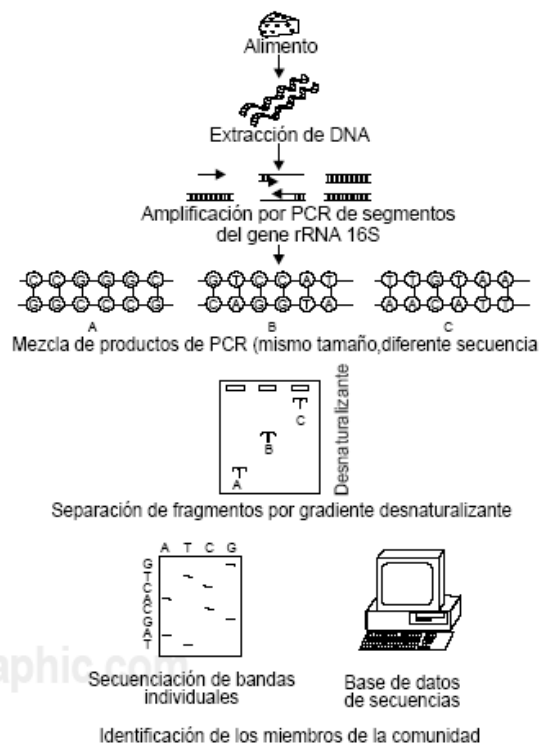


Figura 4. Obtención de “huellas digitales” de comunidades microbianas en alimentos fermentados por el método DGGE.

Figura 8. Obtención de “huellas digitales” de comunidades microbianas en alimentos fermentados por el método de DGGE (Díaz *et al.*, 2003).

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE):

El DGGE es una técnica para obtener un patrón de bandas conocidas como “huellas génicas o digitales” que nos muestran la diversidad genética de una comunidad microbiana. Fue introducida por Muyzer en 1993 (Muyzer *et al.*, 1993). También se ha aplicado en la detección de mutaciones a nivel del ADN genómico (Dolinsky, 2002).

Permite separar fragmentos de la misma longitud pero con diferente secuencia obtenida mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales del ADN de una comunidad microbiana. (Díaz and Wachter, 2003).

Mediante esta técnica es posible separar fragmentos que difieren en una sola base. Los agentes desnaturizantes utilizados son una mezcla de urea y formamida, que provocan la separación de las cadenas dobles de ADN. Estas contienen dominios con temperaturas de fusión (T_m) característicos, de manera que cuando se alcanza una concentración de desnaturizante (DGGE), la molécula se funde parcialmente y disminuye su velocidad de migración en el gel.

Las temperaturas de fusión de esos dominios dependen de variaciones en sus secuencias de bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (Muyzer and Smalla, 1998).

Para evitar la separación completa de las dos cadenas, se une una secuencia rica en GC que requiere condiciones más drásticas de desnaturización. Esta secuencia se conoce como **grapa-GC** situada en el extremo 5' de uno de los cebadores, que se coamplifican con el segmento de ADN (Sheffield *et al.*, 1989; Sheffield *et al.*, 1992).

La secuencia rica en GC actúa como un dominio de alta fusión previniendo a las dos cadenas del ADN la disociación completa en dos cadenas simples (Muyzer *et al.*, 1997).

Las bandas se pueden visualizar tificando con bromuro de etidio o con plata. La tinción con plata es más sensible.

Es necesario determinar cuál de las regiones variables de los genes ribosomales permiten separar los microorganismos presentes mediante la amplificación con cebadores específicos.

Por otro lado también se debe *optimizar el gradiente desnaturalizante* para obtener la mejor separación de las bandas. Para ello se realizan geles en gradiente perpendiculares (Figura 9), donde el gradiente de desnaturalización es perpendicular a la electroforesis. Se obtiene una curva sigmoidea en la que a baja concentración de desnaturalizante los fragmentos migran como cadenas dobles y a concentraciones altas como cadenas sencillas. Las condiciones que nos interesan de la curva sigmoidea son las intermedias en las que las moléculas se funden parcialmente. El tiempo óptimo, que se determina en electroforesis con gradientes paralelos (Figura 9), es el que permite la máxima resolución entre los fragmentos de ADN (Muyzer *et al.*, 1998).

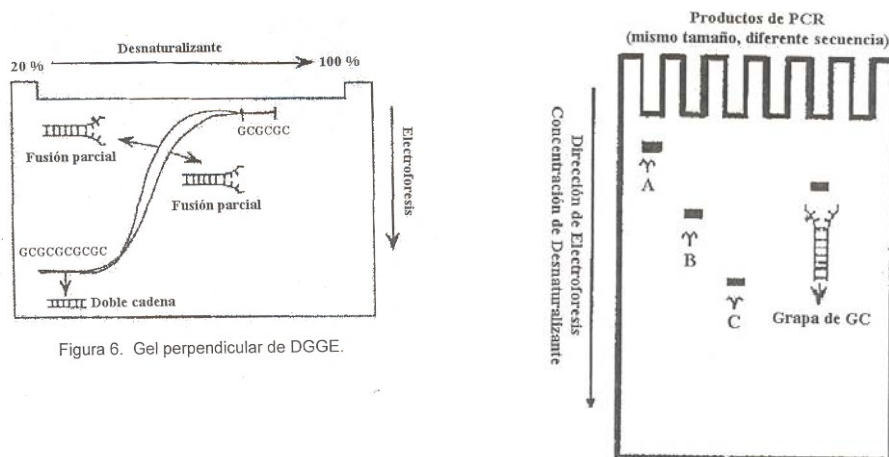


Figura 6. Gel perpendicular de DGGE.

Figura 9: DGGE. Perpendicular (1) y Paralelo (2) (Manual Biorad Dcode Universal Mutation Detection).

DGGE aplicado en alimentos:

Esta técnica se ha aplicado en diferentes alimentos fermentados artesanales, se muestran a continuación algunos ejemplos.

Investigaron la distribución espacial de la microbiota de una bola de pozol utilizando un enfoque polifásico que incluyó la obtención de “huellas digitales” por DGGE de fragmentos

de ADN obtenidos al amplificar la región V3 de los genes de RNA 16S del ADN extraído de la masa, con cebadores específicos para eubacterias. Demostraron que bacterias del género *Streptococcus*, que no habían sido detectadas utilizando los métodos tradicionales de cultivo, predominan durante la fermentación. *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* constituyeron otro grupo predominante y también se encontraron Lactococos y miembros del grupo *Leuconostoc Weissella* (Ampe *et al.*, 1999). Otro estudio utilizó el mismo enfoque para estudiar la dinámica de la población microbiana durante la fermentación de este mismo alimento (Ben Omar *et al.*, 2000). También se ha aplicado al estudio del perfil de la dinámica de las levaduras durante la fermentación de vino (Cocolin *et al.*, 2000). Este mismo tipo de estudio se aplicó a muestras de leche cruda (Cocolin *et al.*, 2002).

Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE):

Tendría las mismas bases que la técnica de DGGE pero en este caso la separación de la doble cadena de ADN se dará cuando se alcance una determinada temperatura disminuyendo la velocidad de migración en el gel.

También puede utilizarse para el análisis de mutaciones en ADN genómico (Chen *et al.*, 1999) y de la biodiversidad en una comunidad microbiana, por ejemplo ha sido utilizado en el estudio de la diversidad de bacterias ácido acéticas en la producción de vinagre tradicional (Ilabaca *et al.*, 2008).

10.4 PCR-Endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia de ADN entre 4-8 pb. El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra conductora (sense) y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria (antisense).

Se pueden utilizar las enzimas de restricción para crear perfiles discriminatorios entre secuencias de ADN. También mediante el patrón de restricción se pueden identificar, en algunos casos, a nivel de género y/o especie.

Cuando una molécula de ADN es cortada con una endonucleasa de restricción se obtienen diferentes fragmentos. Estos fragmentos pueden separarse por su diferente tamaño con electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida dando un patrón de bandas que podrá ser analizado (Lewin, 2002).

Un metodología comúnmente utilizada para la identificación de levaduras es el análisis de restricción de los genes del ADN ribosomal. (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zaroso *et al.*, 1999). Esta técnica consta de dos pasos: La amplificación del ADN ribosomal y el sometimiento de éste a enzimas de restricción. (Hierro *et al.*, 2004)

Algunas técnicas moleculares basadas en este principio se explican a continuación:

ARDRA (Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado)

Este método está basado en la obtención de ADN ribosomal mediante la amplificación por PCR de productos de ADN de microorganismos aislados usando cebadores universales. El producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa, después se estudia el patrón de bandas (Díaz y Wachter., 2003)

ITS-PCR (RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)

Se refiere a secuencias específicas de [nucleótidos](#) en el [ADN](#) que son reconocidas por las [enzimas de restricción](#) y que varían entre los individuos de una población. (Díaz y Wacher., 2003). Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el ADN de diferentes individuos de una población, por lo que se dice que la población es [polimórfica](#) para estos fragmentos de restricción.

La técnica RFLP se usa, muchas veces, como marcador para identificar grupos particulares de personas con riesgo a contraer ciertas enfermedades genéticas, en ciencia forense, en

pruebas de paternidad y en otros campos, ya que puede mostrar la relación genética entre individuos. (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RFLPs.html>)

La amplificación por PCR de la región comprendida por los dos espaciadores internos transcritos (ITS) y el gen ribosomal (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) seguida del análisis de restricción y/o de la secuenciación ha sido estudiada para la tipificación de varias especies de levaduras (Petersen, 2001). La técnica abarca la obtención del ADN de levaduras aisladas, la amplificación de la región ITS y la digestión con enzimas de restricción. La mezcla de restricción se resuelve en un gel de agarosa y se estudia el patrón de fragmentos obtenido.

El interés de esta técnica para la identificación de especies de interés biotecnológico deriva de la facilidad relativa de manipulación y la alta reproducibilidad de ésta (Fernández-Espinar *et al.*, 2000).

11. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA DE LOS QUESOS MADURADOS:

11.1 Análisis microbiológico:

En un estudio anterior, se hicieron recuentos microbiológicos y se midió la actividad acuosa a diferentes tiempos de maduración en dos muestras diferentes de queso pertenecientes a la asociación regional de productores del queso Cotija. Los resultados de muestran a continuación (Tabla 4):

Tabla 4: Cuenta de coliformes y actividad acuosa en el queso Cotija
(Bravo, 2008).

Muestra	Tiempo desde la elaboración (días)	Coliformes (NMP/g _{queso})	a w
TINAJA	(t ₀) 20	447	914
	(t ₁) 38	12	89
	(t ₂) 58	<3	88
	(t ₃) 78	<3	87
	(t ₅) 101	<1	79
STA. MARIA	(t ₀) 15	1.43 x 10 ⁶	91
	(t ₁) 33	9.32 x 10 ⁵	91
	(t ₂) 53	1.21 x 10 ⁵	9
	(t ₃) 73	2.13 x 10 ⁵	89
	(t ₅) 96	<3	88

El análisis microbiológico muestra una disminución de los microorganismos coliformes aunado a una disminución del a_w a lo largo de la maduración. Esta disminución en la cuenta de coliformes es muy importante ya que el consumo del queso Cotija se da a partir de los tres meses de maduración donde la cuenta de coliformes ya no es significativa dando a las características de este queso una mejor calidad sanitaria.

11.2 Determinaciones fisicoquímicas en el queso Cotija:

Las determinaciones fisicoquímicas que se hicieron en este trabajo pertenecen a las mismas muestras con las que se va a trabajar en el presente proyecto por lo tanto serán relevantes para este estudio. Estas muestras pertenecen a la Marca Colectiva

“Queso Cotija Región de Origen” de las sierras Jalisco y Michoacán (Hernández, 2007).

a_w : Se observan diferencias significativas en cuanto a la a_w de algunas de las muestras analizadas. Los valores se encuentran entre 0.89-0.90, aunque este intervalo puede cambiar a lo largo de la maduración, ya que se va perdiendo humedad disminuyendo así la actividad acuosa. Estos valores favorecerán, en parte, a la calidad del queso ya que muchos de los microorganismos patógenos, provenientes de la leche cruda, no podrán crecer.

pH: Se observa, que todos los quesos de la región Jalisco-Michoacán (1-8) se encuentran dentro de un rango de pH de 4.8-5.2.

Acidez: Oscila en un rango de 0.20%-0.32% de ácido láctico. Se observa una gran diferencia en el contenido de ácido láctico que no se ve reflejada en el pH, esto puede ser debido a la producción de otros metabolitos que neutralizan el ácido, como por ejemplo la liberación de amoníaco producida por proteólisis.

Humedad: El rango de humedad entre las muestras, se encuentra entre los valores 32-40 %. Esta diferencia de humedad entre las muestras puede ser debido a diferencias en el proceso de elaboración.

Cloruros: El queso Cotija es un queso salado. Los quesos de la “Asociación regional de productores de queso Cotija”, se encuentran en un intervalo de cloruros de 4-7.5%, por tanto corresponde con el de la bibliografía, 6 % aproximadamente (Villegas, 2004). Considerando estas determinaciones fisicoquímicas, podemos suponer que un grupo importante de la microbiota va a ser el de las levaduras, ya que son osmófilas u osmotolerantes, es decir pueden crecer a un a_w bajo y con una alta concentración de NaCl. En cuanto al pH, también es favorable para el crecimiento de las levaduras ya que son acidófilas.

Con base en estos antecedentes y con el conocimiento de que las levaduras son de gran importancia en la maduración de los quesos para la formación de aromas y sabores, se pretendió conocer la diversidad de levaduras presentes en el queso Cotija.

12. JUSTIFICACIÓN:

En el grupo de trabajo, se están haciendo varios estudios simultáneamente sobre la diversidad, identidad y dinámica microbiana presente en el queso Cotija de regiones que pertenecen a la Marca Colectiva “*Queso Cotija Región de Origen*”^{MR} comparado con regiones que no pertenecen a esta Marca Colectiva. Todos ellos encaminados a determinar las diversidad bacteriana.

La diversidad microbiana de este alimento puede depender de las relaciones complejas entre sus componentes, también puede depender de la relación entre los componentes y los microorganismos del alimento o la interrelación entre estos últimos en el alimento.

Estos estudios se han llevado a cabo mediante métodos moleculares en base a los microorganismos cultivables y no cultivables con el fin de poder profundizar en las características del alimento (sensoriales, nutrimentales y funcionales) y en la comprensión de la diversidad microbiana en éste.

En este proyecto se pretende estudiar e identificar por primera vez la población de levaduras que están presentes en el queso Cotija y que se presume que son importantes en el proceso de maduración y fermentación.

13. HIPÓTESIS

Como probablemente existen levaduras que no pueden crecer en medios de cultivo porque tienen requerimientos complejos para su crecimiento, entonces la diversidad de éstas obtenida por el método independiente de cultivo será mayor.

14. OBJETIVO

Objetivo general:

Identificación de levaduras presentes en el queso Cotija por medio de métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo

Objetivos particulares:

-Aislamiento y secuenciación de levaduras en medios de cultivo generales y diferenciales a partir de ocho muestras de queso Cotija con, al menos, tres meses de maduración

- Detección de las actividades proteolítica y lipolítica en las colonias de levaduras aisladas de las muestras de queso Cotija

-Obtención, a partir de la técnica de DGGE, de un patrón de bandas característico de la población de levaduras representadas en las muestras de queso Cotija

-Búsqueda de correspondencia y/o exclusividad mediante la comparación, por medio de la técnica de DGGE, del perfil de bandas de la población de levaduras obtenido a partir de las muestras de queso por el método dependiente e independiente de cultivo.

-Comparación de los patrones diferenciales obtenidos a través del patrón de restricción mediante las técnicas moleculares ARDRA y RFLP, del patrón de migración obtenido por DGGE y de la morfología colonial.

Identificación de la levaduras más representativas obtenidas por los diferentes métodos por medio de la secuenciación de la región D1/D2 del gen ADNr 26S

15. MATERIALES Y MÉTODOS:**15.1 Muestras:**

Las muestras con las que se trabajó pertenecen a regiones productoras de los estados de Jalisco y Michoacán. Los productores de las diferentes muestras pertenecen a la asociación de la Marca Colectiva de “Queso Cotija Región de Origen”. Todas las muestras tenían al menos 3 meses de maduración. Se partió para este estudio de ocho muestras de queso Cotija enlistadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Muestras estudiadas y recolectadas de municipios ubicados en la Sierra JalMich.

Muestra	Municipio	Estado
1	La Troja. Municipio de Quitupan	Jalisco
2	Quitupan	Jalisco
3	Rodeo. Municipio Tocumbo	Michoacán
4	Lourdes. Municipio Cotija de la Paz	Michoacán
5	La mesa del Aguacate Quitupan	Jalisco
6	Santa Maria del Oro	Jalisco
7	Lourdes. Municipio Cotija de la Paz	Michoacán
8	La Tinaja. Municipio Cotija de la Paz	Michoacán

Para el análisis de cada queso se tomó una muestra (1 Kg.) de la pieza original (aproximadamente 20 Kg.). El corte se hizo transversalmente con un cuchillo desde el centro hacia la superficie. Cada muestra se desmenuzó eliminando la corteza y se guardó en una bolsa estéril de plástico a -70 C° hasta su uso.

Esquema de la metodología general a seguir:

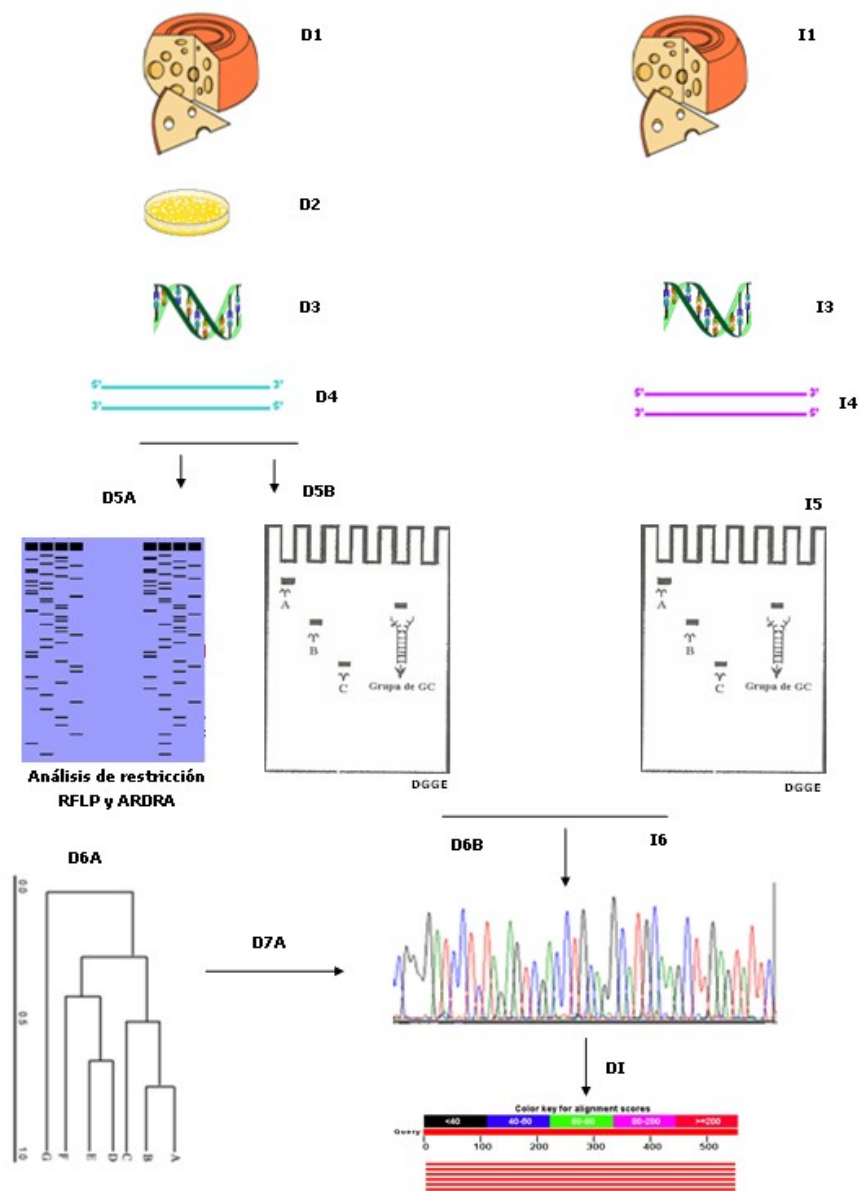


Figura 10. Metodología general. Método dependiente de cultivo (D) e independiente (I). **D1 e I1**, Muestreo. **D2**, Aislamiento de levaduras en los medios de cultivo PDA, MEA y WL. **D3**, Extracción y purificación del ADN de las levaduras aisladas. **I3**, Extracción y purificación del ADN total de cada muestra de queso. **D4**, Amplificación del ADNr por PCR utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (RFLP) para la región ITS, y NL1 y NL4 para el dominio D1/D4 del 26S (ARDRA). **I4**, Amplificación del ADNr usando los cebadores NL1 clamp y LS2. **D5A**, Análisis de restricción de la región ITS (Hae III, Hinf I y Cfo I) y de la región 26S (Hae III, Hinf I y Mbo I). **D5B e I5**, DGGE. **D6A**, Dendrograma basado en el análisis de restricción. **D6B, I6 and D7A**, Secuenciación de amplicones. **DI**: Comparación de las secuencias vs. las bases de datos e identificación.

Estrategia general del método dependiente de cultivo:

En la figura 10 se muestra un diagrama de la metodología que se siguió, a continuación se enlistan los pasos principales a seguir para llevar a cabo el método dependiente de cultivo.

- Utilización de medios selectivos (MEA, PDA¹) para el aislamiento de levaduras de las 8 muestras diferentes de queso Cotija a partir de diluciones 1:10 decimales.
- Inocular las colonias en el medio WL para hacer la diferenciación morfológica.
- Tomar las colonias más representativas para el análisis subsecuente.
- Verificar microscópicamente la pureza de las colonias.
- Extracción y purificación del ADN de las colonias aisladas.
- Amplificar de cada colonia aislada el dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S con los cebadores NL1 y NL4.
- Amplificar de cada colonia aislada la región ITS (Internal Transcribed Spacers) con los cebadores ITS1 e ITS4 que incluye el gen ribosomal del 5.8S y los dos espaciadores internos transcritos con los cebadores ITS1 e ITS4.
- Llevar a cabo un análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA y RFLP).
- Amplificar de cada colonia aislada el dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S con los cebadores NL1 clamp y LS2. Cargar estos amplicones en un gel de DGGE y comparar el patrón obtenido de cada microorganismo con el obtenido en la carga de las muestras de queso obtenidas por el método independiente.
- Amplificar el dominio D1/D2 del gene ADNr 26S de los patrones de restricción más representativos con los cebadores NL1 y NL4.
- Secuenciar los amplicones más representativos.
- Hacer un alineamiento, usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), de la secuencia obtenida con las secuencias de la base de datos GenBank.
- Obtención de los porcentajes de identidad por la comparación de la secuencia a identificar con las secuencias de las bases de datos.

¹Ver componentes de cultivo en tablas Anexo I “Medios de cultivo”

- Identificación de la secuencia cuando el porcentaje de identidad sea superior al 97%.

Estrategia general del método independiente de cultivo:

- Tomar una muestra de cada queso y homogenizar.
- Concentrar los microorganismos eliminando previamente la grasa y la proteína presente en la muestra.
- Proceder a la extracción y purificación del ADN de las 8 muestras de queso.
- Amplificar de cada muestra de queso el dominio D1/D2 del gen del ADN ribosomal 26S con los cebadores NL1 clamp y LS2.
- Comparar por DGGE el patrón obtenido en las muestras de queso con el obtenido de cada microorganismo aislado.
- Cortar las bandas más representativas.
- Clonar y amplificar con los cebadores NL1 y NL4 el dominio D1/D2 del gen ADNr 26S.
- Secuenciar.
- Identificar por comparación de secuencias con las base de datos del GenBank.

15.2 Análisis microbiológico y aislamiento de las levaduras en agar selectivo

Todos los análisis se llevaron a cabo por cuadruplicado.

Se tomaron 15 g de cada queso y se diluyeron en 135 ml de agua peptonada (NOM-110-SSA1-1994). Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. La muestra se homogenizó en un Stomacher Seward 400 a velocidad media durante un minuto.

Los medios utilizados fueron ²:

ACP: Agar cuenta en placa. Para recuento de mesófilos aerobios.

Colibblue: Cuenta coliformes.

MEA: Agar extracto de malta.

² Anexo I "Métodos de cultivo"

PDA: Agar papa dextrosa.

Para el recuento de mesófilas aerobios, levaduras y hongos se utilizó la técnica cuenta en placa y para el recuento de coliformes se utilizó la técnica por microfiltración. (NOM-092-SSA1-1994; NOM-111-SSA1-1994; Millipore).

Estrada (2007), llevó a cabo el recuento de mesófilos aerobios y el de coliformes en el anteproyecto de la tesis. La técnica de microfiltración consiste en hacer pasar una suspensión a través de un filtro de membrana especial que tiene poros de un tamaño lo suficientemente pequeño para retener bacterias ($0.45\mu\text{m}$). Posteriormente el filtro se coloca en un medio sólido en este caso fue un medio especial conocido como Colibblue 24 (Millipore). Se incubó hasta que cada célula forme una colonia separada. Este medio permite observar colonias discretas y diferenciar morfológicamente a *E. coli*, de otros microorganismos coliformes (Estrada, 2007).

Determinaciones:

- Hongos y levaduras:

Cuenta en placa sobre agar papa dextrosa (DIFCO) y en agar extracto de malta (DIFCO), inoculación por extensión en superficie (0.15mL de inóculo de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). Las placas se incubaron durante 5 días a 24°C . Se seleccionaron las placas que presentaban entre 10 y 150 colonias.

- Mesófilos aerobios:

Cuenta en placa sobre agar cuenta en placa (DIFCO), inoculación por extensión en superficie (0.15mL de inóculo de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). Las placas se incubaron durante 24hrs a 37°C . Se seleccionaron las placas que presentaban entre 25 y 250 colonias (Estrada, 2007).

- Coliformes totales:

Para las muestras de queso 1, 2 y 3: Microfiltración de 10 a 20mL de la dilución 10^{-2} . Se consideraron aquellas placas que presenten entre 10 y 80 colonias.

Para las muestras de queso 4, 5, 6, 7 y 8: Microfiltración de 5 a 20mL de la dilución 10^{-2} , y de 50 a 100mL de la dilución 10^{-3} .

Las placas se incubaron durante 24h a 35°C

Se seleccionaron las placas que presentaban entre 10 y 80 colonias (Estrada, 2007).

15.3 Inoculación de las levaduras aisladas en agar selectivo (WLN, AT y LDA)

Con el fin de obtener patrones discriminatorios entre las colonias aisladas en los medios PDA y MEA, se inocularon las colonias de levaduras en diferentes medios detallados a continuación:

La composición de los diferentes medios está detallada en el Anexo I “Medios de cultivo”.

Medio WLN Wallerstein Laboratory Nutrient Agar (WLN): Fue diseñado para observar poblaciones microbianas para procesos de fermentación industrial y para bebidas. Este medio muestra que las principales levaduras encontradas en fermentaciones de vinos pueden ser distinguidas en base al color o morfología colonial (Pallmann et al., 2001). Las colonias previamente aisladas en medio PDA y MEA, y que tenían la misma morfología se inocularon en este medio de color azul-verdoso con el fin de observar diferencias entre ellas.

Medio Agar Tributirina (AT). Se utilizó para corroborar la presencia o ausencia de actividad lipolítica. Se observó la colonia a las 24hr. Las colonias que degradan los triglicéridos mostraron un halo transparente.

Medio Agar Leche Descremada (ALD). Se utilizó para corroborar la presencia o ausencia de actividad proteolítica. Se observó la colonia a las 24hr. Las colonias que degradan la caseína mostraron un halo transparente.

15.4 Metodología para la extracción y purificación del ADN

Se utilizaron dos métodos de análisis de la población de levaduras en los quesos:

Método dependiente de cultivo: se partió de las levaduras aisladas en agar selectivo a partir de las muestras de queso.

Método independiente de cultivo: se partió de las muestras de queso directamente.

Para cada método se utilizaron dos diferentes protocolos de extracción y purificación de ADN respectivamente. Posteriormente se compararon los diferentes protocolos con el fin de optimizar el rendimiento y la eficiencia de la extracción.

Para la extracción del ADN se utilizó un método mecánico con perlas de vidrio y otro enzimático mediante la enzima liticasa para romper la pared celular de las levaduras. Para la purificación del ADN se utilizó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y columnas afines por el ADN.

Para la optimización del método de extracción y purificación del ADN directamente del queso se utilizó la muestra de queso 1. Se comenzó rompiendo la matriz proteica de los quesos con proteasas con el fin de liberar a los microorganismos embebidos en ésta, se homogenizó la muestra y se procedió a ciclos de centrifugación donde se fue eliminando la grasa de la superficie. Después se procedió a la extracción y purificación del ADN, utilizando dos métodos de extracción (perlas de vidrio y liticasa) y dos de purificación (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y columnas de afinidad por el ADN).

A continuación se muestran los detalles de los protocolos que se siguieron:

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN:

Etapa de concentración de microorganismos para la obtención del ADN directamente del queso

Las células de la microbiota del queso a estudiar se encuentran embebidas en la matriz de éste, principalmente formada por proteínas.

En esta etapa se rompe la matriz del queso en la que están embebidas las células de la microbiota formada por bacterias y levaduras principalmente.

Después se homogeniza la mezcla y finalmente se obtienen las células de donde extraeremos el ADN.

Metodología:

1. Se tomaron 15 gr. de cada muestra de queso en la campana de flujo laminar.
2. Cada muestra se recolectó en bolsas de stomacher.
3. Se añadieron 45-50 mL de citrato de sodio a cada muestra.
4. Se añadieron 500 µL de proteasas (neutrasa, Novo Nordisk).
5. Las bolsas de stomacher se incubaron en un baño de agua a 45 ° C durante 1 hr.
6. Se homogenizaron las muestras en el stomacher (Stomacher 400 SEWARD) a máxima velocidad durante 5 mín. o más dependiendo del estado de la muestra.
7. El contenido de cada muestra se dividió en dos tubos de centrifuga (para equilibrar).
8. Las muestras se centrifugaron en el rotor JA-20 de la centrifuga Beckman a 3,500 r.p.m. durante 10 mín.
9. Se eliminó la capa superior de grasa de la superficie con una espátula o una pipeta estéril.
10. Se tomó el sobrenadante y se introdujo en un tubo de centrifuga estéril.
11. Se centrifugó, en rotor JA-20, a 12,000 r.p.m. durante 10 mín.
12. Se eliminó la capa superior de grasa de la superficie con una espátula estéril y el líquido por inversión. Se limpiaron las paredes del tubo con gasa estéril.
13. El pellet obtenido se resuspendió en 300 µL de buffer TE pH 8.
14. El contenido de los dos tubos de centrifuga de cada muestra se mezcló en un mismo tubo de 1.5 mL.
15. Las muestras se almacenaron en congelación. También se puede continuar con el protocolo de extracción del ADN.

Preparación paquete celular para extracción del ADN a partir de colonias aisladas de levaduras

- Se inocularon 1 o 2 asadas de cada colonia en tubos con caldo YPD (10 mL por cepa) o YM.
- Se incuban los tubos 2-3 días en agitación a 250 rpm a temperatura ambiente. También se pueden incuban 18-24 hr a 250 rpm a 30 ° C.
- Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 mín. a 4 ° C
- Se eliminó sobrenadante y se lavaron las células 10 mL de agua (desionizada, filtrada y estéril) agitando hasta Se resuspendió el pellet.
- Se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 mín. a 4 ° C
- Se eliminó sobrenadante y se lavaron las células añadiendo 5 mL de agua, agitando hasta Se resuspendió el pellet.
- Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 mín. a 4 ° C.
- Se resuspendió el pellet en 1 mL de agua desionizada, filtrada y estéril.
- Se continuó la extracción de ADN. También pueden almacenarse en congelación para la posterior extracción.

Extracción del ADN por dos diferentes métodos

En esta etapa se rompen las paredes y membranas celulares de los microorganismos presentes con el fin de poder obtener el ADN.

Extracción del ADN por método mecánico

1. Se centrifugó en microcentrífuga a 14,000 r.p.m. durante 10 mín.
2. Se eliminó sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur
3. Se añadieron 500 µL de buffer de lisis y 200 µL del equivalente en perlas de vidrio (Glass beads, acid-washed 425-600 µM, SIGMA)
4. Se agitó en vortex a máxima velocidad durante 3 mín. para romper las paredes celulares de las levaduras
5. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 65 a ° C o también pueden incubarse termomixer. (30 mín.)
6. Se agitó en vortex a máxima velocidad durante 3 mín.
7. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 65 a ° C o también pueden incubarse termomixer. (30 mín.)
8. Se agitó en vortex a máxima velocidad durante 3 mín.
9. Se añadieron 20 µl de RNasa (20 µg/mL) e incuban durante 30 mín. a 37 ° C
10. Centrifugación en microcentrífuga a máxima velocidad (14,000 r.p.m.) durante 10 mín.

11. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y estéril.

Extracción del ADN por método enzimático

1. Se añadieron 70 μ l de Liticasa (1000 UI/mL) para romper los enlaces β -1,3 glucosa de las paredes de las levaduras.
2. Se agitó con vortex.
3. Incubar durante 30 mín. a 37 ° C.
4. Se agitó en vortex
5. Se añadieron 20 μ L de Proteinasa K (20 μ g/mL)
6. Se dió un pulso con el vortex
7. Se incubó en hielo durante 5 mín.
8. Se añadieron 20 μ L de RNasa (20 μ g/mL)
9. Se dio un pulso con el vórtex
10. Se incubaron las muestras durante 40 mín. a 37 ° C
11. Se añadieron 10 μ L de SDS al 10%
12. Se agitó
13. Se incubaron las muestras durante 40 mín. a 37 ° C
14. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente
15. Se centrifugaron las muestras en microcentrífuga a máxima velocidad (14,000 r.p.m.) durante 10 mín.
16. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y estéril.

Purificación del ADN por diferentes métodos

Purificación del ADN mediante Fenol-Clorofomo-Alcohol-isoamílico

1. Se añadieron a los tubos 2 volúmenes de fenol-clorofomo-alcohol isoamílico 24:25:1(v/v)
2. Se agitó mediante un pulso en vortex (\approx 30 seg.)
3. Se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 10 mín.

El fenol va a desnaturalizar las proteínas asociadas al ADN.

Tendremos tres fases, la fase orgánica o fenólica que quedará abajo, la interfase proteínica y la fase superior donde se encontrarán los ácidos nucleicos.

4. Se tomó la fase superior y se transfirió a un tubo nuevo y estéril.
5. Repetimos los pasos anteriores (1-3) en el caso de que la fase superior esté turbia.

6. Añadimos 1.5 volúmenes de cloroformo al 100% (v/v). Esta etapa va a eliminar la fase fenólica.
7. Se agitó mediante un pulso en vortex (≈ 30 seg.)
8. Se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 5 mín.
9. Se transfirió la fase superior a un tubo de 2 mL nuevo y estéril.
10. Se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de amonio 3M (v/v).
11. Se agitó en vortex 30 seg.
12. Se añadieron 2 volúmenes de etanol frío (-20 °C a 4 °C) al 100% (v/v).
13. Las muestras se almacenaron en congelación toda la noche.
14. Se centrifugó 5 mín. a 14 r.p.m.
15. Se eliminó el sobrenadante por inversión.
16. El pellet obtenido (ADN precipitado) se lavó con 1 mL de etanol al 70% (almacenado en refrigeración) adicionándolo lentamente por las paredes del tubo. Se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 5 mín. y Se descartó por inversión el etanol
17. El pellet se dejó secar unos 30 mín.
18. La pastilla de ADN (pellet) se diluyó en 1000 μ L de agua filtrada desionizada estéril.
19. Los tubos se incubaron a 55 ° C durante 15 mín.
20. Las muestras se almacenar en congelación para su posterior uso.

Purificación del ADN mediante columnas de afinidad por el ADN

Para este método se siguieron los protocolos especificados en los kits comerciales (*High Pure PCR Product Purification Kit. Roche Applied Science; Kit Stool. QIAGEN*)

1. Se transfirió el ADN a un tubo estéril de 1.5 μ L.
2. Se añadieron 500 μ L de buffer de unión (*buffer binding*)
3. Se mezcló bien
4. Se pasó la mezcla a la columna.
5. Se centrifugó a 13,000 xg. durante 1 mín.
6. Se descartó el eluido
7. Se añadieron 500 μ L del buffer de lavado (*Wash buffer 1X*)
8. Se centrifugó a 13,000 xg. durante 1 mín.
9. Se descartó el eluido
10. Se añadieron 200 μ L del buffer de lavado (*Wash buffer 1X*)
11. Se descartó el eluido
12. Se colocó la mezcla en un tubo nuevo y estéril de 1.5 μ L

13. Se añadieron 50 μL de buffer de elución a 60 ° C o agua en el caso de que se vaya a secuenciar
14. Se centrifugó a 13,000 xg. durante 1 mín.
15. Las muestras se almacenaron en congelación para su posterior uso

Nota: Para el método de extracción Liticasa + Perlas, al pellet obtenido a partir de los lavados de las células se le añadió liticasa y se incubó como en los anteriores casos, después se centrifugó (14000 r.p.m 10 mín.), se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió con buffer de lisis, después se añadieron las perlas y se hizo la extracción tal y como se especifica en el protocolo mecánico.

Una vez optimizado el protocolo de extracción y purificación del ADN para los dos diferentes métodos (dependiente e independiente), se procedió a la extracción y purificación del ADN de las muestras a estudiar.

15.5 Determinación de la concentración y pureza del ADN total

Para determinar la concentración y pureza del ADN obtenido por los diferentes protocolos se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Con estas determinaciones se evaluó el grado de pureza y la concentración (ng/ μL o $\mu\text{g}/\text{mL}$) del ADN extraído. El índice de pureza se midió a partir del cociente A_{260}/A_{280} . Para un índice de pureza óptimo el valor del cociente debe estar en un intervalo de 1.7-2.0. El valor de concentración del ADN se calculó a partir de la medida de absorbancia a 260 nm, aplicando la relación (ley de Lambert-Beer):

$$[\text{ADN}] \square \mu\text{g}/\text{mL} = A_{260} * 50 \mu\text{g}/\text{mL} * \text{factor de dilución}$$

Los 50 $\square \mu\text{g}/\text{mL}$ corresponden a la conversión espectrofotométrica de una unidad de ADN de doble cadena.

Para observar gráficamente la calidad del ADN se hizo un barrido del ADN total de las muestras de queso. Un pico en 260 nm indica que el ADN tiene una calidad óptima.

15.6 Cebadores utilizados para la amplificación por PCR del ADN obtenido del queso Cotija por el método dependiente e independiente de cultivo.

Dependiendo de la región a amplificar y la posterior aplicación se utilizaron diferentes cebadores. A continuación se muestran los cebadores utilizados:

Tabla 6. Cebadores utilizados para las diferentes reacciones de PCR

Región amplificada o secuencia blanco	Cebador / sentido	Secuencia	Tamaño del amplicón aprox.	Aplicación	Referencia
D1/D2 del ADNr 26S	NL1 clamp (Directo)	*5'GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCG GCG GGC CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG	250 pb	DGGE	Cocolin <i>et al.</i> , 2000
	LS2 (Inverso)	5'ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC			
D1/D2 del ADNr 26S	NL1 (Directo)	5'GCATATCAATAAGCGGAG GAAAAG	600 pb	ARDRA, Secuenciación	Lopandic <i>et al.</i> , 2006
	NL4 (Inverso)	5'GGTCCGTGTTTCAAGACG G			
ITS	ITS1 (Directo)	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG	400-900 pb	RFLP	Fernández-Espinar <i>et al.</i> , 2000
	ITS4 (Inverso)	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC	400-900 pb	RFLP	Fernández-Espinar <i>et al.</i> , 2000

* Nota: La secuencia grapa para DGGE aparece en la secuencia directa del cebador en negrita.

15.7 Programas del termociclador para la amplificación por PCR

A continuación se muestran los diferentes programas para el termociclador Perkin Elmer 2400, dependiendo del par de cebadores, las referencias son las mismas que las de la Tabla 6.

Tabla 7: Programa del termociclador para cebadores NL1 clamp y LS2 (Cocolin *et al.*, 2002).

Ciclo	Etapa	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95 ° C	5 min
2-29	Desnaturalización	95 ° C	1 min
	Alineamiento	52 ° C	45 seg
	Extensión	72 ° C	1 min
30	Extensión final	72 ° C	7 min

Tabla 8: Programa del termociclador para cebadores NL1 y NL4
(Cocolin *et al.* 2002).

Ciclo	Etapa	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización	95 ° C	5 min
1-40	Desnaturalización	94 ° C	1 min
	Alineamiento	55.5 ° C	2 min
	Extensión	72 ° C	2 min
	Extensión	72 ° C	10 min

Tabla 9: Programa del termociclador para cebadores ITS1 y ITS4
(Fernández-Espinar *et al.*, 2000).

Ciclo	Etapa	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95 ° C	12 min
	Desnaturalización	94 ° C	1 min
1-30	Alineamiento	52 ° C	2 min
	Extensión	72 ° C	2 min
	Extensión final	72 ° C	7 min

15. 8 Volúmenes y concentraciones de los reactivos para la PCR.

Para la amplificación del dominio D1/D2 del ADN_r 26S se siguió el método propuesto por Cocolin *et al.* (2002). Los reactivos utilizados fueron los cebadores especificados anteriormente 0.2 mM, dNTP's 0.2 mM (marca US Biological), el cofactor MgCl₂ 2.5 mM, el Buffer 1X, la polimerasa Taq platinum 5U/50µL (Invitrogen) y el ADN molde 25 ng/µL.

Para la amplificación de la región ITS se siguió el método propuesto por Fernández-Espinar *et al.*, (2000). Los reactivos utilizados fueron los cebadores especificados anteriormente 0.2 mM, dNTP's 0.2 mM (marca US Biological), el cofactor más el buffer 1X, la polimerasa *pfu* 1.25 U/50µL (Fermentas) y el ADN molde 25ng/µL.

15.9 ARDRA y RFLP

Se sometieron a restricción con endonucleasas los amplicones obtenidos a partir del ADN de las diferentes cepas puras obtenidas por el método dependiente de cultivo.

Para el análisis de la región 26S (ARDRA) de los diferentes amplicones se buscó en la base de datos Genbank secuencias del gen ribosomal 26S de levaduras que comúnmente se han encontrado en los quesos. Estas secuencias y las secuencias de las cepas de referencia *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides* que provienen del queso Cotija aisladas en estudios anteriores (García, 2006), se ingresaron en el programa informático *Map Draw* del paquete *DNA Star*. Se analizaron los patrones obtenidos y se escogieron las 3 enzimas de restricción que mayor número de secuencias cortaron dando fragmentos diferenciales.

Para el análisis de la región ITS (RFLP) se utilizaron los cebadores ITS1 y ITS4, la amplificación de esta región da lugar a amplicones de diferente tamaño según el género y/o especie, se han reportado fragmentos desde 400 hasta 900 pb. Los amplicones obtenidos se sometieron a digestión con las endonucleasas HaeIII, HinfI y CfoI según lo reportado por Esteve-Zarzoso *et al.*,(1999).

Las condiciones de la reacción para 20 µl fueron (Bloch, 1995):

- 0.1- 4 µg de ADN en H₂O o bufferTE.
- 2 µl de buffer de restricción 10X.
- 1 a 5 UI/g ADN de enzima de restricción (0.1-0.5 µL)
- Incubar la mezcla durante 3 hr. a 37° C.
- H₂O desionizada filtrada y estéril c.b.p. 20 µL

15.10 Montaje de la técnica de DGGE

El equipo que se utilizó para la técnica es *Bio-Rad Dcode Universal Mutation Detection System* siguiendo el procedimiento descrito por *Muyzer et al, (1993)*:

(a) Elaboración del gel con gradiente perpendicular al campo eléctrico

Es necesario optimizar el gradiente desnaturalizante en el que se va a trabajar con el fin de obtener la mejor separación de bandas posible. Para ello se hace una electroforesis perpendicular al gradiente desnaturalizante, éste va incrementando de izquierda a derecha.

Se prepara un gradiente desnaturalizante de menor 0%-20% a mayor 80%-100 % concentración de desnaturalizante (composición en el Anexo II" Soluciones reactivos").

El gel se prepara con poliacrilamida al 8%, 40 % Acrilamida/Bis (37.5:1), concentración óptima para el tamaño de nuestros fragmentos (\approx 250 pb.)

La muestra es una mezcla de los productos amplificados por PCR junto con buffer de carga (composición en el Anexo II) y es aplicado a lo largo de toda la anchura del gel. Hay que tener en cuenta que el peine utilizado en este gel es de un solo "pocillo" que abarca toda la anchura del gel. La electroforesis dura de 2-3 horas a 200 voltios.

Según la curva sigmoidea obtenida se escogió el gradiente óptimo que corresponde a los valores intermedios de desnaturalización de los fragmentos de dsADN amplificados por PCR (amplicones).

(b) Elaboración del gel con gradiente paralelo al campo eléctrico:

Se hizo el gel paralelo de poliacrilamida preparando cada solución (menor y mayor gradiente) por separado con el gradiente óptimo obtenido a partir del gel de DGGE perpendicular.

La poliacrilamida preparada con la formamida y la urea se almacenan en el refrigerador (4 ° C) y tiene un mes de caducidad.

En este gel se utiliza el peine con varios pocillos, en cada uno se pondrá una muestra diferente (amplicón) junto con el buffer de carga (Anexo II).

15.11 Estudio de la huella génica, secuenciación e identificación de las levaduras:

Se estudió el perfil de la población de levaduras representadas por las diferentes muestras de queso y por las levaduras aisladas. Se escogieron para la secuenciación las levaduras que se consideraron más representativas en la diversidad de la población de éstas.

Para las levaduras obtenidas por el método dependiente de cultivo y que son exclusivas de éste o bien tenían correspondencia con las levaduras obtenidas por el método independiente por el patrón de migración en el DGGE, se amplificó el ADN con los cebadores NL1 y NL4. Los productos de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2.5% y se cortó la banda que correspondía a 600 pb. La banda se purificó con el Kit *Pure PCR Product Purification* de Roche, el ADN obtenido se concentró (concentrador *DNA plus Heto VR-Mini*) para obtener una concentración aproximada de 10 ng/μL y se secuenció.

Para las levaduras que se obtuvieron exclusivamente por el método independiente (PCR-DGGE), las bandas se escindieron con una cuchilla estéril y se incubaron con 50 μL de agua desionizada filtrada estéril, pH 8.0 a 37 °C durante 1 hr. Posteriormente se almacenaron durante 24 hrs. a 4 °C (Ausubel *et al.*, 2005; Gafana *et al.*, 2005). El ADN se concentró (concentrador *DNA plus Heto VR-Mini*) para obtener una concentración aproximada de 10 ng/μL. Con el fin de asegurar que el ADN escindido de las bandas del gel de DGGE pertenecían a un único microorganismo se procedió a la clonación del ADN. Se empleó el Kit comercial TOPO TA Cloning for Sequencing, Invitrogen, basado en la actividad tranferasa que tiene la enzima polimerasa Taq, la cual adiciona un residuo de deoxiadenosina (A) en el extremo 3' terminal, generando así un extremo cohesivo para el producto de PCR. El vector del kit lleva en el extremo terminal 3' un residuo de deoxitimidina, esto hace posible la hibridación entre el producto de PCR y el vector linearizado. La transformación se da en células de *E. coli*. Para la selección de transformantes positivas, el vector contiene genes de resistencia a antibióticos (Kanamicina y Ampicilina). También contiene un gen letal (*ccdB*) para las células de *E. coli*, éste se

encuentra fusionado al extremo terminal del fragmento LacZ α . La ligación del producto de PCR en el vector interrumpe la expresión del LacZ α -ccdB, lo que permite que crezcan únicamente las recombinantes positivas.

La secuenciación se realizó por electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, en el instituto de Fisiología celular, UNAM.

La identificación se llevó a cabo mediante la comparación de las secuencias con las base de datos de Genbank del Nacional Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**16. Análisis microbiológico para la determinación de la calidad general de las ocho muestras de queso Cotija.**

En la Tabla 10 se muestra el resumen del análisis microbiológico (se llevó a cabo con 4 réplicas).

Tabla 10: Análisis microbiológico de las muestras del queso Cotija

	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Hongos (UFC/g)
Queso 1	858,333 (δ 68.93)	>800 ¹ ($\delta \approx 0$)	(v.e.) 1,113 (δ 770)	<67
Queso 2	(v.e.) 5,900	210	(v.e.) 1,333 (δ)	<67
Queso 3	2,167 (δ 707)	60 ²	(v.e.) 300 (δ 141)	<67
Queso 4	15,591 (δ 4,161)	260 ³ (δ 89)	(v.e.) 6670	<67
Queso 5	48,333 (δ 9,309)	(v.e.) 22 (δ 11)	25,000 (δ 14,613)	<67
Queso 6	93,333 (δ 28,216)	(v.e.) 12 (δ 6.8)	(v.e.) 2,283 (δ 1,215)	<67
Queso 7	94,833 (δ 29,446)	(v.e.) 16 (δ 3.5)	60,833 (δ 12,782)	<67
Queso 8	(v.e.) 2,667 (δ 943)	(v.e.) 16 (δ 3.46)	(v.e.) 667	<67

Estos resultados se tomaron del recuento en las placas con agar MEA, ya que en las placas con agar PDA, aún siendo selectivo para levaduras, no hubo crecimiento de microorganismos salvo en las muestras 6 y 7 donde se obtuvo una cuenta de levaduras de 3.7 y 1.8 log₁₀ (UFC/g queso) respectivamente.

El recuento de mesófilos aerobios y de coliformes totales lo realizó Estrada (2007). El recuento de coliformes se hizo mediante la técnica de microfiltración (Millipore con el medio de cultivo Colibblue24).

¹ Se encontraron colonias representativas de *E. coli* (4 UFC/g)

² Se encontraron colonias representativas de *E. coli* (28 UFC/g)

³ Se encontraron colonias representativas de *E. coli* (1 UFC/g)

El resultado del recuento mostró correspondencia con otros datos obtenidos en el mismo grupo de trabajo. El valor promedio del recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y de levaduras para 10 muestras de queso Cotija genuino fue de 3-6 de log₁₀ (UFC/g), <10 hasta 400(UFC/g), < 67, y de < 67(UFC/g) hasta 5 log₁₀ (UFC/g), respectivamente (Cortés, 2007; Estrada, 2008).

La Secretaría de Economía está trabajando en un proyecto (Anteproyecto de Normas Sanitarias) para la resolución de una norma sobre alimentos lácteos artesanales mexicanos entre los que se encontraría contemplado el queso Cotija. Este anteproyecto hasta ahora estableció que el recuento máximo de coliformes fecales debe ser coliformes 50 NMP/g.

Las ocho muestras de queso analizadas en este proyecto, tienen por lo menos tres meses de maduración. En este tiempo la cuenta de coliformes, que pueden provenir de diferentes fuentes pero sobretodo de la leche cruda, va disminuyendo hasta valores muy bajos, el queso será microbiológicamente seguro para el consumo. La cuenta de coliformes será indicativa de la calidad higiénica del queso, pero podrán haber otros patógenos no coliformes que no son aceptables para la calidad y seguridad del alimento (ejemplo: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*,...). En este estudio se hizo el conteo de coliformes, mesófilos aerobios, levaduras y hongos para determinar la calidad del queso.

Por otro lado la técnica de microfiltración resultó ser más sensible que la del número más probable (NMP). Según los estudios de Estrada (2007), la técnica del número más probable (NMP) subestima la cantidad de coliformes totales en un orden de magnitud de 10.

En cuanto al queso 1, la calidad higiénica no es aceptable, el número de coliformes es muy alto e incluso se observaron colonias típicas de *E.coli*. La higiene en la elaboración seguramente no fue adecuada.

También en el queso 3 y 4, aún teniendo una cuenta baja de coliformes, se encontraron colonias típicas de *E.coli*. En este punto hay que tener en cuenta que la técnica de

microfiltración es más sensible que la del NMP y por tanto podrían considerarse a las muestras con calidad higiénica aceptable.

En los quesos 2,5, 6, 7 y 8, los coliformes están dentro del intervalo de calidad higiénica.

17. Descripción morfológica de las colonias de levaduras obtenidas a partir de la inoculación de muestras de queso en medios de cultivo selectivos:

Se aislaron 59 colonias, de las cuales se trabajó con 31, ya que las restantes se contaminaron con hongos filamentosos y no se pudieron purificar. Las colonias obtenidas a partir del queso 1 se descartaron ya que presentó un análisis microbiológico no aceptable. Las colonias aisladas de los quesos 2 y 3 se contaminaron con hongos y no se pudieron purificar.

De acuerdo con lo descrito en el punto 15.2 para el método dependiente de cultivo se inocularon las muestras de queso en diferentes medios sólidos.

En la Tabla 12 se describen los medios en los que fueron aisladas las diferentes colonias de levaduras. Para corroborar si tenían o no actividad lipolítica y proteolítica se sembraron las colonias en los medios TA (Agar tributirina) y ALD (Agar leche descremada) respectivamente.

Tabla 12. Descripción morfocolonial de las levaduras aisladas del queso Cotija

Microorganismo aislado	Medio cultivo	Queso	Actividad proteolítica	Actividad Lipolítica
1	MEA	4	NO	SÍ
2	MEA	4	NO	SÍ
9	PDA	5	NO	SÍ
10	MEA	5	NO	SÍ
12	MEA	5	NO	NO
13	PDA	5	-	SÍ
14	PDA	7	NO	SÍ
15	PDA	7	NO	SÍ
16	PDA	7	NO	SÍ
17	PDA	7	NO	SÍ
18	MEA	7	NO	NO
20	MEA	7	NO	NO
22	PDA	7	NO	SÍ
27	PDA	8	NO	SÍ
29	PDA	8	SÍ	SÍ
37	MEA	6	-	SÍ
40	MEA	6	NO	SÍ
42	MEA	6	SÍ	SÍ
43	MEA	6	NO	-
44	MEA	6	SÍ	NO
45	MEA	6	NO	SÍ
46	PDA	6	NO	SÍ
47	MEA	6	NO	SÍ
49	MEA	6	NO	SÍ
53	PDA	6	SÍ	SÍ
54	MEA	6	NO	SÍ
55	MEA	6	NO	NO
57	PDA	6	NO	SÍ
58	PDA	6	SÍ	SÍ
60	MEA	1	NO	SÍ
62	PDA	1	SÍ	SÍ

- No se realizó la prueba

4

Resultados y discusión

La caseína, proteína principal de la leche, se degrada por acción de las proteasas. La actividad proteolítica de los microorganismos es importante en el desarrollo del sabor y aroma de los alimentos. La actividad lipolítica también es importante para la formación de aromas y sabores en los alimentos (Marilley and Casey., 2003).

En todas las colonias a las 72 hr se observó actividad lipolítica. Las colonias donde se observó actividad a las 24 nos indican que su primera fuente de energía son los triacilgliceridos, éstas se tomaron como positivas en la Tabla 12.

Con el fin de encontrar otras diferencias morfológicas entre las colonias, estas se sembraron en medio WLN

Morfología WL: Las colonias que previamente habían crecido en los medios sólidos PDA (Agar papa dextrosa) y MEA (Agar extracto de malta), que presentaron la misma morfología colonial se inocularon en este medio de color azul-verdoso con el fin de observar diferencias entre ellas. Se describen las diferencias que hay en el crecimiento de los diferentes medios, por ejemplo hay algunas colonias que se tiñen (azul-verde) total o parcialmente y otras que no lo hacen. También algunas presentan diferencias en la morfología cuando crecen en este medio (WLN) respecto al crecimiento previo en los otros medios, PDA y MEA (Pallmann *et al.*, 2001).

Para tener una referencia se trabajó con dos cepas de levaduras aisladas del queso Cotija en un estudio hecho dentro del mismo grupo de trabajo. Estas levaduras fueron identificadas como *Yarrowia lipolytica* y *Candida Zeylanoides*. Estas cepas tienen actividad lipolítica y fueron aisladas en medio PDA (García, 2006).

En la Figura 11 se muestran las morfologías coloniales obtenidas.



Figura 11. Morfología colonial en medio WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient). Se muestran las colonias de levaduras con los números 40, 29, 53, 57, 43, 20, 15, 27, 49, 18 y 57

Se agruparon las colonias según las diferentes morfologías coloniales presentadas.

Tabla 13. Agrupamiento de las colonias según la morfología colonial en medio WLN.

Grupos morfocoloniales WLN	Agrupamiento de los microorganismos aislados según la morfología	Descripción morfocolonial
A	1,2,10,12,14, 18, 20, 22,40, 43, 46, 47, 49, 54, 55, 61*	Tinción parcial. Color blanco.
B	9	Tinción parcial. Color beige-grisáceo, un poco traslúcida.
C	13, 15,16, 17	Tinción parcial, color beige claro, presenta mayor textura
D	27	Tinción homogénea, mucha textura
E	29	No se tiñe. Blanca, rugosa, mucha textura
F	42,44, 53, 57, 58, 62	No se tiñe. Blanca-grisácea.
G	59*	No se tiñe. Beige. Aspecto filamentoso

*García, 2006. Cepas de referencia.

Al microorganismo aislado con la clave 60 no se le realizó esta prueba, ya que tenía una morfología colonial exclusiva en el medio MEA.

Se obtuvieron 7 diferentes morfologías coloniales en el medio WLN. En algunos casos los grupos morfocoloniales en medio WLN no coincidieron con las actividades lipolíticas y proteolíticas detectadas.

18. Optimización del método de extracción y purificación del ADN a partir de los microorganismos aislados en medios selectivos. Prueba de PCR.

Se partió del paquete celular para llevar a cabo los diferentes protocolos de extracción y purificación.

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 13: Métodos de extracción y purificación del ADN a partir de cepas puras de levaduras aisladas del queso Cotija. FCA: Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (24: 25:1); Columnas (High Pure PCR Product Purification Kit. Roche Applied Science; Kit Stool. QIAGEN).

Microorganismo aislado	Método de extracción	Método de purificación	A260/A280	[ng/μl]
2	Perlas	Columnas	1.625	29
38	Perlas	Columnas	1.55	13.5
9	Perlas	Columnas	1.15	9.55
9	Liticasa	Columnas	1.42	5.5
15	Perlas	FCA	1.98	809
18	Liticasa + Perlas	FCA	2.1	2629.00
38	Liticasa + Perlas	FCA	1.87	63.58
37	Liticasa	FCA	1.19	1190.00

Para el método de extracción los dos métodos, perlas y/o liticasa, se consideraron óptimos.

El ADN extraído a partir de los microorganismos aislados, que presenta una calidad óptima y un buen rendimiento (concentración óptima de ADN) es el que ha sido extraído y purificado con perlas de vidrio y/o liticasa y con Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico.

Se debe tener en cuenta que la optimización de la extracción y de la purificación se ha hecho con diferentes microorganismos aislados, por tanto se observan variaciones en las concentraciones de ADN, aunque se consideran dentro de un intervalo óptimo para las extracciones purificadas con fenol-cloroformo.

Basándonos en los resultados anteriores, para la extracción de ADN a partir de los microorganismos aislados utilizaremos cualquiera de los dos métodos, bien el enzimático o bien el mecánico. Sin embargo se utilizó el método mecánico ya que el protocolo a seguir es más corto que el enzimático. En la Tabla 14 se muestran los resultados de la extracción y purificación del ADN de las diferentes cepas puras:

Tabla 14: Extracción y purificación de ADN a partir de cepas puras mediante el método de extracción y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Aislado	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀ (Índice pureza)	[ng/μL]
1	0.71	0.33	2.15	710
2	0.43	0.20	2.08	430
9	0.39	0.19	2.05	585
10	0.58	0.27	2.15	870
12	0.32	0.15	2.13	480
13	0.43	0.21	2.05	645
14	0.88	0.39	2.26	1,320
15	1.03	0.52	1.98	1,066
17	0.47	0.236	1.99	470
18	0.46	0.215	2.14	690
18	1.09	0.52	2.1	2,608
20	0.82	0.37	2.22	1,815
22	0.215	0.106	2.03	215
27	0.71	0.33	2.15	1,191
29	0.16	0.076	2.11	240
37	0.88	0.43	2.05	880
38	0.13	0.072	1.81	32.5
40	0.56	0.26	2.15	840
42	0.15	0.079	1.9	225
44	0.02	0.005	4	30
45	0.15	0.068	2.21	225
47	0.7	0.32	2.19	1,050
49	0.84	0.39	2.15	1,710
53	0.128	0.059	2.17	192
54	0.98	0.42	2.33	1,470
55	0.4	0.19	2.11	600
58	0.129	0.0659	1.96	129
59	0.064	0.038	1.68	96
60	0.018	0.0103	1.75	27
61	0.045	0.023	1.95	12.12
62	0.086	0.0791	1.02	80.6

Para confirmar que el ADN es de calidad se hizo una reacción de PCR, los resultados se muestran en la Figura 12.

Los cebadores utilizados fueron NL1clamp y LS2 que amplifican una región de ≈ 250 pb.

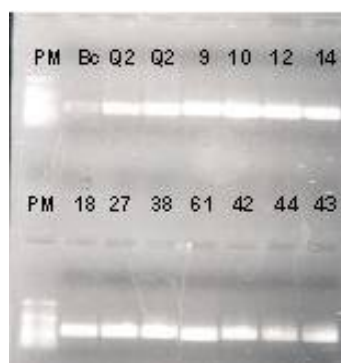


Figura 12: Amplicones de las cepas puras a partir del ADN obtenido mediante el método de extracción y fenol-cloroforno-álcohol isoamílico. Cebadores utilizados NL1clamp y LS2. Agarosa al 2% (p/v) con 1 µg de BrEt y buffer TAE 1X. Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. Electroforesis durante 85 min. a 85V. Transiluminador UV para la visualización (ColePalmer). **PM:** Patrón de peso molecular; **Bc:** Blanco de la reacción; **Q2:** Amplicón del queso 2 por duplicado. **Control positivo; 9, 10, 12, 14, 18, 27, 38, 61, 42, 44, 43:** Amplicones provenientes de los microorganismos aislados

19. Optimización del método de extracción y purificación del ADN a partir del queso. Prueba de PCR.

Para la optimización del método de extracción y purificación del ADN se utilizó la muestra de queso 1. Se comenzó rompiendo la matriz proteica de los quesos con proteasas con el fin de liberar a los microorganismos embebidos esta, se homogenizó la muestra y se procedió a ciclos de centrifugación donde se fue eliminando la grasa de la superficie. Después se procedió a la extracción y purificación del ADN, utilizando dos métodos de extracción (perlas de vidrio y liticas) y dos de purificación (fenol-cloroforno-álcohol isoamílico y columnas de afinidad por el ADN).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Concentración y pureza del ADN del queso 1.

Método	Método extracción	Método purificación	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ng/µl	µg ADN/ g muestra
1	Enzimático	Columnas (Roche)	0.63	0.41	1.54	94.5	9.45
2	Enzimático	FCA	0.34	0.42	0.81	51	5.10
3 a	Mecánico	Columnas (Qiagen)	0.83	0.49	1.69	124.5	12.40
3 b	Mecánico	Columnas (Roche)	0.94	0.5	1.88	188	18.80

4	Mecánico	FCA	0.6 6	0.4 2	1.57	99	9.9
---	----------	-----	----------	----------	------	----	-----

Del ADN total de las diferentes muestras del queso 1 se tomó un barrido de 200-300 nm para observar gráficamente la calidad del ADN por los diferentes métodos aplicados según la Tabla 15, los resultados del barrido se muestran en la Figura 13:

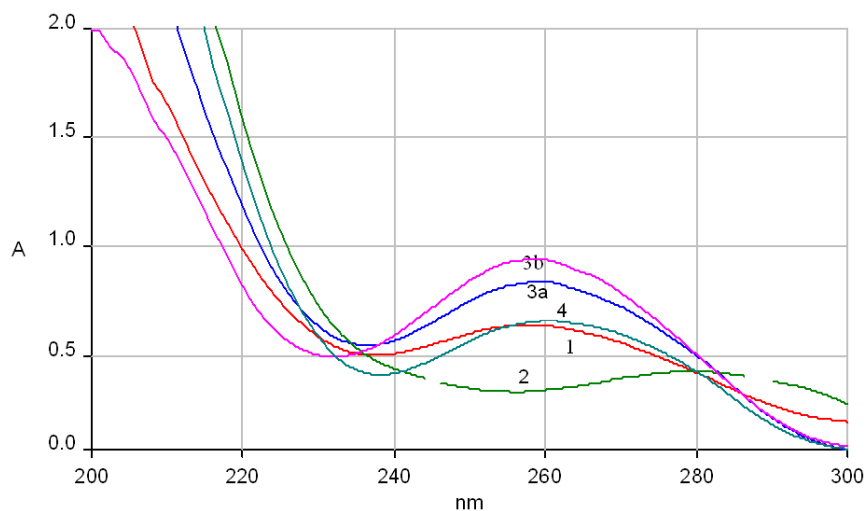


Figura 13. Absorbancia muestras queso 1.

Los resultados obtenidos en las extracciones y purificaciones por el método de extracción del ADN con perlas de vidrio (mecánico) y purificación de éste mediante columnas (Roche y Qiagen) se obtiene una mayor concentración de ADN y también una relación de A260/A280 (Índice de pureza) más alta, este valor cuando es mayor de 1.5 nos indica que tiene una pureza de ADN óptima. En la extracción y purificación del ADN por el método 2 se obtiene la menor concentración de ADN y el menor índice de pureza (< 1) comparado con los demás métodos. En el caso de la purificación mediante columnas de afinidad por el ADN marca comercial Roche la relación de pureza es más alta que la relación obtenida con las columnas Qiagen.

Para corroborar estos resultados se hizo una reacción de amplificación de PCR, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.

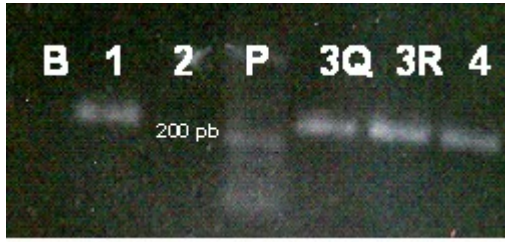


Figura 14. Amplificación de las muestras del queso 1

Cebadores utilizados NL1clamp y LS2. Agarosa al 2% (p/v) con 1 μ g de BrEt y buffer TAE 1X. Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. Electroforesis durante 85 mín. a 85V. Transiluminador UV para la visualización (ColePalmer)

La amplificación confirma los resultados anteriores aunque las bandas son muy tenues se observa la banda 3R más intensa. La muestra obtenida por el método 2 (enzimático-Fenol cloroformo) no amplificó confirmando así los resultados observados anteriormente.

Cabe señalar que las columnas de la marca Roche están recomendadas para la purificación de productos con un volumen pequeño (productos de PCR) pero funcionó correctamente para la purificación del ADN total obtenido en cada muestra del queso donde se parte de volúmenes mayores.

Una vez que se confirmó que el método óptimo de extracción del ADN es el mecánico (perlas de vidrio) y el de purificación por columnas para las muestras del queso 1 se aplicaron estas metodologías a las demás muestras de queso.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16:

Tabla 16. Resultados calidad y rendimiento del ADN de las muestras de los 8 diferentes quesos a estudiar

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ng/μl	μg ADN/g muestra
Q1	0.63	0.41	1.54	94.5	9.45
Q2	0.97	0.42	2.31	145.5	14.55
Q3	0.4	0.5	0.8	80	8.00
Q4	0.95	0.49	1.94	142.5	14.25
Q5	0.69	0.42	1.64	103.5	10.35
Q6	0.17	0.08	2.13	24.06	2.40
Q7	0.94	0.36	2.61	141	14.1
Q8	0.88	0.34	2.59	132	13.2

Del ADN total de las diferentes muestras del queso se tomó un barrido de 200-300 nm de absorbancia para observar gráficamente la calidad del ADN, los resultados del barrido se muestran en la Figura 15:

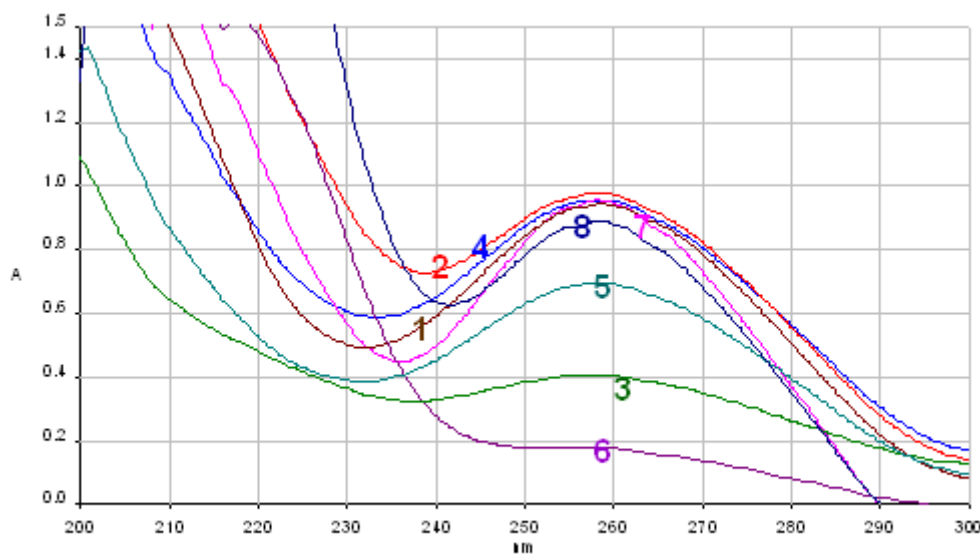


Figura 16. Barrido 200-300nm muestras 1-8

Figura 15: Barrido 200-300 nm de las muestras de queso. Método de extracción del ADN mediante piedras de vidrio (mecánico) y purificación por columnas de la marca comercial Roche con afinidad por el ADN. Los resultados son congruentes con la calidad y la concentración del ADN mostrados en la Tabla 16.

A continuación se hizo la reacción de amplificación por PCR de las diferentes muestras de queso. No se obtuvo la amplificación por lo que se hizo otra reacción de PCR agregándole albúmina sérica bovina (ASB o BSA). La ASB actúa en la reacción de PCR como secuestrador de posibles inhibidores de la polimerasa (Friedrich *et al.*,1997)

Los resultados se observan en la Figura 16:

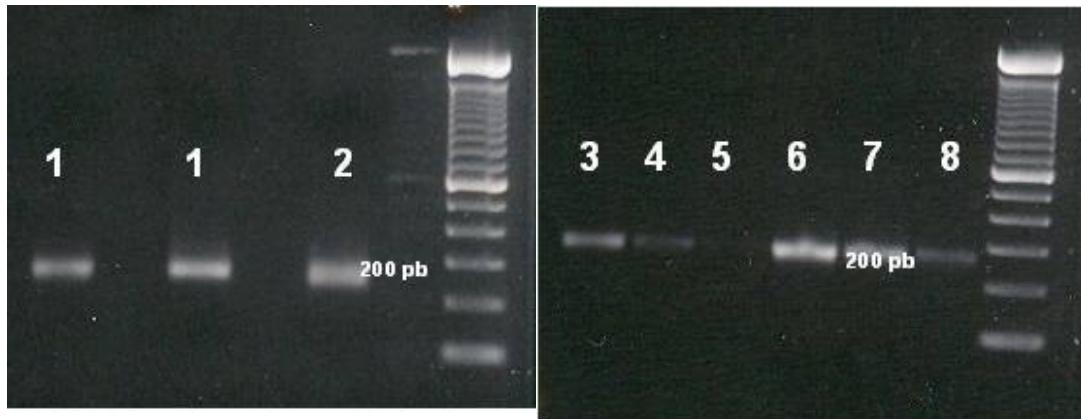


Figura 16. Amplicones de las muestras de queso. Los números mostrados en las fotos representan cada muestra de queso (Q1-Q8). Gel de agarosa al 2% (p/v) con 1 μ g de BrEt y buffer TAE 1X. Electroforesis durante 85 mín. a 85V. Transiluminador UV para la visualización (ColePalmer)

Todas las muestras amplificaron, aunque algunas muy tenues (4 y 5), esto pudo haberse debido a los diferentes orígenes de las muestras de queso o a las diferentes concentraciones de levaduras de cada muestra. Algunas muestras de queso mostraron una mayor intensidad en las bandas, esto puede deberse a una mayor concentración de ADN de levaduras. También se puede discutir que, aún partiendo de una calidad y pureza de ADN óptima, probablemente hayan compuestos que inhiben parcialmente la reacción de PCR. Este fenómeno de interferencia en la reacción de amplificación por inhibidores se ha visto frecuentemente en la amplificación de ADN extraído directamente de matrices complejas como la de los alimentos. (Friedrich *et al.*, 1997)

20. Análisis de restricción de la región 26S (ARDRA) y la ITS (RFLP)

- Para el análisis de la región 26S (ARDRA) se amplificó el dominio D1/D2 con los cebadores NL1 y NL4 dando un amplicón de aproximadamente 600 pb.

Se sometieron a restricción con endonucleasas los amplicones obtenidos a partir del ADN de las diferentes cepas puras obtenidas por el método dependiente de cultivo.

Como primera aproximación se hizo un análisis “*in silico*” para saber qué enzimas de restricción (disponibles en el laboratorio) podrían generar fragmentos diferenciados. Para ello se buscaron secuencias del gen ribosomal 26S de levaduras, que comúnmente se han encontrado en los quesos, en la base de datos Genbank. Estas secuencias y las secuencias de las cepas de referencia *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides* que provienen del queso Cotija aisladas en un estudio anterior (García, 2006), se ingresaron en el programa informático *Map Draw*. Se analizaron los patrones obtenidos (Tabla 16) y se escogieron las 3 enzimas de restricción que mayor número de secuencias cortaron dando fragmentos diferenciales

La Tabla 16 muestra el patrón de restricción que se obtuvo a partir de dicho análisis. Sólo se muestran las enzimas que al menos generaron un sitio de corte

Tabla 16: Análisis previo “in silico” al estudio ARDRA. Análisis del dominio D1/D2 del gen 26S del ADNr de secuencias obtenidas en la base de datos NCBI (The National Center for Biotechnology Information) y de secuencias de referencia (*García, 2006).

	<i>Yarrowia lipolytica</i> (250pb)*			<i>Candida zeylanoides</i> (580 pb)*			<i>Debaryomyces hansenii</i> (587 pb)		
	n° corte s	Sitio de corte	N (pb) fragmento s	n° corte s	Sitio/s de corte	N (pb) fragmento s	n° cort e	Sitio/s de corte	N (pb) fragmento s
HaeIII	–	–	–	1	424p b	424 156	–	425 pb	425 162
Hinf I	2	151p b 156p b	151 5 94	2	152p b 199p b	152 47 381	–	153p b 200p b	153 47 387
Sau3AI	–	–	–	2	363p b 553p b	363 190 27	3	355p b 364p b 384p b	355 9 20 203
XbaI	–	–	–	1	511p b	511 69	–	512p b	512 75

	<i>Cryptococcus albidus</i> (412 pb)			<i>Kluyveromyces marxianus</i> (545pb)			<i>Rodhotorula sp.</i> (594 pb)		
	n° corte s	Sitio/ s de corte	N (pb) fragmentos	n° cort e	Sitio/ s de corte	N (pb) fragmentos	n° cort e	Sitio/ s de corte	N (pb) fragmentos
BamHI	–	–	–	1	172	–	–	–	–
EcoRI	1	191	191 321	–	–	–	–	370	–
HaeIII	1	59	59 353	1	402	402 143	2	405p b 462p b	405 57 132
Hinf I	2	102p b 152p b	100 50 260	2	156, 203	156	2	188p b 480p b	188 292 114
PvuII	–	–	–	1	488	488 57	–	–	–
SacI	–	–	–	–	–	–	1	32	32 562
Sau3AI	1	370p b	370 42	2	172, 367	172 195 178	–	–	–
XbaI	1	35pb	35 377	–	–	–	–	–	–

Con base en estos resultados los diferentes amplicones se sometieron a digestión con las endonucleasas HaeIII, HinfI y MboI (Sau3AI) porque son las que cortaron, mayor número de secuencias blanco dando fragmentos diferenciales. El resultado de la digestión se cargó en un gel de agarosa al 3% (p/v) que contenía buffer TAE 1X y 1µg/mL de BrEt. (Estevez-Zarzoso *et al.*, 1999). Los patrones obtenidos en el gel se visualizaron con un transiluminador UV (ColePalmer).

Los resultados se muestran en las Figuras 17-23 y en la Tabla 17

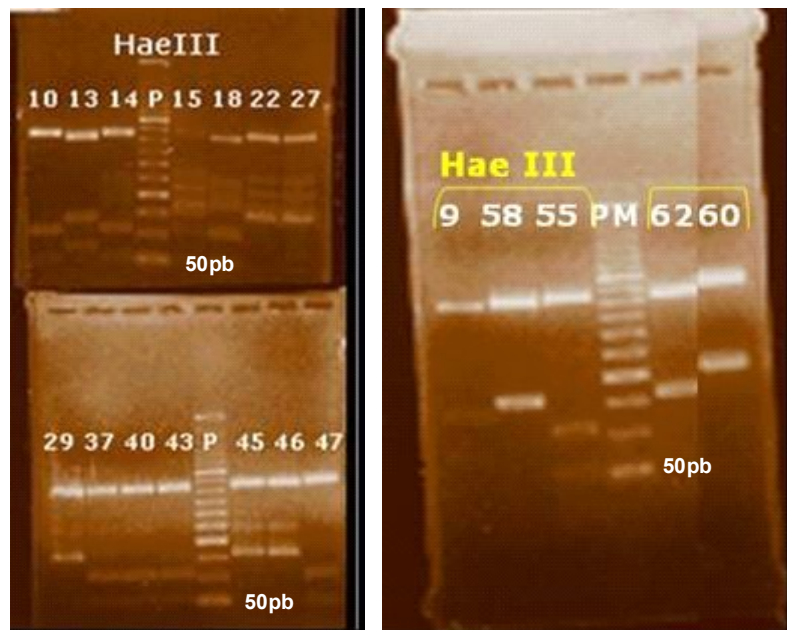


Figura 17. Patrón de restricción obtenido para la región 26S con HaeIII. P o PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

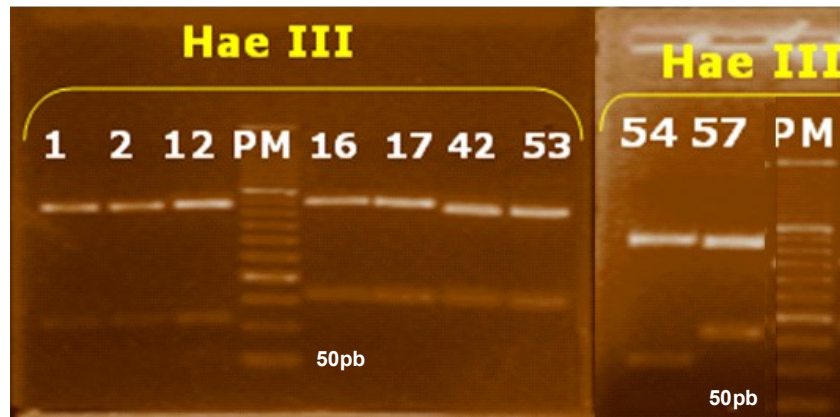


Figura 18. Patrón de restricción obtenido para la región 26S con HaeIII. PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder* En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

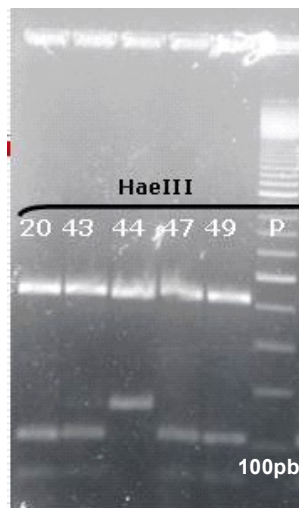


Figura 19. Patrón de restricción obtenido para la región 26S con HaeIII. P: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 100 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

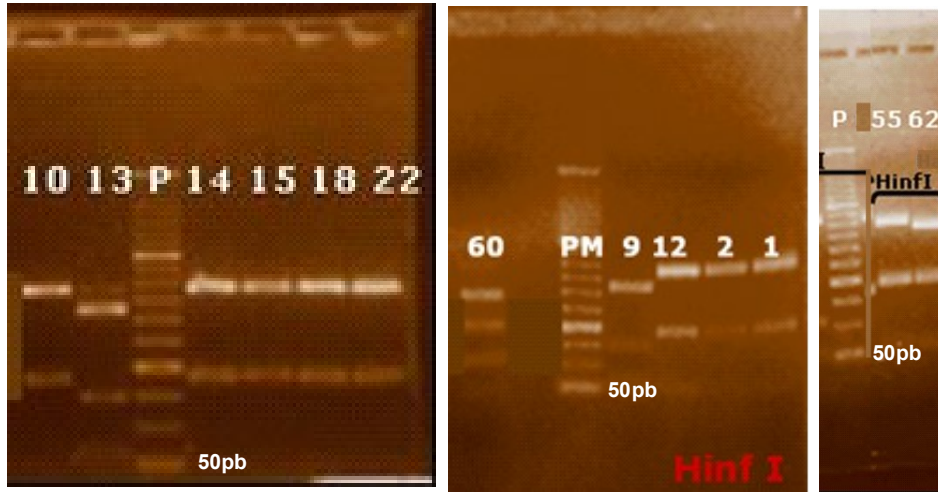


Figura 20. Patrón de restricción obtenido para la región 26S con HinfI. P o PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

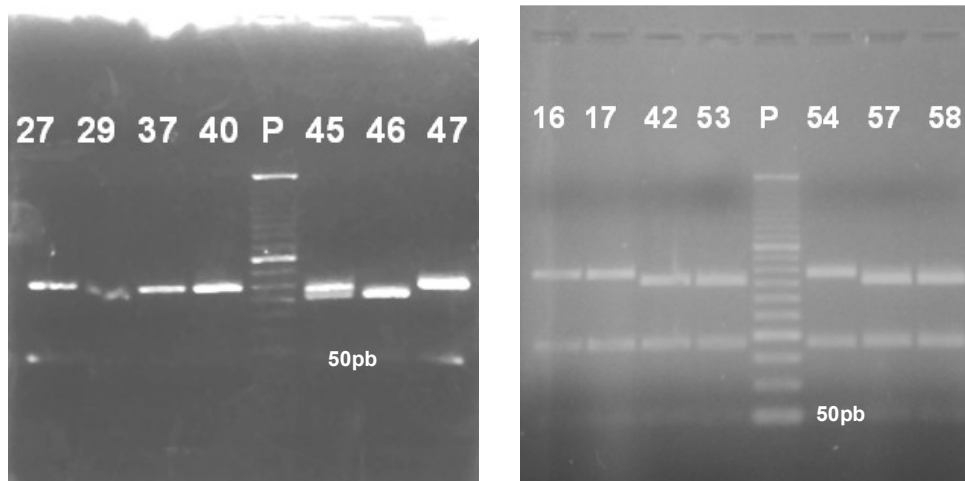


Figura 21. Patrón de restricción obtenido para la región 26S con HinfI. P o PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

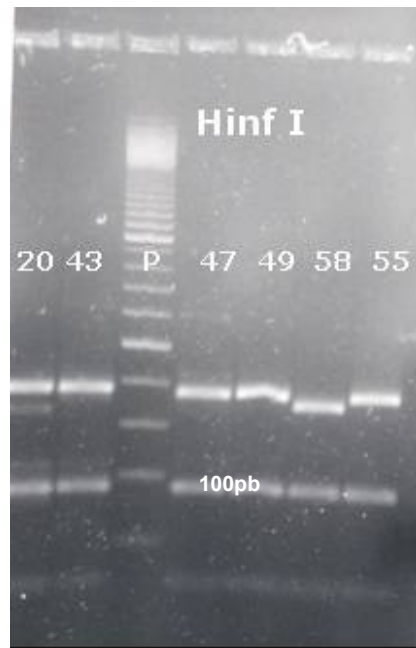


Figura 22. Patrón de restricción obtenido para la región 26S con HinfI. P: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 100 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

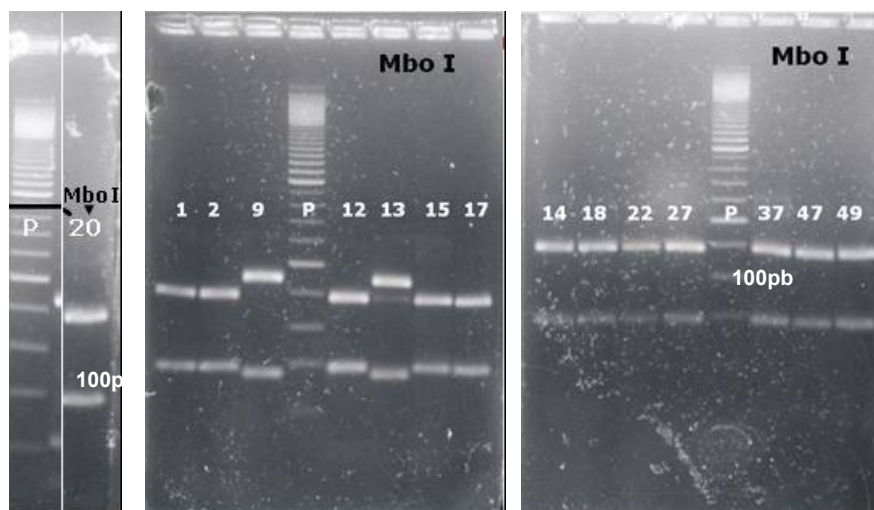


Figura 23. Patrón de restricción obtenido para la región 26S con MboI (Sau 3AI). P: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 100 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

-Para el análisis de la región ITS (RFLP) se utilizaron los cebadores ITS1 e ITS4 dando amplicones de diferente tamaño (500-750 pb). A continuación se muestran los amplicones obtenidos (Figura 24 y 25, y Tabla 18).

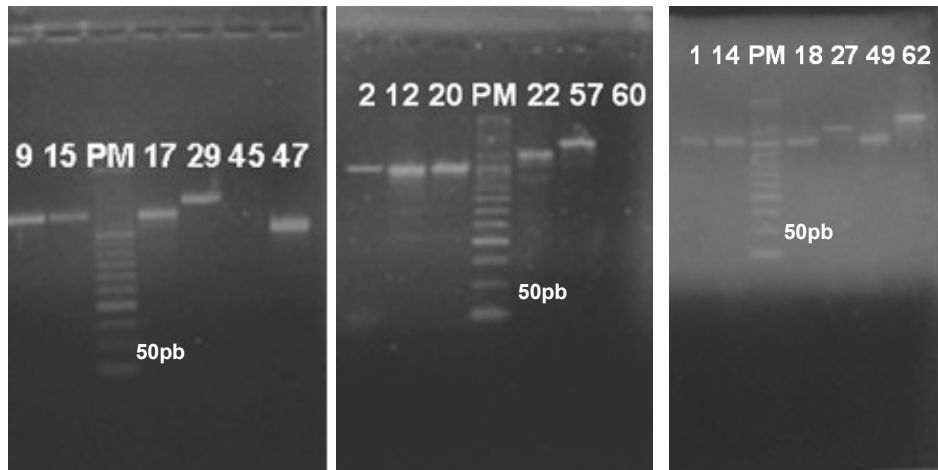


Figura 24. Amplicones obtenidos de la amplificación de la región ITS. Agarosa al 3% (p/v). Tinción con BrEt (1µg/mL). PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

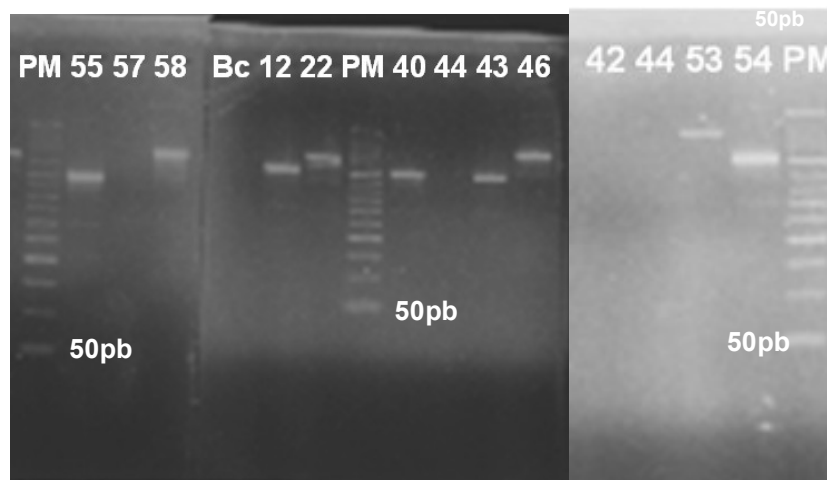


Figura 25. Amplicones obtenidos de la amplificación de la región ITS. Agarosa al 3% (p/v). Tinción con BrEt (1µg/mL).PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

Los diferentes amplicones de la región ITS se sometieron a digestión con las endonucleasas *HaeIII*, *HinfI* y *CfoI* de acuerdo a lo reportado por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). El resultado de la digestión se cargó en un gel de agarosa al 3% (p/v) que contenía buffer TAE 1X y 1µg/mL de BrEt. Los patrones obtenidos en el gel se visualizaron con un transiluminador UV (ColePalmer). Los resultados se muestran a continuación (Figura 26-31):

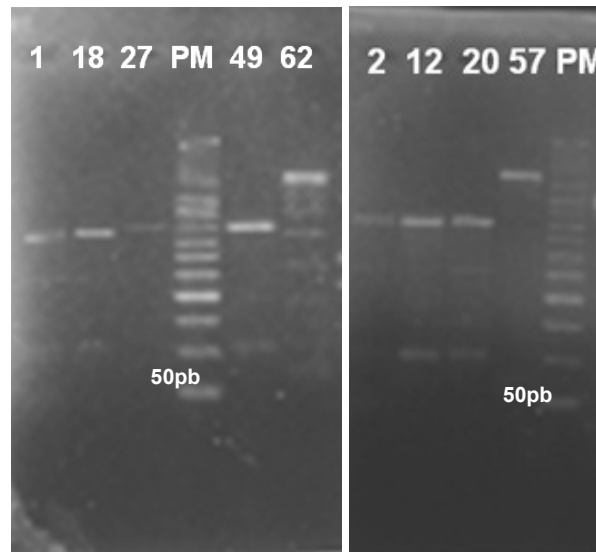


Figura 26. Patrón de restricción obtenido para la región ITS con *HaeIII*. PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

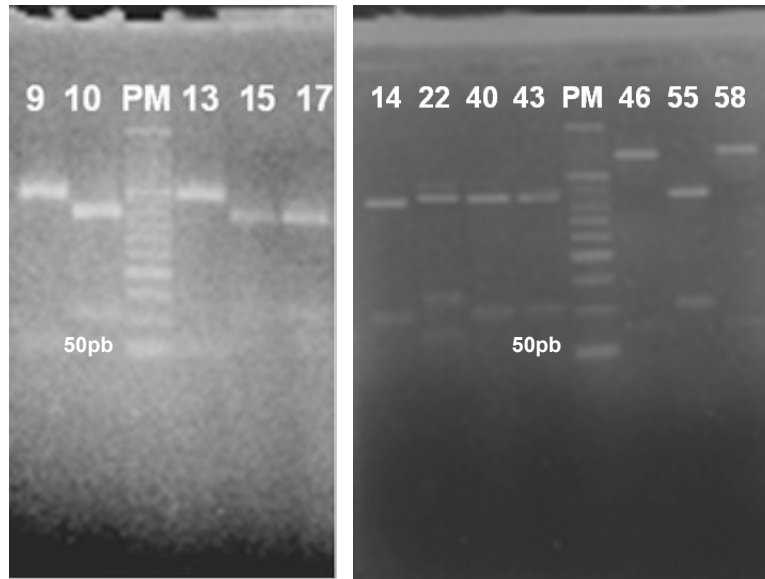


Figura 27. Patrón de restricción obtenido para la región ITS con HaellI. PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder* En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

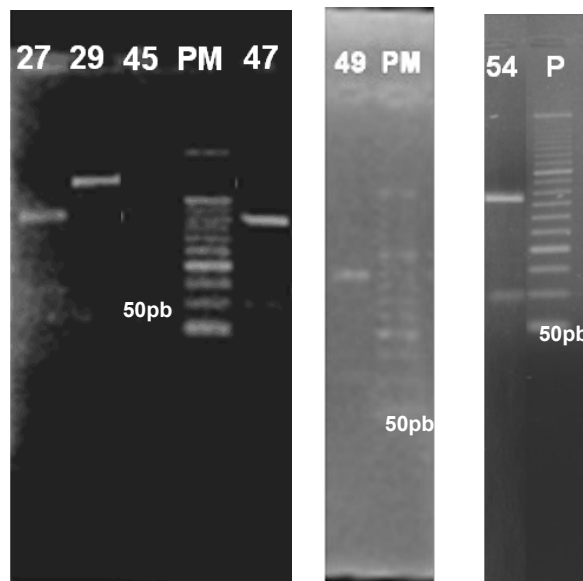


Figura 28. Patrón de restricción obtenido para la región ITS con HaellI. PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

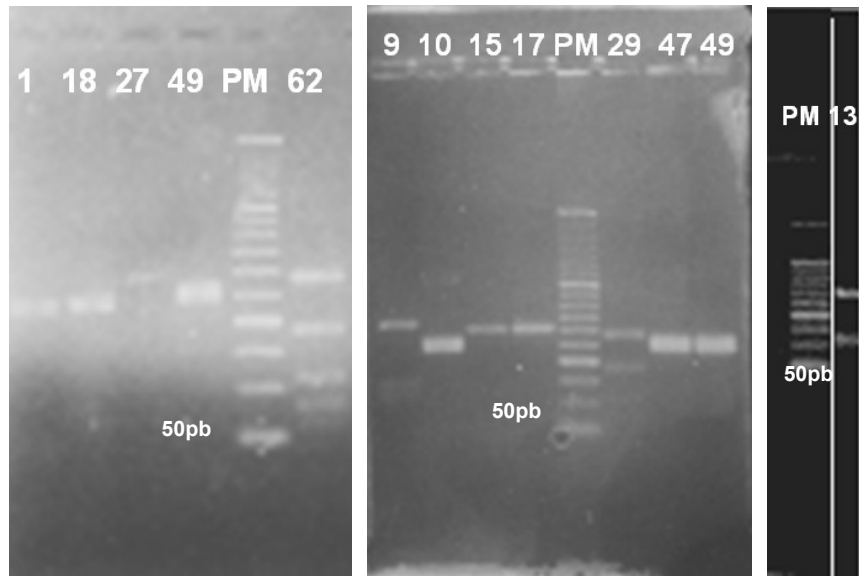


Figura 29. Patrón de restricción obtenido para la región ITS con HinfI. PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder* En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos

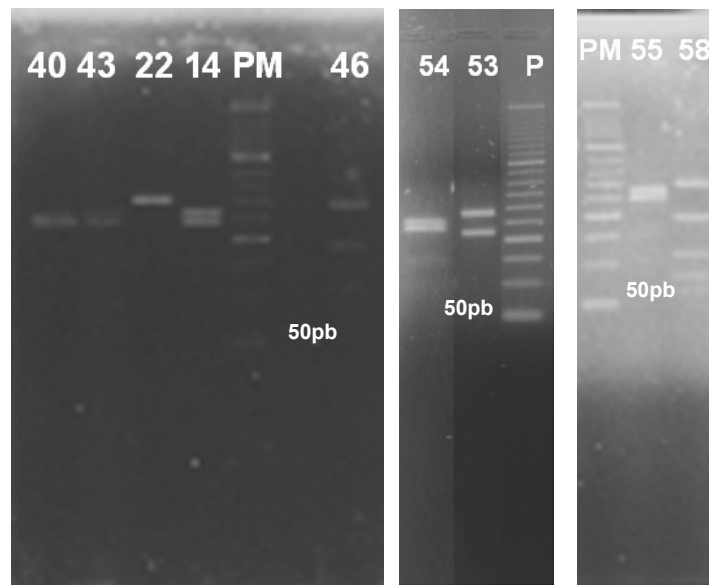


Figura 30. Patrón de restricción obtenido para la región ITS con HinfI. P o PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder* En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

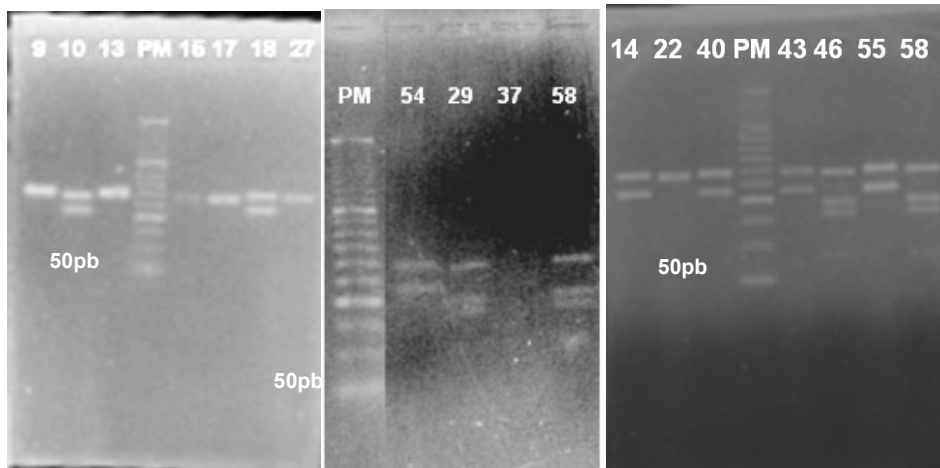


Figura 31. Patrón de restricción obtenido para la región ITS con Cfol. PM: Patrón de peso molecular *O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder*. En números se representan los patrones de restricción de los diferentes microorganismos aislados (Tabla 12)

Los resultados mostrados en las Figuras 17-31 se integraron en dos tablas (Tabla 17 y Tabla 18), una para cada región:

Tabla 17: Patrón de restricción de la región 26S. Se muestran los fragmentos (pb) obtenidos del análisis de restricción de los microorganismos aislados.

Aislado	HaeIII	Hinfl	Mbol
1	425, 125, 50	375, 175, 50	400, 200
2	425, 125, 50	375, 175, 50	400, 200
9	425, 100, 75	325, 150, 2X 60	450, 150
10	425, 125, 50	375, 175, 50	
12	425, 125, 50	375, 175, 50	400, 200
13	425, 100, 75	325, 150, 2X 60	450, 150
14	425, 125, 50	375, 175, 50	400, 200
15	Contaminado	375, 175, 50	400, 200
16	450, 150	400, 175, 25	
17	450, 150	400, 175, 25	400, 200
18	Contaminado	375, 175, 50	400, 200
20	425, 125, 50	400, 175, 25	400, 200
22	425, 175	375, 175, 50	400, 200
27	425, 175	375, 175, 50	400, 200
29	425, 175	375, 175, 50	
37	425, 125, 50	375, 175, 50	400, 200
40	425, 125, 50	375, 175, 50	
42	425, 175	375, 175, 50	
43	425, 125, 50	375, 175, 50	
44	425, 175	375, 175, 50	
45	425, 175	375, 175, 50	
46	425, 175	375, 175, 50	
47	425, 125, 50	375, 175, 50	400, 200
49	425, 125, 50	400, 175, 25	400, 200
53	425, 175	400, 175, 25	
54	425, 125, 50	400, 175, 25	
55	425, 125, 50	375, 175, 50	
57	425, 175	375, 175, 50	
58	425, 175	375, 175, 50	
60	450, 175	290, 200, 100, 50	
62	425, 175	375, 175, 50	

Para la región 26S se obtuvieron fragmentos de restricción desde aproximadamente 25 pb hasta 450 pb; con HaeIII se obtuvieron fragmentos desde 50 pb hasta 450 pb, con HinfI desde 50 pb hasta 400 pb y con Mbol (Sau3AI) desde 150 pb hasta 450 pb.

Tabla 18: Patrón de restricción de la región ITS 1-4. ADNr. Se muestran los fragmentos (pb) obtenidos del análisis de restricción de los microorganismos aislados.

Aislado	≈ N amplicon	HaeIII	Hinfl	Cfol
1	500-525	400, 125	260.240	
2	500-525	400, 125		
9	600-625	500, 100	340, 140, 120	310.290
10	500-525	400, 125	260.240	300, 225
12	500-525	400, 125	340, 140, 120	
13	500-525	500, 100	350, 150	310.290
14	500-525	400, 125	260.240	300, 225
15	600-650	400, 140, 75	2x 310	2x 300
17	600-650	400, 140, 75	2x 310	2x 300
18	500-525	400, 125	260.240	300, 225
20	500-525	400, 125		
22	625	425, 140, 75	2x 310	2x 300
27	625	400, 140, 75	2x 310	2x 300
29	700-750	650, 75	290, 190, 110, 60	300, 180, 180
40	500-525	400, 125	260.240	300, 225
37	No amplificó			
42	No amplificó			
43	500-525	400, 125	260.240	300, 225
44	No amplificó			
45	No amplificó			
46	700-750	650, 75	300, 200, 110, 60	290, 180, 160, 80
47	500-525	400, 125	260.240	
49	500-525	400, 125	260.240	
53	700-750			
54	500-525	400, 125	260, 240	300, 225
55	500-525	400, 125	260.240	300, 225
57	700-750	650, 75		
58	700-750	650, 75	300, 200, 110, 80, 60	290, 180, 160, 80
60	No amplificó			
62	700-750		300, 200, 110, 80, 60	

Para la región ITS se obtuvieron fragmentos desde aproximadamente 60 pb hasta 750 pb, con HaeIII se obtuvieron fragmentos desde 75 pb hasta 650 pb, con HinfI desde 60 pb hasta 340 pb y con CfoI desde 80 pb hasta 310 pb.

No se encontró relación entre los patrones de restricción obtenidos para la región ITS y los reportados en la bibliografía, los cuales habían sido utilizados como herramienta de identificación de diversas levaduras. (Arroyo-López *et al.* 2006; Clemente-Jiménez *et al.*

2004; De Llanos Frutos *et al.*, 2006; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Osorio *et al.*, 2008, Suárez *et al.*, 2007).

Con el patrón de restricción obtenido se construyó un dendrograma para cada región. El dendrograma se basó en una matriz binaria donde se relacionaron todos los tamaños de los fragmentos de restricción, obtenidos para cada región, con los diferentes amplicones. En esta matriz, los diferentes tamaños de los fragmentos corresponderían a los “estados de carácter” y estos se relacionan con los amplicones mediante ausencia (valor “1”) o presencia (valor “0”).

Para la construcción de las matrices sólo se tomó en cuenta la información que se obtuvo con la endonucleasa Hae III, ya que, para ambas regiones, se tuvo mayor número de amplicones representados. Por otro lado, el análisis obtenido con HinfI, MboI y CfoI no proporcionó información adicional, por lo que no se consideraron para el análisis. En las Tablas 19 y 20, se muestra la información que se ingresó en la matriz para cada región. El formato de la matriz con el que se trabajó se encuentra en el Anexo IV “Matriz binaria de los fragmentos de restricción”.

Cada matriz se ingresó en el programa informático TREECON escogiendo los parámetros de agrupamiento simple y el algoritmo UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) ya que no se busca un enfoque evolutivo o filogenético. Los dendrogramas obtenidos se muestran en las Figura 32.

Tabla 19: Matriz binaria de los fragmentos de restricción para la región 26S de las levaduras aisladas del queso Cotija

Aislado	Fragmentos obtenidos con Hae III para la región 26S							
	450 pb	425 pb	175 pb	150 pb	125 pb	100 pb	75 pb	50 pb
1	0	0	0	0	1	0	0	1
2	0	0	0	0	1	0	0	1
9	0	1	0	0	0	1	1	0
10	0	0	0	0	1	0	0	1
12	0	0	0	0	1	0	0	1
13	0	1	0	0	0	1	1	0
14	0	0	0	0	1	0	0	1
16	1	0	0	1	0	0	0	0
17	1	0	0	1	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1	0	0	1
22	0	1	1	0	0	0	0	0
27	0	1	1	0	0	0	0	0
29	0	1	1	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	1	0	0	1
40	0	0	0	0	1	0	0	1
42	0	1	1	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	1	0	0	1
44	0	1	1	0	0	0	0	0
45	0	1	1	0	0	0	0	0
46	0	1	1	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	1	0	0	1
49	0	0	0	0	1	0	0	1
53	0	1	1	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	1	0	0	1
55	0	0	0	0	1	0	0	1
57	0	1	1	0	0	0	0	0
58	0	1	1	0	0	0	0	0
60	1	0	1	0	0	0	0	0
62	0	1	1	0	0	0	0	0

Tabla 20: Matriz binaria de los fragmentos de restricción para la región ITS de las levaduras aisladas del queso Cotija

	Fragmentos obtenidos con Hae III para la región ITS						
	650 pb	500 pb	400 pb	140 pb	125 pb	100 pb	75 pb
1	0	0	1	0	1	0	0
2	0	0	1	0	1	0	0
9	0	1	0	0	0	0	1
10	0	0	1	0	1	0	0
12	0	0	1	0	1	0	0
13	0	1	0	0	0	0	1
14	0	0	1	0	1	0	0
15	0	0	1	1	0	0	1
17	0	0	1	1	0	0	1
18	0	0	1	0	1	0	0
20	0	0	1	0	1	0	0
22	0	0	1	1	0	0	1
27	0	0	1	1	0	0	1
29	1	0	0	0	0	0	1
40	0	0	1	0	1	0	0
43	0	0	1	0	1	0	0
46	1	0	0	0	0	0	1
47	0	0	1	0	1	0	0
49	0	0	1	0	1	0	0
54	0	0	1	0	1	0	0
55	0	0	1	0	1	0	0
57	1	0	0	0	0	0	1
58	1	0	0	0	0	0	1
62	1	0	0	0	0	0	1

Los dendrogramas obtenidos aparecen en la Figura 32:

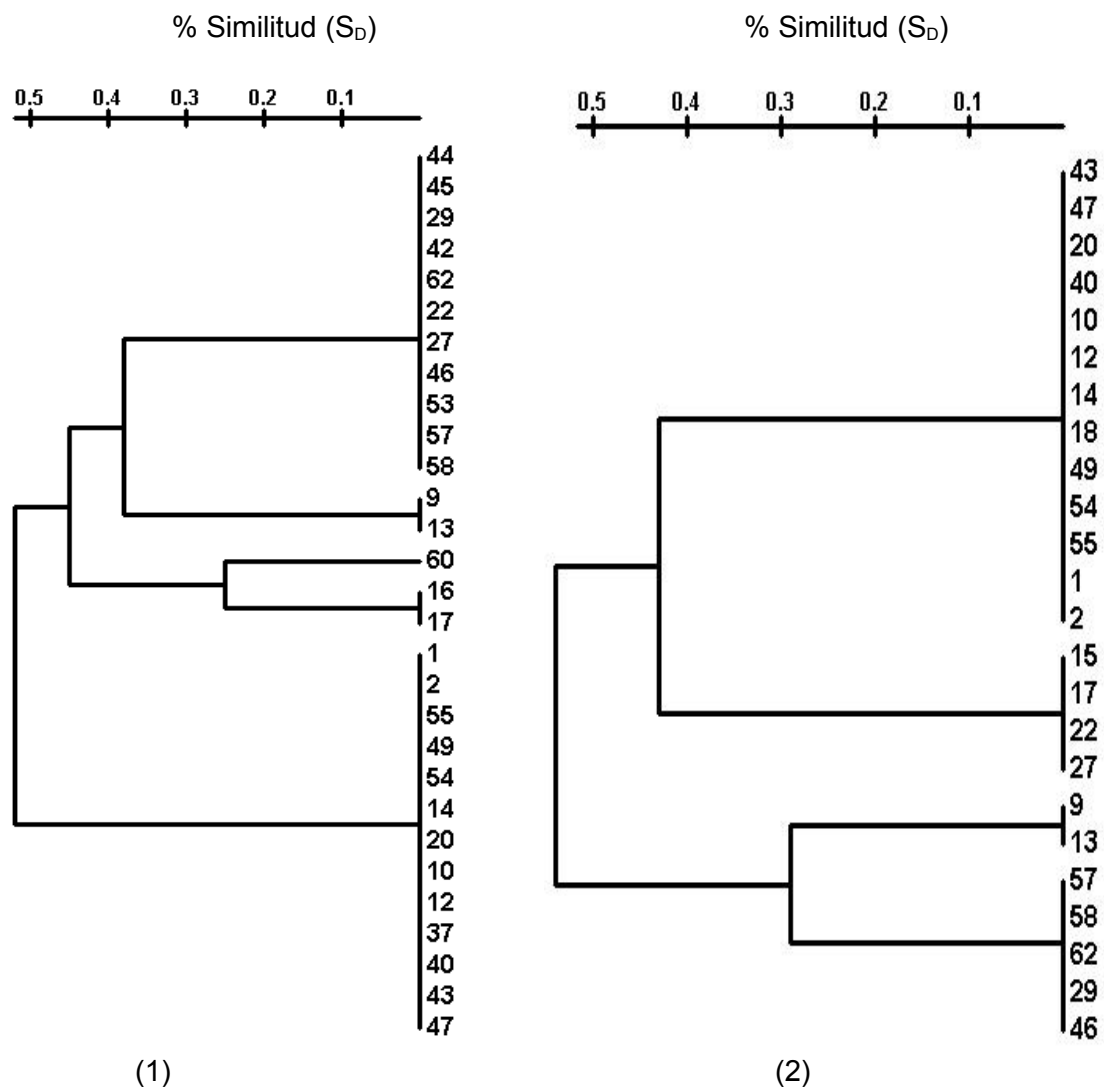


Figura 32. Dendrograma obtenido a partir del análisis con HaeIII. Basado en el análisis de restricción con la endonucleasa HaeIII de la región 26S (1) y de la ITS (2). Programa TREECON por agrupamiento simple y UPGMA.

A partir de la información de los dos dendrogramas se agruparon a los microorganismos aislados por el método dependiente de cultivo en diferentes grupos de restricción. La agrupación se muestra en la Tabla 21:

Tabla 21. Agrupación de las colonias en los diferentes grupos de restricción.

Grupo restricción	Colonias representadas
I	1, 2,10, 12,14,18,20,37,40,43,47,49,54,55
II	29, 42, 44, 45, 46, 57, 58, 62
III	15, 16, 17,22, 27
IV	15, 22, 27
V	9, 13
VI	60

21. Optimización del gradiente desnaturalizante mediante DGGE perpendicular para los amplicones obtenidos a partir de la amplificación de la región D1/D2 por el método independiente de cultivo.

Se hizo una mezcla de los amplicones obtenidos a partir del ADN extraído directamente de las muestras de los quesos. Se partió de un volumen de reacción de amplificación de 50 μ L de cada muestra de queso y esta mezcla se cargó en el gel.

Se probó un gradiente 40%-90% desnaturizante, este gradiente se tomó con base en el artículo de Cocolin *et al.*, 2002. Se prepararon las soluciones desnaturizantes según la tabla del Anexo II "Soluciones reactivos"

Los resultados se muestran en la Figura 33.

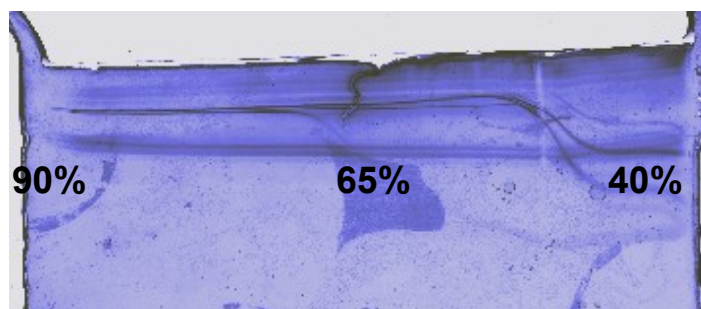


Figura 33 .DGGE perpendicular. Gradiente desnaturizante 40%-90%. Poliacrilamida al 8%. Tinción y revelado con plata, Kit PlusOne Silver Staining. GE Healthcare.

Con base en estos resultados se hizo otro gel perpendicular con un gradiente desnaturizante desde 10%-80% con el fin de observar la curva sigmoidea completa. Los resultados se muestran en la Figura 34.

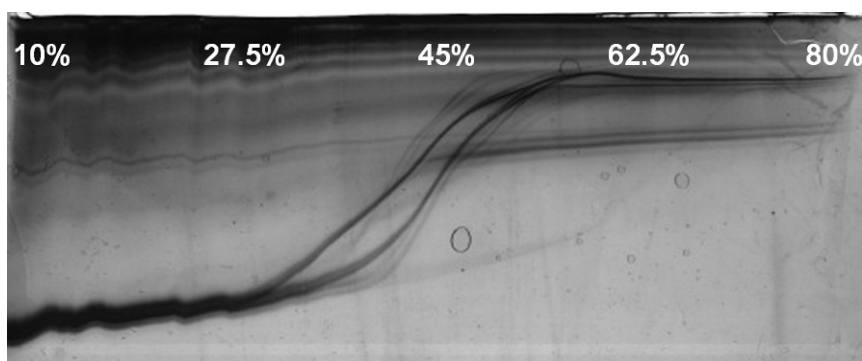


Figura 34. DGGE perpendicular. Gradiente desnaturizante 10%-80%. Poliacrilamida al 8%. Tinción y revelado con plata, Kit PlusOne Silver Staining. GE Healthcare.

Con base en los resultados obtenidos se tomará el gradiente de desnaturizante desde 25% hasta 55% para hacer el DGGE paralelo.

22. DGGE paralelo con gradiente desnaturalizante 25-55% para los amplicones obtenidos a partir de la amplificación de la región D1/D2 por el método independiente de cultivo de las muestras de queso.

Se cargaron los amplicones de las diferentes muestras de queso, a continuación se muestra el perfil de levaduras obtenido (Figura 35):

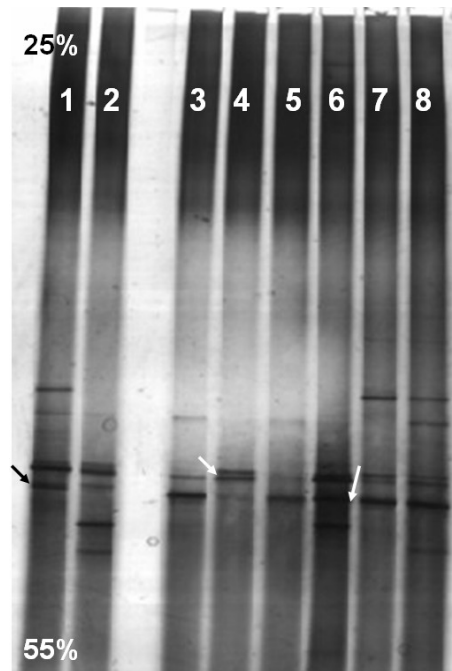


Figura 35. DGGE paralelo. Gradiente desnaturalizante 25-55%. Poliacrilamida al 8%. Tinción y revelado con plata, Kit PlusOne Silver Staining. GE Healthcare. Los números representan las diferentes muestras de queso (Tabla 5).

En la Figura 35 se observan las diferentes bandas pertenecientes a las muestras de los diferentes quesos. El patrón que se obtuvo dió una idea de la diversidad de levaduras que se encuentran en los diferentes quesos. Como ya se ha comentado en la metodología, cada banda debe corresponder a un microorganismo. Hay microorganismos/bandas que aparecen en todos los quesos. También se observó que algunas bandas están muy cercanas. Con el fin de optimizar la separación de estas bandas se probaron otros gradientes desnaturalizantes.

Los resultados de los diferentes gradientes que se probaron se muestran en el Anexo III "Optimización del gradiente desnaturalizante".

55%

El gradiente con el que se obtuvo la mejor separación de las bandas fue con el de 40%-55%, éste fue el gradiente con el que se trabajó.

23. DGGE paralelo a partir de los amplicones obtenidos por el método dependiente de cultivo.

Se observó el patrón migratorio por DGGE de algunos de los amplicones obtenidos por el método dependiente de cultivo, se tomaron para el estudio una representación de amplicones de cada grupo de restricción (Tabla 21), exceptuando la colonia 60 que no amplificó para este análisis.

En la Figura 36 se muestra el gel donde cargaron algunos de los amplicones de los microorganismos aislados por el método dependiente de cultivo, y una muestra de queso (Q2) como referencia.

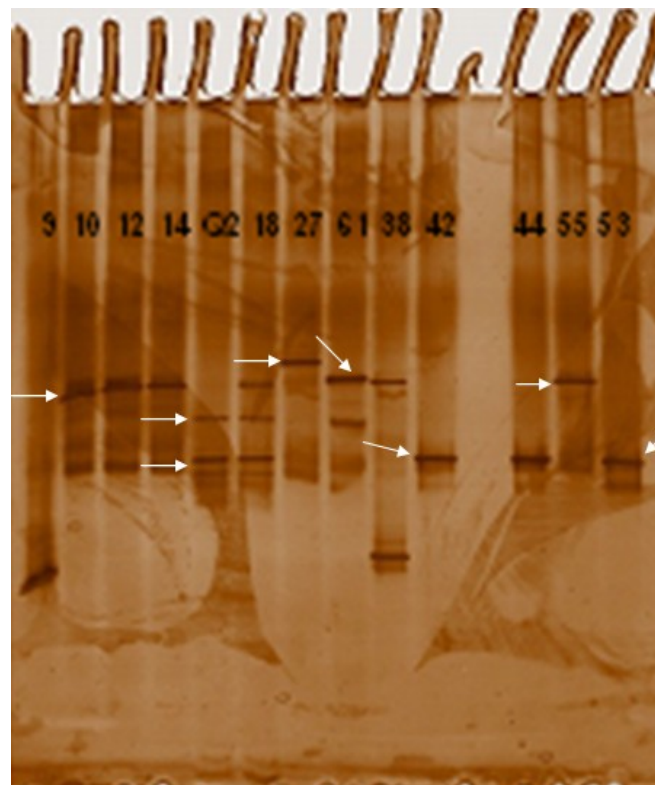


Figura 36: DGGE paralelo 40-55% de los amplicones obtenidos por el método dependiente de cultivo. Poliacrilamida al 8%. Tinción con plata, Kit PlusOne Silver Staining. GE Healthcare. Los números hacen referencia a los amplicones obtenidos por el método dependiente de cultivo, Q2 hace referencia al amplicón obtenido por el método independiente de cultivo a partir del queso 2. Con flechas se muestran las bandas discretas que representan los microorganismos aislados.

Muestras 10, 12, 14, 44 y 53: Aparece una banda discreta (se muestran en la Figura con flechas) y artefactos en la parte inferior del gel que proceden de la reacción de PCR y que se han teñido porque la plata tiene una gran sensibilidad aunque no es tan específica. Muestra 18: Se observaron varias bandas, esto puede ser debido a que parte de la muestra del queso 2 (Q2) haya pasado al carril contiguo. Se consideró por tanto la muestra 18 como la banda que aparece en la parte superior.

La posición de bandas de las diferentes cepas puras es congruente con el análisis morfológico de las colonias hecho previamente. Es decir, los microorganismos correspondientes a las cepas que migran en la misma posición tenían la misma morfología colonial y las que migran en posición diferente presentaban diferentes morfologías coloniales (en el medio WLN). Por otro lado también se encontró correspondencia con el patrón de restricción (Tabla 21).

En el gel de la Figura 37 se cargaron los amplicones de 3 muestras de queso (Q4, Q5 Y Q6), amplicones de los microorganismos aislados y dos mezclas de amplicones con el fin de ir integrando la información de los patrones de migración para la comparación de los diferentes métodos (dependiente e independiente de cultivo).

Los amplicones cargados en las diferentes mezclas fueron:

Mezcla 1 (**M1**): 12, 53, 59. Mezcla 2 (**M2**): 9, 15, 27, 29. Los números hacen referencia a los amplicones obtenidos por el método dependiente de cultivo.

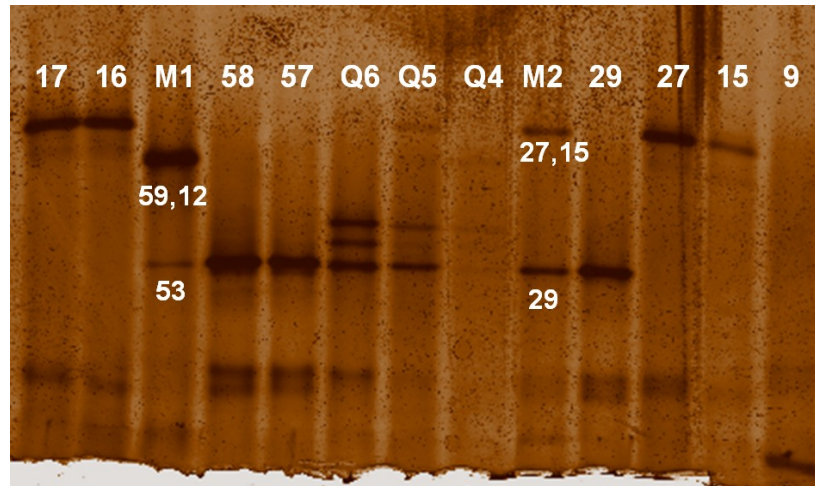


Figura 37: DGGE paralelo para cepas puras-quesos 1. Gradiente desnaturizante 40-55 %. Poliacrilamida al 8%. Tinción y revelado con plata, Kit PlusOne Silver Staining. GE Healthcare.

Los amplicones cargados en las diferentes mezclas se muestran en la Figura 38:

Mezcla 1 (**M1**): 57, 58, 61. Mezcla 2 (**M2**): 9, 15, 27, 29.

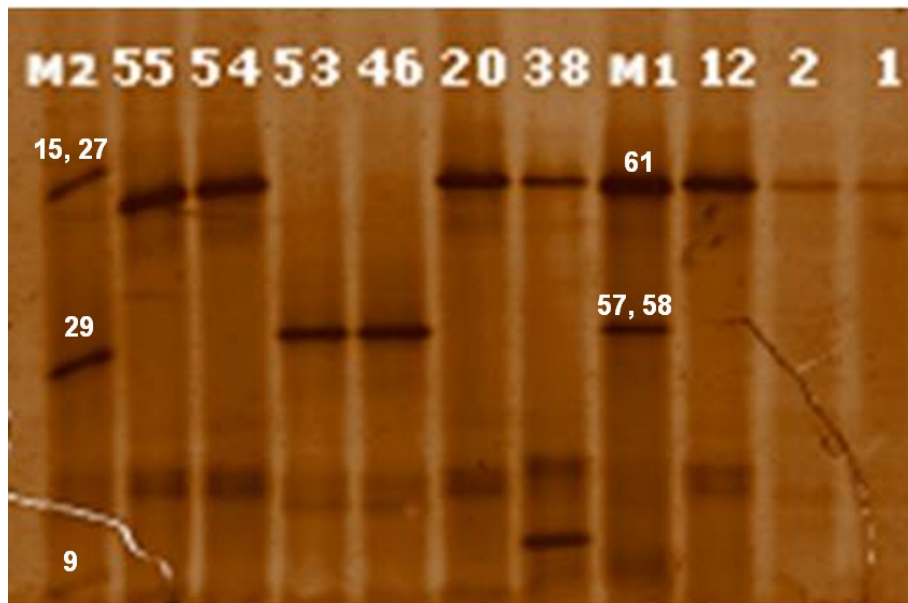


Figura 38: DGGE paralelo para cepas puras 2. Gradiente desnaturizante 40-55%. Poliacrilamida al 8%. Tinción y revelado con plata, Kit PlusOne Silver Staining. GE Healthcare. Los números hacen referencia a los amplicones obtenidos por el método dependiente de cultivo

Muestra 38: Aparecen dos bandas discretas, esta muestra se descartó por estar contaminada.

En la Figura 39 se muestra la carga de las muestras de los 8 quesos (amplicones) obtenidas por el método independiente (Q1-Q8) y mezclas de los amplicones obtenidos por el método dependiente.

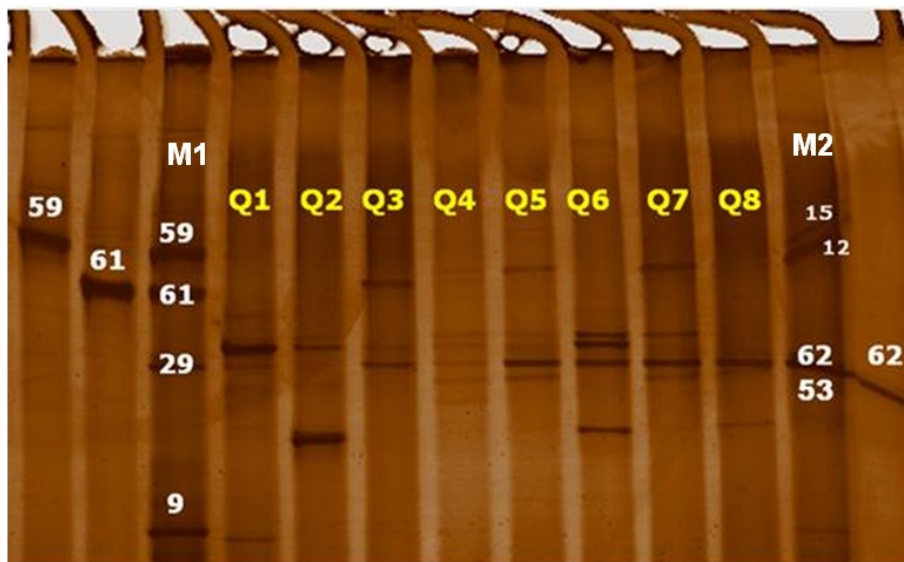


Figura 39: DGGE paralelo para microorganismos aislados y los quesos. Gradiente desnaturalizante 40-55%. Poliacrilamida al 8%. Tinción y revelado con plata, Kit PlusOne Silver Staining. GE Healthcare. Mezcla1 (M1): 9, 29, 59, 61, Mezcla 2 (M2): 12, 15, 53, 62

Se observó que algunos de los microorganismos presentes en las muestras de queso tienen el mismo patrón migratorio que el de los microorganismos aislados. También se observaron patrones migratorios exclusivos para algunos microorganismos aislados (cepas 9, 17, 59* y 61*) y para las muestras obtenidas por el método independiente de cultivo.

Para analizar la información obtenida de los diferentes geles de DGGE se hizo una representación a escala de todas las posiciones que ocupan las bandas en los diferentes geles de DGGE. Cada posición migratoria se enumeró (B1-B12).

En la Figura 40 se muestra la representación migratoria de las bandas encontradas en los diferentes geles de DGGE. En total se encontraron 12 patrones de migración.

¹ Cepas de referencia. *Yarrowia lipolytica* (59) y *Candida zeylanoides* (61). García, 2006.

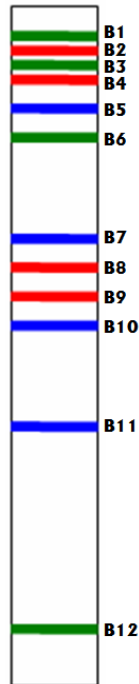


Figura 40: Representación de los diferentes patrones de migración obtenidos a partir de los geles de DGGE por los métodos dependiente e independiente de cultivo.

Esta información se relacionó con las bandas obtenidas a partir de los microorganismos aislados o colonias (método dependiente de cultivo) y de los quesos (método independiente de cultivo). Esta relación se muestra en la siguiente tabla (Tabla 22). Los números corresponden a la numeración dada a los microorganismos aislados o colonias, “los quesos” hace referencia a las muestras obtenidas por el método independiente de cultivo:

Tabla 22: Análisis del patrón de migración en el DGGE de las diferentes muestras obtenidas por los métodos dependiente e independiente.

Grupos de migración en DGGE	Muestras de colonias o de quesos.
B1	16,17. No correspondencia con los quesos analizados
B2	15, 27
B3	59. No correspondencia con los quesos analizados
B4	1, 2,10, 12, 14, 18, 20, 54, 55
B5	Banda exclusiva de los quesos
B6	61. No correspondencia con los quesos analizados
B7	Banda exclusiva de los quesos
B8	42, 44
B9	29, 46, 53, 57, 58,62
B10	Banda exclusiva de los quesos
B11	Banda exclusiva de los quesos
B12	9. No correspondencia con los quesos analizados

Bandas B2, B4, B8 y B9: Bandas de microorganismos aislados que corresponden, por migración en el gel, con las bandas de los quesos obtenidas por el método independiente de cultivo.

Bandas B1, B3*, B6* y B12: Bandas de microorganismos aislados que no corresponden con las bandas de los quesos, es decir que no se obtienen por el método independiente de cultivo (cepa 17 y cepa 9)

Bandas B5, B7, B10 y B11: Bandas de quesos que no corresponden con las bandas de los microorganismos aislados. Fueron obtenidas a partir del queso por el método independiente de cultivo pero no tienen correspondencia, en el perfil de DGGE, con las bandas de los microorganismos aislados por el método dependiente de cultivo.

El cultivo de microorganismos en placa puede limitar la diversidad microbiana ya que el crecimiento y la sobrevivencia se ven limitados, ya sea porque necesitan de la presencia de

¹ Cepas de referencia. García, 2006.

otros microorganismos o porque las condiciones para su cultivo no son las óptimas (Díaz, 2003). Este sería el caso de las bandas que se obtuvieron a partir del método independiente de cultivo (quesos) y que no tienen correspondencia con el patrón de migración de los microorganismos aislados.

Por otro lado tenemos los microorganismos aislados (método dependiente de cultivo) con patrones de migración que no corresponden con los patrones de los quesos (método independiente de cultivo), esto puede ser debido a varias causas en la metodología independiente de cultivo, principalmente la baja concentración de microorganismos, esta causa unida a otras podría sucederse en una subestimación de la diversidad microbiana.

Otras causas serían las siguientes:

- Los métodos de extracción de ADN no aseguran la lisis de todos los microorganismos.
- La pérdida de ácidos nucleicos durante la purificación del ADN.
- Inhibidores, intrínsecos al alimento, de la reacción de PCR.
- Amplificación preferencial.

(Friedrich *et al.*, 1997)

Esta explicación se aplicaría a las cepas 9, 16 y 17 (B1 y B12, respectivamente).

Puede confirmarse, hasta este punto, la hipótesis de este proyecto, ya que se ha obtenido una mayor diversidad, en cuanto a migración y número de bandas (microorganismos), por el método independiente de cultivo.

24. Análisis previo a la secuenciación de las diferentes muestras (microorganismos aislados/quesos)

Se integró la información obtenida con el fin de decidir que muestras se secuenciarían.

En la Tabla 23 se relacionan la posición migratoria, los grupos de restricción, las colonias de los microorganismos aislados, la morfología colonial WLN, las muestras de los quesos de donde se aislaron y la relación de correspondencia de las bandas obtenidas por el método independiente con las del método dependiente de cultivo. Sólo se tuvieron en cuenta los microorganismos aislados que fueron analizados por todos los métodos, ARDRA, RFLP, WLN y DGGE. En la Tabla se especifican los siguientes puntos:

- **Posición migratoria.** (Referencia tabla 22 y Figura 40)
- **Grupo de Restricción:** Basado en la región 26S y la ITS (Referencia Tabla 21)
- **Colonias:** Muestras obtenidas a partir del método dependiente de cultivo.
- **Morfología colonial WLN:** Obtenida a partir del aislamiento en medio WLN. (Referencia Tabla 13)
- **Quesos de donde se aislaron:** Número de la muestra de queso de donde fueron aisladas las diferentes colonias (Referencia Tabla 5).
- **Correspondencia métodos dependiente e independiente de cultivo:** Correspondencia del patrón migratorio de los microorganismos aislados (método dependiente de cultivo) con las muestras de los quesos obtenidas por el método independiente de cultivo.

Tabla 23. Comparación de los resultados obtenidos mediante la morfología colonial en WLN, ARDRA, RFLP y DGGE. Las bandas exclusivas del método DGGE se muestran en la tabla con las casillas en blanco ya que son exclusivas de éste y por tanto no tienen relación con los demás rubros de la tabla.

Posición migratoria DGGE	Grupo Restricción	Colonias	Morfología colonial WLN	Quesos de donde se aislaron	Correspondencia métodos dependiente e independiente
B1	III	16, 17	C	Q7, Q8	No correspondencia
B2	IV	15, 27	C, D	Q7, Q8	Q5 muy tenue
B3	-	59 ⁴	G	-	No correspondencia
B4	I	1,2,10,14, 18, 20, 40,54,55	A	Q4, Q5, Q6, Q7	Q4, Q5 y Q7
B5	-	-	-	-	-
B6	-	61 ⁸	A	-	No correspondencia
B7	-	-	-	-	-
B8	No se hizo patrón de restricción	42, 44 ⁵	F	Q6	Q1-Q6
B9	II	29, 46, 53, 57, 58, 62	E, F	Q6, Q8	Q1-Q6
B10	-	-	-	-	-
B11	-	-	-	-	-
B12	V	9	B	Q5	No correspondencia

En la Tabla 24 se muestra la representación que tienen las bandas exclusivas del método independiente de cultivo en los quesos.

Tabla 24: Representación bandas obtenidas exclusivamente por el método DGGE en las diferentes muestras de queso.

Posición migratoria	Presencia en quesos
B5	Q1-Q4 y Q7
B7	Q2 y Q4-Q7
B10	Q4, Q5, Q7 y Q8
B11	Q2, Q6 y Q8

Con la información recaudada en las tablas 23 y 24 y basándose principalmente en el patrón de migración se secuenciaron las siguientes bandas:

Posición migratoria B1, microorganismo aislado 17 (C17): Morfología colonial y patrón migratorio exclusivos.

Posición migratoria B2, microorganismo aislado 15 (C15): Morfología colonial exclusiva para este patrón migratorio. Correspondencia migratoria con banda de queso (Q5).

⁴ Utilizadas como referencia. Obtenidas del proyecto de García, 2006

⁵ 42, 44: Estas cepas no se sometieron al análisis de restricción de la región ITS

Posición migratoria B4, microorganismo aislado 10 (C10): Se tomó esta colonia como muestra del grupo A (WLN) con mayor representatividad (métodos dependiente e independiente de cultivo).

Posición migratoria B5: Patrón migratorio exclusivo de las muestras de queso por el método independiente de cultivo. Banda presentada en 5 de los 8 quesos.

Posición migratoria B7: Patrón migratorio exclusivo de las muestras de queso por el método independiente de cultivo. Banda presentada en 5 de los 8 quesos.

Posición migratoria B8, microorganismo aislado 44 (C44): Banda presentada en 6 de los 8 quesos.

Posición migratoria B9, microorganismo aislado 29 (C29): Morfología colonial exclusiva. Banda presentada en 6 de los 8 quesos.

Posición migratoria B9, microorganismo aislado 57 (C57): Morfología colonial diferente a la C29. Banda presentada en 6 de los 8 quesos.

Posición migratoria B12, microorganismo aislado 9 (C9): Patrón de restricción, morfología colonial y patrón migratorio exclusivo

25. Secuenciación e identificación

Se secuenciaron los amplicones obtenidos a partir de la reacción de PCR con los cebadores NL1 y NL4.

La identificación de los microorganismos se hizo a partir de la comparación de la secuencia obtenida con secuencias de una base de datos. La herramienta utilizada fue BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que trabaja con la base de datos Genbank. Esta base de datos forma parte del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el acceso <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Los electroferogramas de cada amplicon se muestran en el Anexo VI “Secuencias”.

El alineamiento obtenido de cada secuencia con la base de datos GenBank se muestra en el Anexo V “Alineamiento secuencias en Genbank”. La secuencia del microorganismo aislado C29 (B9) mostró varias indefiniciones por lo que se analizó el electroferograma previamente al ingreso en GenBank. La secuencia ingresada se muestra en el Anexo V.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 25, junto con referencias de otros hábitats donde se han encontrado estas especies:

Tabla 25: Identificación de los microorganismos y relación con la posición en el DGGE.

PM	Muestra	Microorganismo	Identidad (%)	AL	AP	Encontrado en	Referencias
B1	C17	<i>Candida zeylanoides</i>	100%	SÍ	NO	Aguas marinas. Alimentos como jamón fresco, curado y salado. Productos cárnicos curados	Li <i>et al.</i> , (No publicado). Moreno-Terrazas <i>et al.</i> ,(No publicado), Nielsen <i>et al.</i> 2008
B2	C15	<i>Candida zeylanoides</i>	99%	SÍ	NO	Aguas marinas. Alimentos como jamón fresco, curado y salado. Productos cárnicos curados	Li <i>et al.</i> , (No publicado). Moreno-Terrazas <i>et al.</i> ,(No publicado) Nielsen <i>et al.</i> 2008,
B4	C10	<i>Candida parapsilosis</i>	99%	SÍ	NO	Aguas marinas, Cecina, Masa y Frutas	Chang <i>et al.</i> , Bhadra <i>et al.</i> , Luangsakul <i>et al.</i> , Moreno-Terrazas <i>et al.</i> , Zheng <i>et al.</i> , (No publicados), Zullo <i>et al.</i> 2008
B5	B5	<i>Candida parapsilosis</i>	99%		–	Aguas marinas, Cecina, Masa y Frutas	Chang <i>et al.</i> , Bhadra <i>et al.</i> , Luangsakul <i>et al.</i> , Moreno-Terrazas <i>et al.</i> , Zheng <i>et al.</i> , (No publicados), Zullo <i>et al.</i> 2008
B7	B7	<i>Kluyveromyces lactis</i>	99%		–	Agave, pulque y derivados lácteos	Herrera-Solorzano <i>et al.</i> , Tapia-Tussell <i>et al.</i> , Zhang <i>et al.</i> ,(No publicados).
B8	C44	<i>Kluyveromyces lactis</i>	100%	NO	SÍ	Agave, pulque y derivados lácteos	Herrera-Solorzano <i>et al.</i> , Tapia-Tussell <i>et al.</i> , Zhang <i>et al.</i> (No publicados).
B9	C57	<i>Kluyveromyces lactis</i>	99%	NO	SÍ	Agave, pulque y derivados lácteos	Herrera-Solorzano <i>et al.</i> , Tapia-Tussell <i>et al.</i> , Zhang <i>et al.</i> , (No publicados).
B9	C29	<i>Candida zeylanoides</i>	98%	SÍ	SÍ	Aguas marinas. Alimentos como jamón fresco, curado y salado. Productos cárnicos curados	Li <i>et al.</i> , (No publicado). Moreno-Terrazas <i>et al.</i> ,(No publicado) Nielsen <i>et al.</i> 2008,
B12	C9	<i>Candida parapsilosis</i>	99%	SÍ	NO	Aguas marinas, Cecina, Masa y Frutas	Chang <i>et al.</i> , Bhadra <i>et al.</i> , Luangsakul <i>et al.</i> , Moreno-Terrazas <i>et al.</i> , Zheng <i>et al.</i> , (No publicados), Zullo <i>et al.</i> 2008et al. 2008

Actividad proteolítica, (**AL**) lipolítica: Obtenida a partir del aislamiento en los medios leche descremada, SM (o ALD), y agar tributirina, TA, respectivamente. **PM**: Posición migratoria (Referencia Tabla 22 y Figura 40)

Para corroborar la identidad de las levaduras identificadas en este estudio por comparación con las bases de datos (GenBank), se hizo un análisis de confiabilidad Bootstrap. Se analizaron 35 secuencias incluidas las obtenidas en este proyecto. Las secuencias se ingresaron en el programa MEGA 4 (Tamura, 2007) y se alinearon procediendo al análisis. A continuación (Tabla 26) se muestran los números de acceso a las secuencias de la región parcial del gen ADN_r del 26S que se obtuvieron de la base de datos GenBank y se utilizaron para este análisis.

Tabla 26. Secuencias ingresadas al programa MEGA 4 para realizar prueba de confiabilidad:

Microorganismo	No. Acceso GenBank	Fuente y Referencia
<i>Candida zeylanoides</i> strain 10C-1	FJ480853	Búsqueda de la diversidad de levaduras marinas. Zhao et al., (No publicado)
<i>Candida zeylanoides</i> CO2	EU879959	Cecina salada. Moreno-Terrazas et al., (No publicado)
<i>Candida zeylanoides</i> CT4	EU879956	Cecina salada. Moreno-Terrazas et al., (No publicado)
<i>Candida zeylanoides</i> sycyw-3	EU359817	Búsqueda en la diversidad de levaduras marinas. Li et al., (No publicado)
<i>Candida zeylanoides</i> TJY7a	EU359821	Búsqueda de la diversidad de levaduras marinas. Li et al., (No publicado)
<i>Candida parapsilosis</i> s01-2.6	FJ527856	Búsqueda de la diversidad de levaduras marinas. Zhao et al., (No publicado)
<i>Candida parapsilosis</i> W10-3.1	FJ483899	Búsqueda de la diversidad de levaduras marinas Zhang et al., (No publicado)
<i>Candida parapsilosis</i> EXOC16	AY894827	Agave fourcroydes
<i>Candida parapsilosis</i> N01-1.2 26S	FJ432627	Búsqueda de la diversidad de levaduras marinas. Zhao et al., (No publicado)
<i>Candida parapsilosis</i> BG02-7-18-013C-C-1	AY520377	Levaduras aisladas de escarabajos asociados a plantas e insectos. Suh et al.
<i>Candida parapsilosis</i> CO3 26S	EU879960	Levaduras encontradas en el alimento tradicional mexicano Cecina. Moreno-Terrazas et al., (No publicado)

Microorganismo	No. Acceso GenBank	Fuente y Referencia
<i>Candida parapsilosis</i> gene for 26S RNAr	AB370926	Levaduras aisladas de masa para hacer pan al vapor chino. Luangsakul et al., (No publicado).
<i>Candida oleophila</i>	EF452234	Encontradas en la filosfera de plantas. Yurkov et al. (2007).
<i>Candida oleophila</i> SDY 4.5.4	AY731813	Levaduras aisladas en ambientes extremos. Gadanho et al. (2006).
<i>Kluyveromyces lactis</i> strain FFJ22-1	EU807916	Levaduras aisladas en el este del mar de China. Zheng, et al. (No publicado)
<i>Kluyveromyces lactis</i> isolate G5p1	AY305672	Levaduras implicadas en la fermentación de un café arábigo africano. Masoud et al., (2004)
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 141T	AJ508583	Evaluación de las secuencias del ARNr y del gen actina genes para la identificación de levaduras ascomycetes. Daniel and Meyer (2003)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	AF374614	Levaduras encontradas en leche cruda. Cocolin et al. (2002)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	D83467	Relaciones filogenéticas de especies del género <i>Kluyveromyces</i> van der Walt. (saccharomycetaceae) Ando et al., (1996)
<i>Yarrowia lipolytica</i> strain HNN-2	EU822496	Levaduras aisladas en el este del mar de China. Zheng, et al. (No publicado)
<i>Yarrowia lipolytica</i> strain D04-2.2	FJ485704	Búsqueda en la diversidad de levaduras marinas. Liu et al., (No publicado)
<i>Penicillium chrysogenum</i> XJURML-7 26S	EU146308	Identificación molecular de hongos filamentosos.
<i>Pichia mexicana</i> strain N04-2.6	FJ516748	Búsqueda de la diversidad de levaduras marinas. Zhao et al., (No publicado)
<i>Debaryomyces hansenii</i> strain D03-3.6	FJ485726	Búsqueda en la diversidad de levaduras marinas. Liu et al., (No publicado)
<i>Candida tropicalis</i> DBF-4	FJ535249	

A continuación se muestra el árbol consenso obtenido a partir del análisis Bootstrap con el programa MEGA.

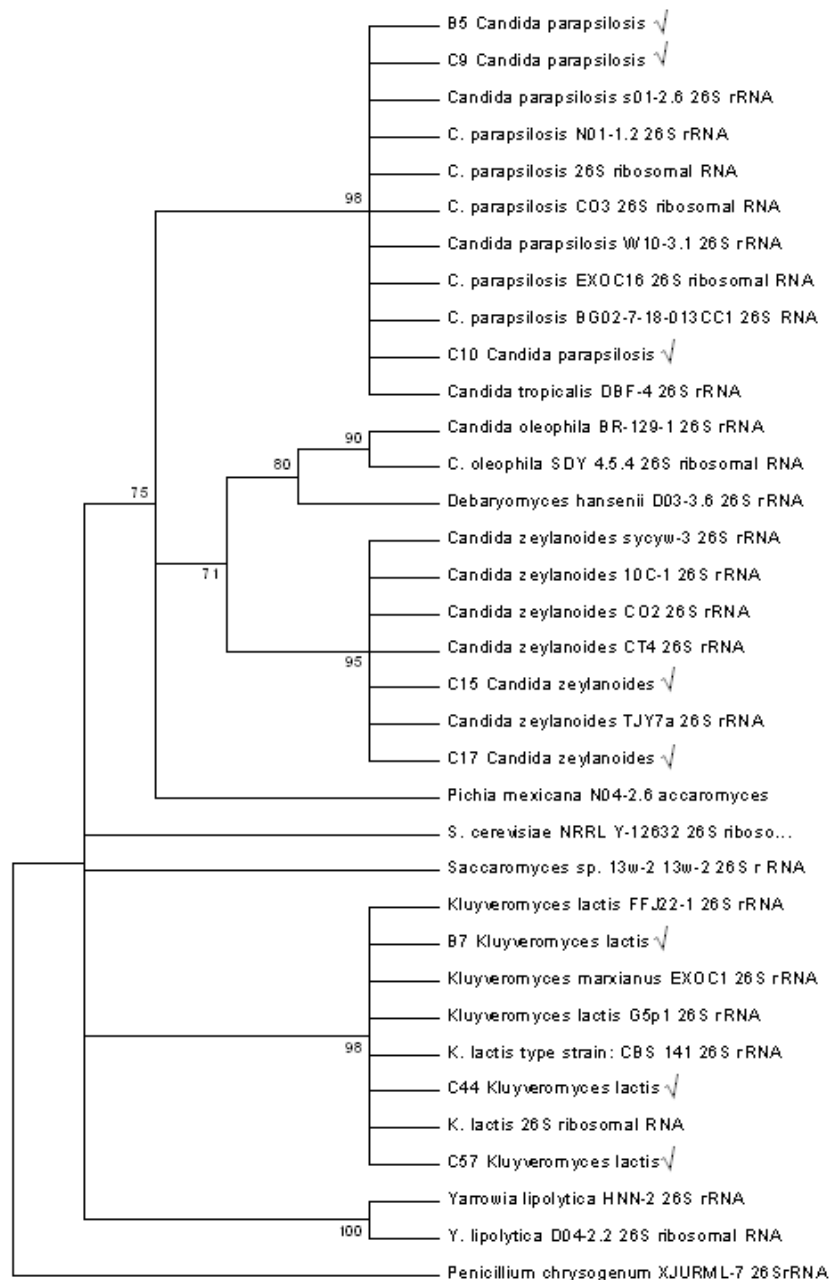


Figura 24. Relación filogenética de levaduras, mediante el análisis del dominio D1/D2 del gen ARNr 26S. La relación filogenética se inferió utilizando el método de Neighbor-Joining (Saitou et al.1987). El árbol consenso inferido de entre 1000 remuestreos, representa la relación entre las 35 secuencias analizadas (Felsenstein, 1985). El valor que se muestra junto al nodo de donde se derivan las ramas del árbol, corresponde al porcentaje en el que fueron asociadas las secuencias en el mismo clado en el análisis por bootstrap, 1000 réplicas (Felsenstein, 1985)). La distancia de la relación fue calculada usando el método de Tamura-Nei (Tamura et al. 1993). Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del grupo de secuencias analizadas. Cada una de ellas contenían 315 posiciones. El análisis fue realizado empleando el programa MEGA4 (Tamura, 2007).

Esta clasificación mostró que la confiabilidad para las especies identificadas como *Candida parapsilosis* y *Kluyveromyces lactis* fue de un 98%, para las especies identificadas como *Candida zeylanoides* fue de un 95%. Un porcentaje mayor o igual al 70% se considera confiable. Con el símbolo "✓" se muestran las secuencias identificadas en este proyecto.

Como se muestra en la Tabla 25, las levaduras identificadas en el queso Cotija también han sido reportadas en otros alimentos y en ambientes marinos. Debido a que el queso Cotija se elabora con sal de grano o de mar artesanal, la fuente de las especies del género *Candida* podría ser ésta.

Por otro lado, a excepción de la posición B12 y el microorganismo aislado C29 (B9), las levaduras con el mismo género y/o sp. aparecen como bandas cercanas o adyacentes en el patrón de bandas del DGGE.

La presencia de actividad lipolítica o proteolítica de las levaduras encontradas tendrán repercusión en la producción de aromas y sabores en el queso Cotija. Esta presencia de alguna de las actividades ha sido reportada anteriormente:

La especie *Candida zeylanoides* ha sido reportada principalmente como lipolítica, por ejemplo en alimentos cárnicos (Nielsen *et al.*, 2008). En el jamón curado se relacionó con la producción de compuestos volátiles como dimetilsulfuro y metanetiol y compuestos volátiles de cadena ramificada (Andrade *et. al.*, 2009). La especie *Candida parapsilosis* ha sido reportada como lipolítica por ejemplo en aceite de oliva (Zullo *et al.* 2008). La especie *Kluyveromyces lactis* ha sido reportada como proteolítica (Fox, 1997, Fleet, 1990). Tiene la capacidad de asimilar lactosa y posee actividad peptidásica. Se ha estudiado la relación de ésta con la producción de compuestos de sabor en quesos como etanol, ésteres de etilo, acetato de etilo y compuestos volátiles de cadena ramificada (De Freitas *et al.*, 2009)

Las especies de levaduras obtenidas han sido reportadas en otros alimentos curados o fermentados, bebidas fermentadas, y en aguas marinas. El queso Cotija es un queso madurado y salado, por tanto se relacionan las levaduras identificadas con las de la bibliografía.

Conclusiones:

- El objetivo de este trabajo era la identificación de levaduras en el queso Cotija.

Se identificaron las siguientes especies de levaduras:

✓ *Candida zeylanoides*

✓ *Candida parapsilosis*

✓ *Kluyveromyces lactis*

- Se aislaron 31 colonias de levaduras a partir de 8 muestras de queso Cotija “Región de Origen”, el medio de cultivo WLN fue una buena herramienta para discriminar entre ellas.
- La técnica de DGGE resultó ser una buena herramienta para visualizar la biodiversidad de levaduras en el Queso Cotija.
- La diversidad de levaduras encontrada por el método independiente de cultivo fue mayor a comparación del método dependiente de cultivo.
- El patrón de restricción de la región ITS mostró mayor poder discriminatorio que el de la región 26S.
- El patrón de restricción funcionó como una herramienta discriminatoria entre las cepas puras obtenidas por el método dependiente de cultivo.
- El patrón de bandas obtenido a partir de DGGE muestra mayor biodiversidad que el obtenido a partir del análisis de ARDRA y RFLP, sin embargo, todos los métodos incluyendo la diferenciación morfológica se complementaron dando mayor información en conjunto.
- *Candida parapsilosis* y *Kluyveromyces lactis* se encontraron en la mayoría de las muestras analizadas.
- *Candida zeylanoides* se presentó en los quesos Q6, Q7 y Q8, *Candida parapsilosis* se presentó en los quesos Q1, Q4-Q7, *Kluyveromyces lactis* se presentó en los quesos Q2, Q4-Q8.

Ando, S., Mikata, K., Tahara, Y. and Yamada, Y. (1996). Phylogenetic relationships of species of the genus *Kluyveromyces* van der Walt (Saccharomycetaceae) deduced from the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (7): 1063-1069.

Andrade, M. J., Córdoba, J. J., Sánchez, B., Casado, E. M., Rodríguez, M. (2009). Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. *Food Chemistry* 113: 457–463.

Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche*. Acribia. Zaragoza. España.

Ampe, F., Omar Ben, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5464-5473.

Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23 791–796.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (2005). *Current protocols in molecular biology* John Wiley and sons, Inc.

Barajas, R., Barragán, E., Chombo, P. (2005). Reglas de uso, Marca Colectiva “Queso Cotija Región de Origen”. México pp. 1-24.

Ben Omar, N., Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9): 3664-3673.

Beresford, T., Fitzsimons, N., Brenan, N., and Cogan, T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259-54.

Bhadra, B. (No publicado). Yeast strains isolated from fruits.

Bloch, K. D. (1995). Current Protocols in Molecular Biology. Restriction Endonucleases. Section 1 Unit 3.1.

Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.C., Toldrá, F. (2008). Purification and characterisation of Proteases A and D from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 124: 135–141.

Chang, C.-F. and Liu, S.-M (No publicado). Molecular identification and characterization of yeasts isolated from sea surface microlayer and underlying water at Keelung on the northeast coast of Taiwan.

Chen, T., Boles, R.G., Wong, L.C. (1999). Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Clinical Chemistry* 45(8): 1162–1167.

Clemente-Jiménez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21: 149–155.

Cocolin, L., Bisson L. F., Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS-Microbiology Letters* 189: 81-87

Cocolin L., Aggio D., Manzano M., Cantoni C., Comi G. (2002). An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* 12 (5): 407-411.

Cogan T. (2000) Cheese microbiology. In P. F. Fox, T. Guinee, T.M. Cogan, & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publisher.

Cortés L. A. (2007). Cuantificación de microorganismos indicadores y diseño de cebadores para la identificación de bacterias ácido lácticas en el queso Cotija por PCR. Proyecto de "Laboratorio de Desarrollo Experimental de Alimentos". Facultad de Química. UNAM

Dahl, S., Tavaría, F. K., Malcata, F. X. (2000). Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* 10: 255–262.

Daniel, H. M. and Meyer, W. (2003) Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 86:1-2: 61-78.

Davis, J. G. (1965). *Cheese* Vol. 1. J.L Churchil. Londres, Inglaterra.

De Freitas, I., Pinon, N., Maubois J-L., Lortal, S., Thierry, A. (2009). The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *International Journal of Food Microbiology* 129: 37–42

De Llanos Frutos, R., Fernández-Espinar, M. T., Querol A., (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek* 85: 175–185.

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

Dolinsky, L.C.B. (2002). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Mutation Detection in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *Methods in Molecular Biology* 217: 165-175.

Encinas, J. P., López-Díaz, T. M., García-López, M. L., Otero A., Moreno, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54: 203-208.

Eliskases-Lechner, F., Ginzinger, W. (1995). The yeast flora of surface ripened cheeses. *Milchwissenschaft* 50: 458–462.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329–337.

Estrada, C. A. (2007). Comparación de técnicas para cuantificar microorganismos coliformes y determinación de la calidad microbiológica en quesos artesanales. Proyecto de "Laboratorio de Desarrollo Experimental de Alimentos" Facultad de Química. UNAM.

Estrada, C. A. (2008). Análisis microbiológico de queso Cotija. Identificación de microorganismos patógenos mediante la técnica de PCR punto final. Proyecto de Tesis. Facultad de Química. UNAM.

Fadda, M. E., Cosentino, S., Depilano, M., Palmas, F. (2001). Yeast populations in Sardinian feta cheese. *International Journal Food Microbiology* 69: 153–156.

Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Depilano, M., Cosentino, S. (2004). Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal Food Microbiology* 95: 51–59.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 78 (1) 87-97.

Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68: 199-211.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T. M., McSweeney P. L. H., (2000). *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers. Maryland

Fox, P.F. (1987). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Applied Science. London.

Friedrich, V. W., Göbel, U. B., Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21 (3): 213-229.

Gadanho, M., Libkind, D., Sampaio, J.P. (2006). Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. *Microbial Ecology* 52 (3): 552-563.

Gafana, G. P., Spratta, D. A. (2005). Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE) – An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiology Letters* 253 (2): 303 - 307.

García, M., Quintero, R., López-Munguía, A. (1999). *Biología alimentaria*. Edit. Limusa, S.A. de C.V., Grupo Noriega editores. México D.F.

García, V. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Ginnis, Mc M., R. (1980). *Laboratory Handbook of Medical Mycology*, Academic Press INC, New York-USA.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169: 387–392.

Hernández, V. (2007). "Queso Cotija: Estudio del Análisis Físicoquímico, Proximal y Actividad Antioxidante". Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Herrera-Solorzano, M., Lappe-Oliveras, P., Márquez-Valdelamar, L. (No publicado). Polyphasic identification of yeast and lactic acid bacteria isolated from agave sap, pulque and pulque starter.

Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J. M. (2004). New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology* 97: 792–801.

Hoog G.S., Guarro J., (1995). *Atlas of Clinical Fungi*. Centralbureau voor Schimmelcultures y Universitat Rovira i Virgili. The Netherlands and Spain

Ilabaca, C., Navarrete P., Mardones P., Romero J., Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology* 126: 245–249.

Keller, M., and Zengler K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology* (2):141-50.

Kurztman, C. P. and Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73 : 331-371.

La Jornada, 14 de Noviembre 2006. Concurso en Italia; participaron 500 tipos de varios países."Eligen al queso de Cotija, Michoacán, como el mejor del mundo este año". <http://www.jornada.unam.mx/2006/11/14/index.php?section=estados&article=037n3est>.

Lewin, B. (2002). *Genes VII*. Oxford University Press. N.Y.

Li, M., Zhang, Y. and Ju, L. (No publicado). Research on diversity of marine yeast.

Liu, G., Zhang, X. and Chi, Z. (No publicado). Research on diversity of marine yeast.

Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23 (4): 341-350.

Luangsakul, N., Keeratipibul, S., Tanasupawat, S. and Jindamorakot, S. (No publicado). Lactic acid Bacteria and Yeast Isolated from Dough of Chinese Steamed Bun in Thailand.

Manners, D. J., Masson, A. J., Patterson J. C. (1973). The structure of a b-(133)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemistry Journal* 135:19–30.

Marcellino, N., & Benson, D. R., (1992). Scanning electron and Light microscopy study of microbial succession on Bethlehem St. Nectarine cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3448-3454.

Marilley, L., Casey, M. (2003). Flavours of cheese products: metabolic pathways analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90:139-59

Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21 (7):549-556

McKee, T., McKee, J. R. (2003). *Bioquímica: La base molecular de la vida*. Primera edición. Ed. Mc Graw-Hill.

Michot, B., Bachellerie, J. P. (1987) Comparisons of large subunit rRNAs reveal some eukaryote-specific elements of secondary structure. *Biochimie* 69, 11–23.

Michot, B., Qu, L.-H., Bachellerie, J. P. (1990) Evolution of large-subunit rRNA structure. The diversification of divergent D3 domain among major phylogenetic groups. *European Journal of Biochemistry* 188, 219–229.

Moreno-Terrazas, R., Mendoza, N., Piter, V., Zarkin, M., Doria-Serrano, C., Marquez, L. and Lappe-Oliveras, P., (No publicado). Microbiota characterization in 'cecina', a Mexican traditional intermediate moisture salted meat product

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.

Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wachter, C. (1997). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. Akkermans ADL, van Elsas JD & de Bruijn FJ (Eds) *Molecular Microbial Ecology Manual* (3.4.4.:pp. 1-27) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Muyzer, G., and Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141.

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2:317-322.

Nielsen, D. S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A. G., Arneborg, N. (2008). Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. *Meat Science* 80(3): 919-926.

NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta Mohos y Levaduras en alimentos

NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa

Nunn, G. B., Theisen, B. F., Christensen, B., Arctander, P. (1996) Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order Isopoda. *Journal of Molecular Evolution* 42, 211–223.

Osorio, E., Chaves, C., Tofalo, R., Paparella, A., Suzzi, G. (2008). Detection and identification of wild yeasts in Champus, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiology* 25: 771-777.

Pace N. R. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* 276 (5313): 734-740.

Pallmann, C. L., Brown, J.A., Olineka, T.L., Cocolin, L., Mills, D.A., Bisson, L.F. (2001). Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. *American Journal Enology Viticulture* 52 (3): 198-203.

Perera, J., Tormo, A., García, J.L. (2002). Ingeniería Genética Vol.I, capítulo Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Ed. Síntesis. España.

Petersen, K. M., Møller, P. L., Jespersen L. (2001). DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69: 11–24.

Poméon, T. (2007). El queso Cotija, México. Un producto con marca colectiva queso “Cotija Región de origen”, en proceso de adquisición de una Denominación de Origen. Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen. CIESTAAM, Universidad Autónoma Chapingo. [Vínculo virtual: http://www.fao.org/ag/agn/agns/Projects_SQP_Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cotija/Queso_COTIJA_Mexico.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/agns/Projects_SQP_Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cotija/Queso_COTIJA_Mexico.pdf)

Ruiz Linares, A., Hancock, J. M., Dover, G. A. (1991) Secondary structure constraints on the evolution of *Drosophila* 28S ribosomal RNA expansion segments. *Journal of Molecular Biology* 219: 381–390.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Sheffield, V.C., Beck, J.S., Stone, E.M., Myers, R. M. (1992). A simple and efficient method for attachment of a 40-base pair, G-C rich sequence to PCR-amplified DNA. *BioTechniques* 12: 386-387.

Sheffield, V. C., Cox, D.R., Myers, R.M. (1989). Attachment of a 40- bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 232-236.

Suárez, B., Pando, R., Fernández, N., Querol, A., Rodríguez, R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* 24: 25–31.

Suh,S.-O., McHugh,J.V., Pollock,D.D., Blackwell,M (No publicado). Budding yeasts from the gut of basidiocarp-feeding beetles have astonishing biodiversity levels.

Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Romayo, A., Caceres-Farfan, M., Larque-Saavedra, A. , Perez-Brito, D. (No publicado). Phenotypic and genotypic characterization of *Kluyveromyces marxianus* isolates from *Agave fourcroydes*.

Villegas, A. (2004). *Tecnología quesera*. Editorial Trillas México D.F. pág. 316-321.

Welthagen, J.J., Viljoen, B.C. (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 41: 185–194.

Welthagen, J.J., and Viljoen, B.C. (1999). The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiology* 16: 63-73.

Westall, S., Filtenborg, O. (1998). Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiology* 15: 243-249.

Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4576-4579.

Yurkov, A.M. Glushakova, A.M., Chernov, I.Y. (2007). Mass isolation of anamorphic ascomycetous yeasts *Candida oleophila* from plant phyllosphere. *Microbiology "in press"*.

Zhang, H., Ni, H., Sun, T. (No publicado). The identification and biodiversity of yeasts isolated from Koumiss in Xinjiang of China.

Zhao, X., Wang, Z., Cui, W. (No publicado). Research on diversity of marine yeast

Zheng, J., Wang, X., Cui, W. (No publicado). Research on diversity of marine yeast in East China Sea.

Zullo, B.A., Ciafardini, G. (2008). Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology* 25 970–977.

Todos los medios de cultivo y caldos de enriquecimiento una vez preparados tienen que esterilizarse a 121°C durante 15 minutos.

Tabla I.1. Agar PDA

Agar extracto de malta Oxoid PDA	
Infusión de papa	200 g
Dextrosa	20g
Agar	15g
Agua	hasta 1L

Tabla I.2 Agar MEA

Agar extracto de Malta Difco TM (MEA)	
Maltosa	12.75 g
Dextrina	2.75 g
Glicerol	2.35 g
Peptona	0.78 g
Agar	15.0 g
Agua	hasta 1 L

Tabla I.3 Agar y Caldo YM

Agar YM:
Extracto levadura: 0.1%
Dextrosa: 2 %
Peptona: 0.5 %
Agar: 1.5%

Caldo YM (Yeast Medium):
Extracto levadura: 0.1%
Dextrosa: 2 %
Peptona: 0.5 %

Tabla I.4 Caldo YPD

Caldo YPD (Yeast extract Peptone Dextrose):	
Extracto levadura	1%

Dextrosa	2%
Peptona	2%
Medio WL (Wallerstein Laboratory Nutrient):	
Extracto de levadura	4.0 g
Triptona	5.0 g
Dextrosa	50 g
Fosfato monopotásico	0.55 g
Cloruro potásico	425.0 mg
Cloruro cálcico	125.0 mg
Sulfato de Magnesio	125.0 mg
Cloruro Férrico	2.5 mg
Sulfato de Manganeso	2.5 mg
Verde de Bromocresol	22.0 mg
Agar	15.0 g

Tabla I.5 Agar WLN

Adicionar 28 ml de NaCO₃ al 1% para llevar el pH de la solución a 6.5

Agua destilada filtrada: Aforar a 1000 ml

Tabla I.6 Agar LDA (SM)

Medio Agar Leche	
Leche descremada Skim milk	15.0 g
Agar	15.0 g
Aforar en 1L.	

Tabla I.7 Agar TA

Medio T.A. (Agar tributirina)	
Bacto Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Tributirinal	10.0 ml

Aforar hasta 1L. Emulsificar (2-3 min).

Ajustar el pH A 7.5 con NaOH 0.1 N.

Adicionar 1 ml de Glucosa al 20% previamente filtrada y esterilizada.

Tabla II.1 Buffer 1X para electroforesis en gel de agarosa

Reactivo	Cantidad
Buffer TAE 50X	140 ml
dH ₂ O	Hasta 7000 ml

Tabla II.2 Buffer TAE 50X

Reactivo	Cantidad	Concentración
Tris base	242.0 g	2M
Ácido acético glacial	57.1 ml	1M
EDTA 0.5M, pH 8.0	100.0 ml	50mM
dH ₂ O	Hasta 1,000.0 ml	

Tabla II.3 Buffer de carga para electroforesis

Reactivo	Cantidad
2% de Azul de bromo fenol	1.4 ml
2% de Cianol-xilenol	6.0 ml
Glicerol al 100%	7.0 ml
dH ₂ O	Hasta 20.0 ml

Tabla II.4 Buffer de lisis

Reactivo	Cantidad	Concentración
Tris HCl	2 mL	2 M
NaCl 5M	0.5 mL	250 mM
SDS 20%	0.65 mL	25 mM
EDTA 0.5M, pH 8.0	0.5 mL	0.5%
dH ₂ O	Hasta 100 ml	-

Tabla II.5

Poliacrilamida:Acrilamida/Bis al 40% (37.5:1)

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	38.93 g
Bis-acrilamida	1.07 g
dH ₂ O	Hasta 100 ml

Tabla II. 6 Solución poliacrilamida desnaturizante al 100%

Reactivo	Cantidad
40% Acrilamida/Bis	20 ml
buffer 50X TAE	2 ml
Formamida	40 ml
Urea	42 g
dH ₂ o	Hasta 100 ml

Tabla II.7 Solución poliacrilamida desnaturizante al 0%

Reactivo	Cantidad ml
40% Acrilamida/Bis	20
buffer 50X TAE	2
dH ₂ o	Hasta 100 ml

Tabla II.8 Solución poliacrilamida desnaturizante al 35%-60%

Gradiente	35%		40%	50%	55%	60%
Poliacrilamida	5 ml		5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Buffer TAE 50 X	0.5 ml		0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Formamida	3.5 ml		4 ml	5 ml	5.5 ml	6 ml
Urea	3.67 g		4.2 g	5.25 g	5.77 g	6.3 g
H ₂ O	Aforar a 25 ml		Aforar a 25 ml	Aforar a 25 ml	Aforar a 25 ml	Aforar a 25 ml

Una vez preparadas las soluciones de poliacrilamida:

- Filtrar con membrana de 0.45 µL
- Desgasificar durante 10-15 minutos
- Almacenar a 4°C máximo 30 días

8							
1							
0	0	0	0	1	0	0	1
2							
0	0	0	0	1	0	0	1
9							
0	1	0	0	0	1	1	0
10							
0	0	0	0	1	0	0	1
12							
0	0	0	0	1	0	0	1
13							
0	1	0	0	0	1	1	0
14							
0	0	0	0	1	0	0	1
16							
1	0	0	1	0	0	0	0
17							
1	0	0	1	0	0	0	0
20							
0	0	0	0	1	0	0	1
22							
0	1	1	0	0	0	0	0
27							
0	1	1	0	0	0	0	0
29							
0	1	1	0	0	0	0	0
37							
0	0	0	0	1	0	0	1
40							
0	0	0	0	1	0	0	1
42							
0	1	1	0	0	0	0	0
43							
0	0	0	0	1	0	0	1
44							
0	1	1	0	0	0	0	0
45							
0	1	1	0	0	0	0	0
46							
0	1	1	0	0	0	0	0
47							
0	0	0	0	1	0	0	1
49							
0	0	0	0	1	0	0	1
53							
0	1	1	0	0	0	0	0
54							
0	0	0	0	1	0	0	1
55							
0	0	0	0	1	0	0	1
57							
0	1	1	0	0	0	0	0
58							
0	1	1	0	0	0	0	0
60							
1	0	1	0	0	0	0	0
62							
0	1	1	0	0	0	0	0

Figura III.1 Matriz introducida en el programa informático TREECON para la región 26S

7						
1						
0	0	1	0	1	0	0
2						
0	0	1	0	1	0	0
9						
0	1	0	0	0	0	1
10						
0	0	1	0	1	0	0
12						
0	0	1	0	1	0	0
13						
0	1	0	0	0	0	1
14						
0	0	1	0	1	0	0
15						
0	0	1	1	0	0	1
17						
0	0	1	1	0	0	1
18						
0	0	1	0	1	0	0
20						
0	0	1	0	1	0	0
22						
0	0	1	1	0	0	1
27						
0	0	1	1	0	0	1
29						
1	0	0	0	0	0	1
40						
0	0	1	0	1	0	0
43						
0	0	1	0	1	0	0
46						
1	0	0	0	0	0	1
47						
0	0	1	0	1	0	0
49						
0	0	1	0	1	0	0
54						
0	0	1	0	1	0	0
55						
0	0	1	0	1	0	0
57						
1	0	0	0	0	0	1
58						
1	0	0	0	0	0	1
62						
1	0	0	0	0	0	1

Figura III.2 Matriz introducida en el programa informático TREECON para la región ITS

Con el fin de mejorar la separación de bandas se acotó el gradiente desnaturalizante, el gradiente menor se aumentó de 25% a 33% con el fin de que algunas bandas migren hacia la parte superior del gel, y el gradiente con mayor concentración de desnaturalizante se disminuyó de 55% a 52% con el fin de que algunas bandas migren hacia la parte inferior del gel.

Figura IV.1 DGGE paralelo. Gradiente desnaturalizante 33-52%



Figura IV.2. Comparación DGGE paralelo 25-55% y 33-52%.

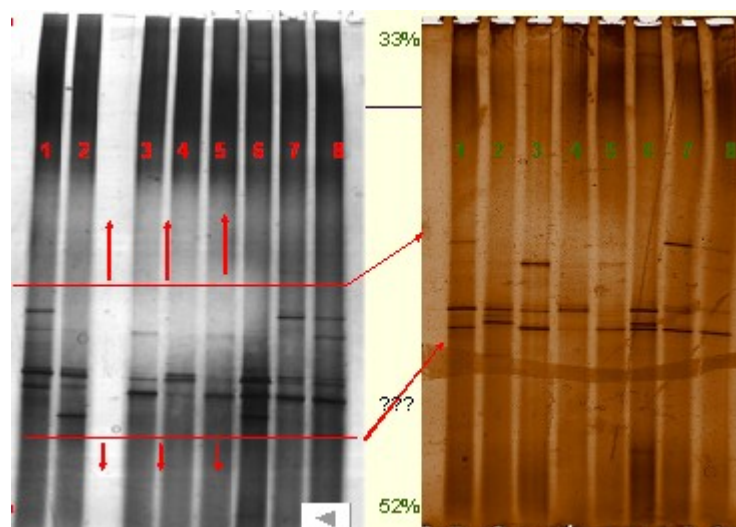
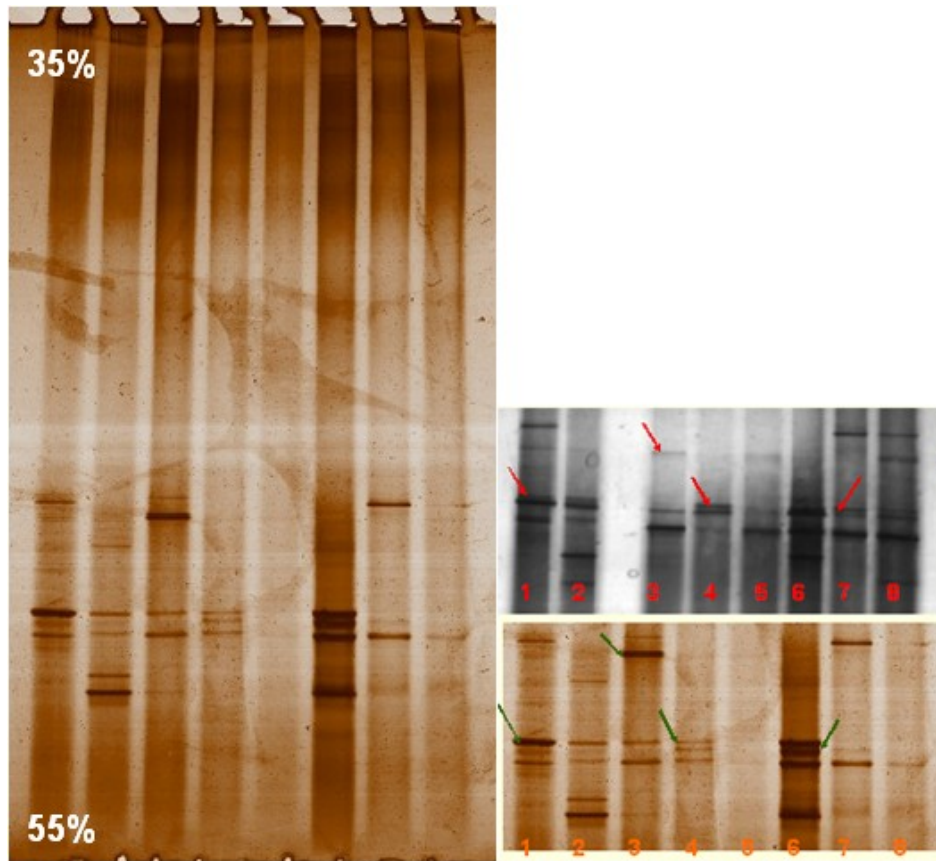


Figura IV.3 DGGE paralelo. Gradiente desnaturalizante 35-55% y comparación DGGE con gradiente desnaturalizante 25-55% y 35%-55%



Las bandas de la parte superior no han migrado de manera significativa hacia la zona superior del gel respecto al gradiente de 25-55%, sin embargo si ha habido una mejoría en cuanto a la separación de bandas. En vista de los resultados el gradiente que muestra una mejor separación de bandas es el de 35-55% (gel inferior) en relación con el gel 25-55% (gel superior), pero se decidió trabajar con un gradiente 40-55% para poder obtener una mejor separación de bandas.

Se alinearon con el programa CLUSTAL W las secuencias de las levaduras de las muestras de queso Cotija con la secuencia del GenBank que dió mayor porcentaje de identidad. En la tabla siguiente aparece el nombre de la secuencia de cada levadura (Muestra), el número de acceso a la base de datos GenBank de la secuencia de mayor identidad, el porcentaje de identidad de la comparación y el microorganismo identificado a partir de la comparación.

Tabla V. Relación de las secuencias de las levaduras con la base de datos GenBank.

Muestra	No. Acceso GenBank	Identidad %	Microorganismo
B7	EU019221	99%	<i>Kluyveromyces lactis</i>
C44	EU019221	100%	<i>Kluyveromyces lactis</i>
C57	EU019221	99%	<i>Kluyveromyces lactis</i>
C10	FJ515256	99%	<i>Candida parapsilosis</i>
B5	EU605804	99%	<i>Candida parapsilosis</i>
C9	FJ515256	99%	<i>Candida parapsilosis</i>
C15	FJ480853	99%	<i>Candida zeylanoides</i>
C17	EU327099	100%	<i>Candida zeylanoides</i>
C29	EU285537	98%	<i>Candida zeylanoides</i>

A continuación se muestran los alineamientos de las secuencias de las levaduras obtenidas con la base de datos GenBank.



Figura V.1 Secuencia B7 alineada con *K. lactis* con el número de acceso CR382124

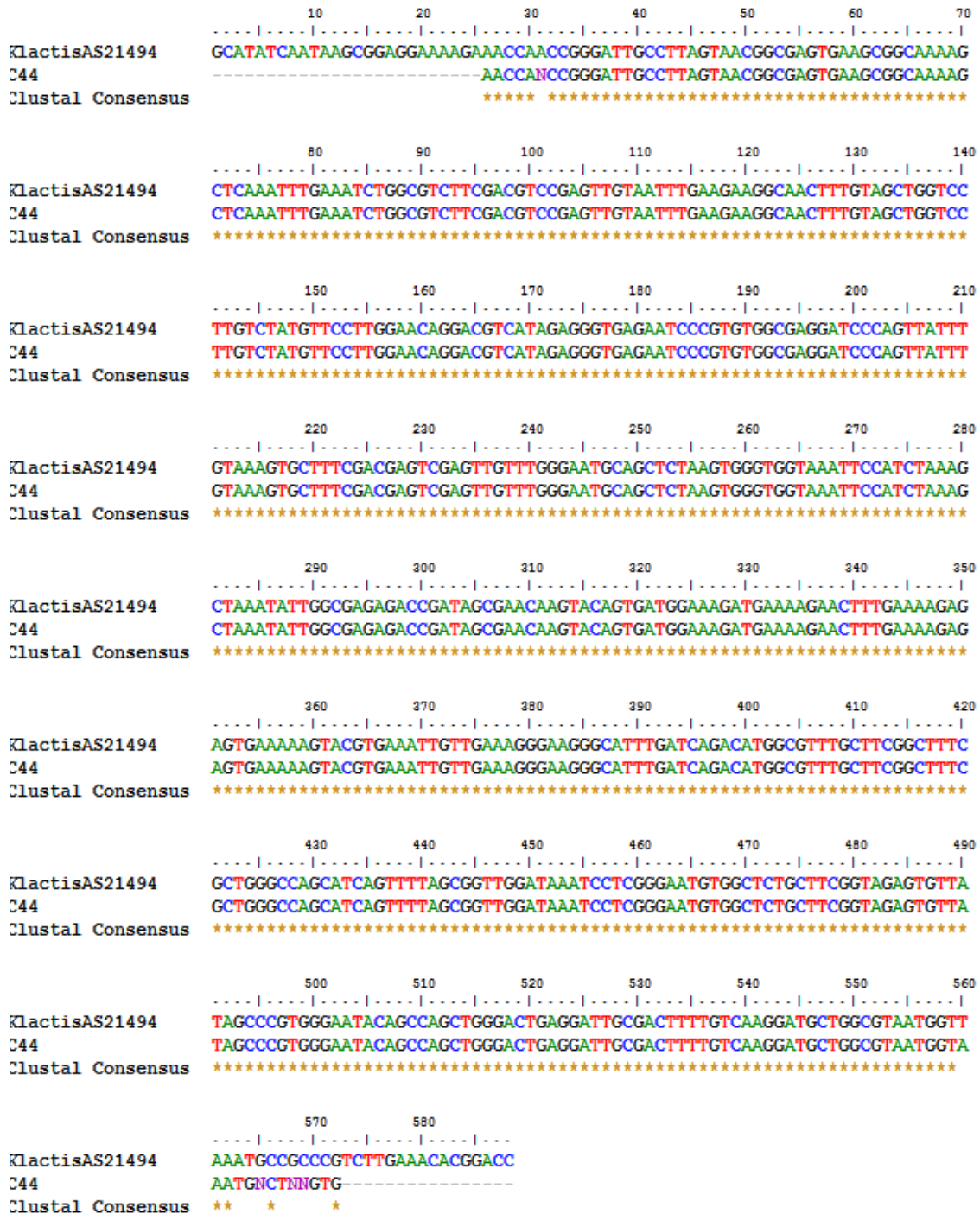


Figura V.2 Secuencia C44 alineada con *K. lactis* AS2.1494 con el número de acceso EU019221

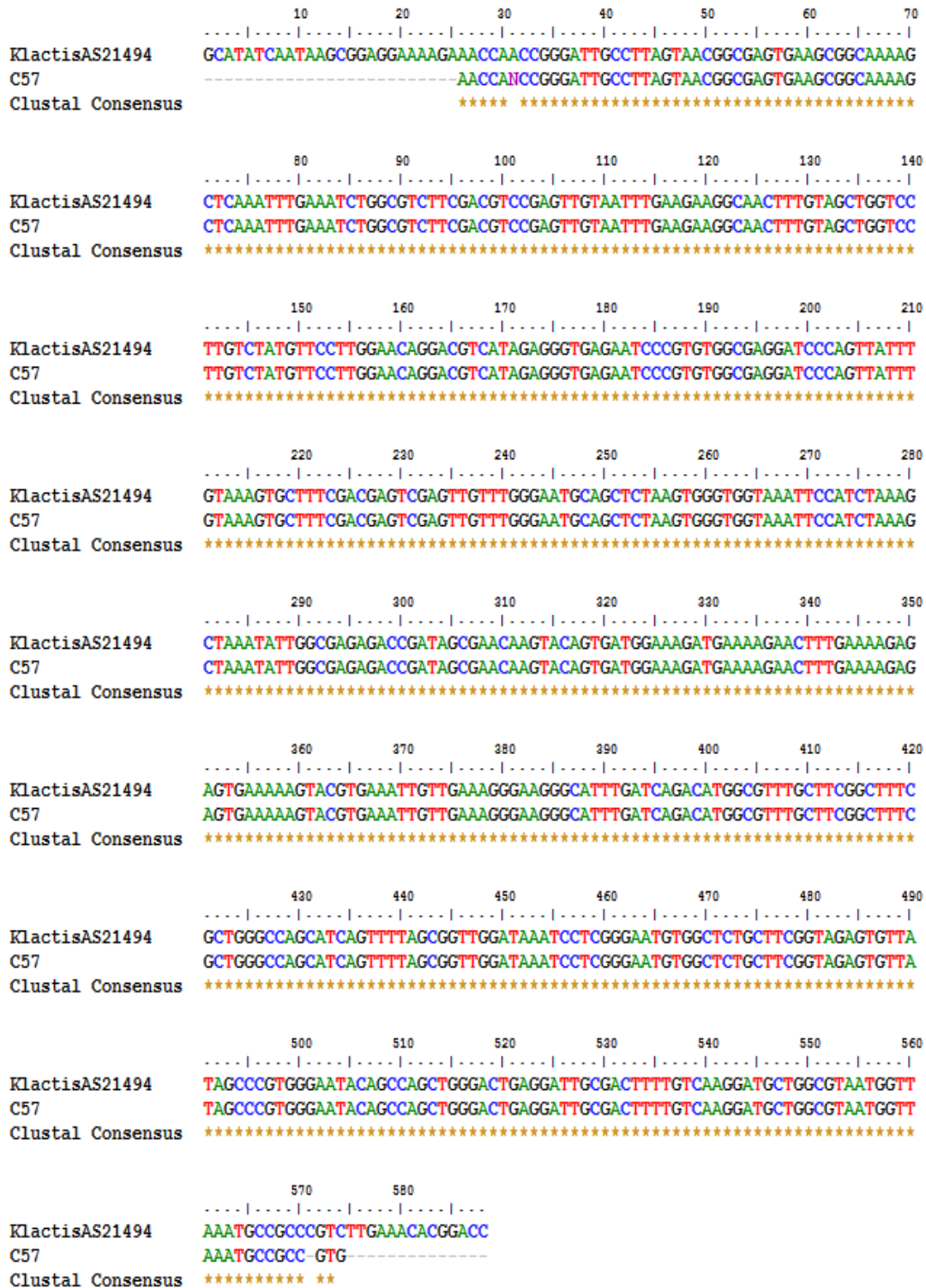


Figura V.3 Secuencia C57 alineada con *K. lactis* AS2.1494 con el número de acceso EU019221

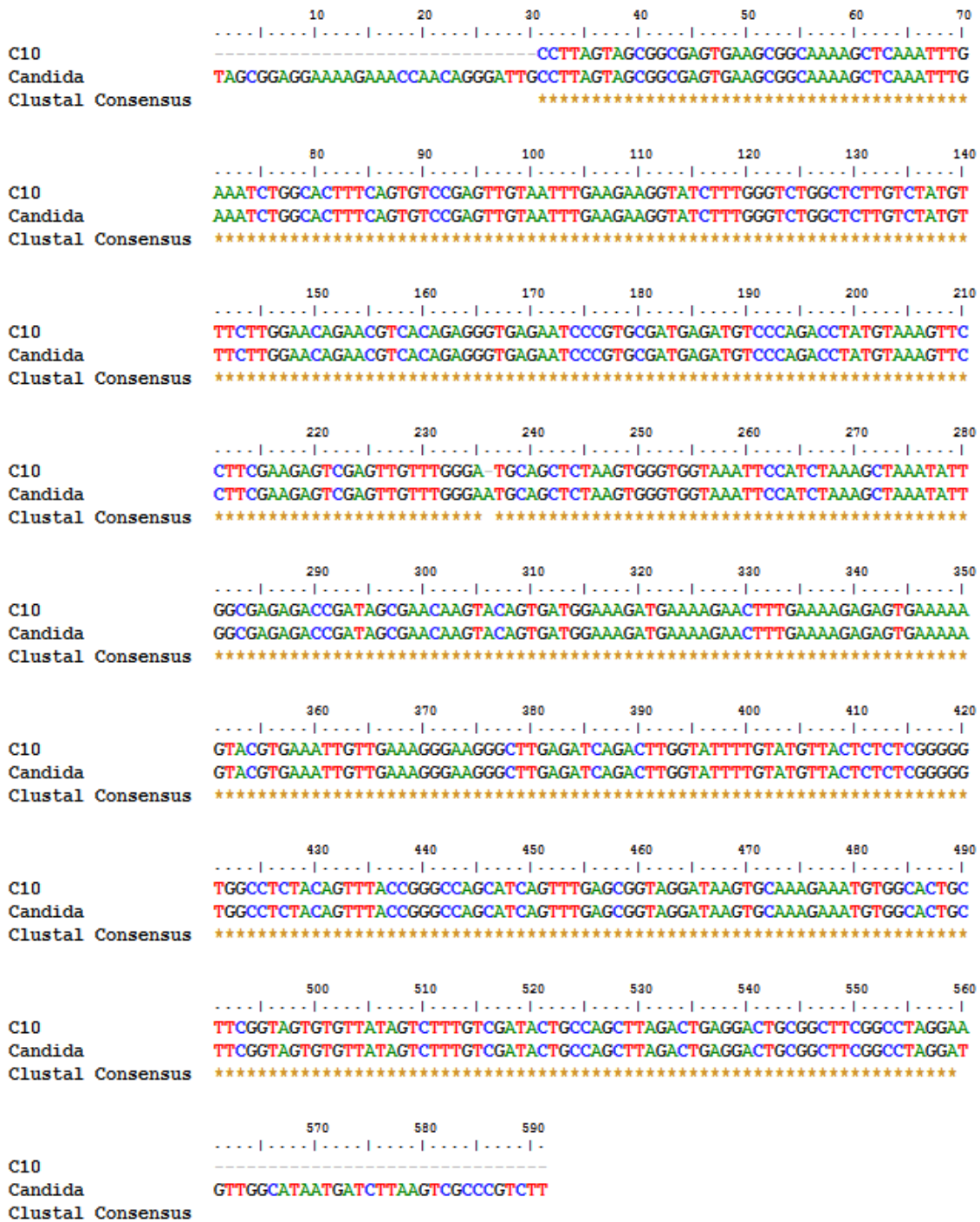


Figura V.4 Secuencia C10 alineada con *Candida parapsilosis* con el número de acceso FJ515256

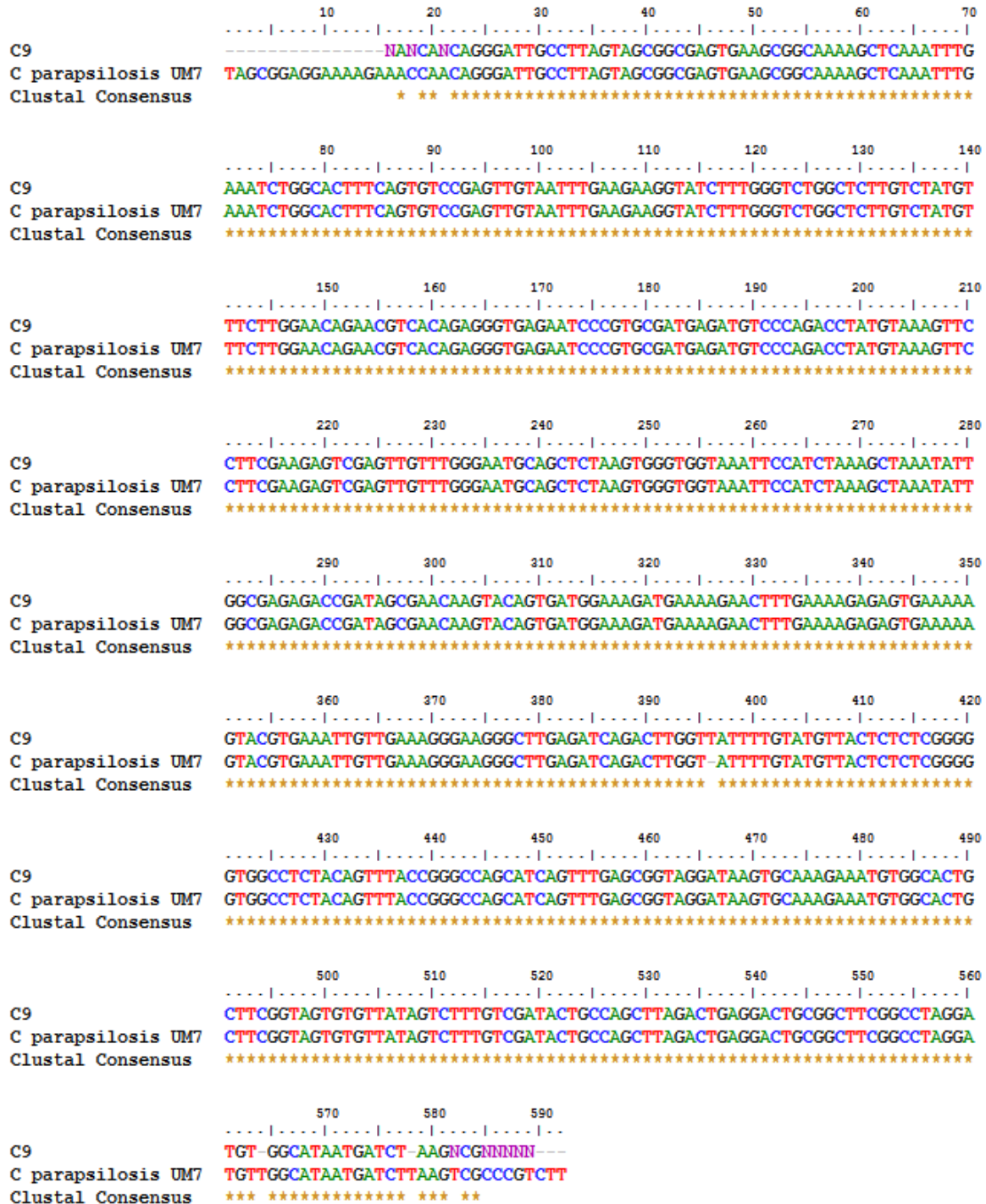


Figura V.5 Secuencia C9 alineada con *Candida parapsilosis* con el número de acceso FJ51256

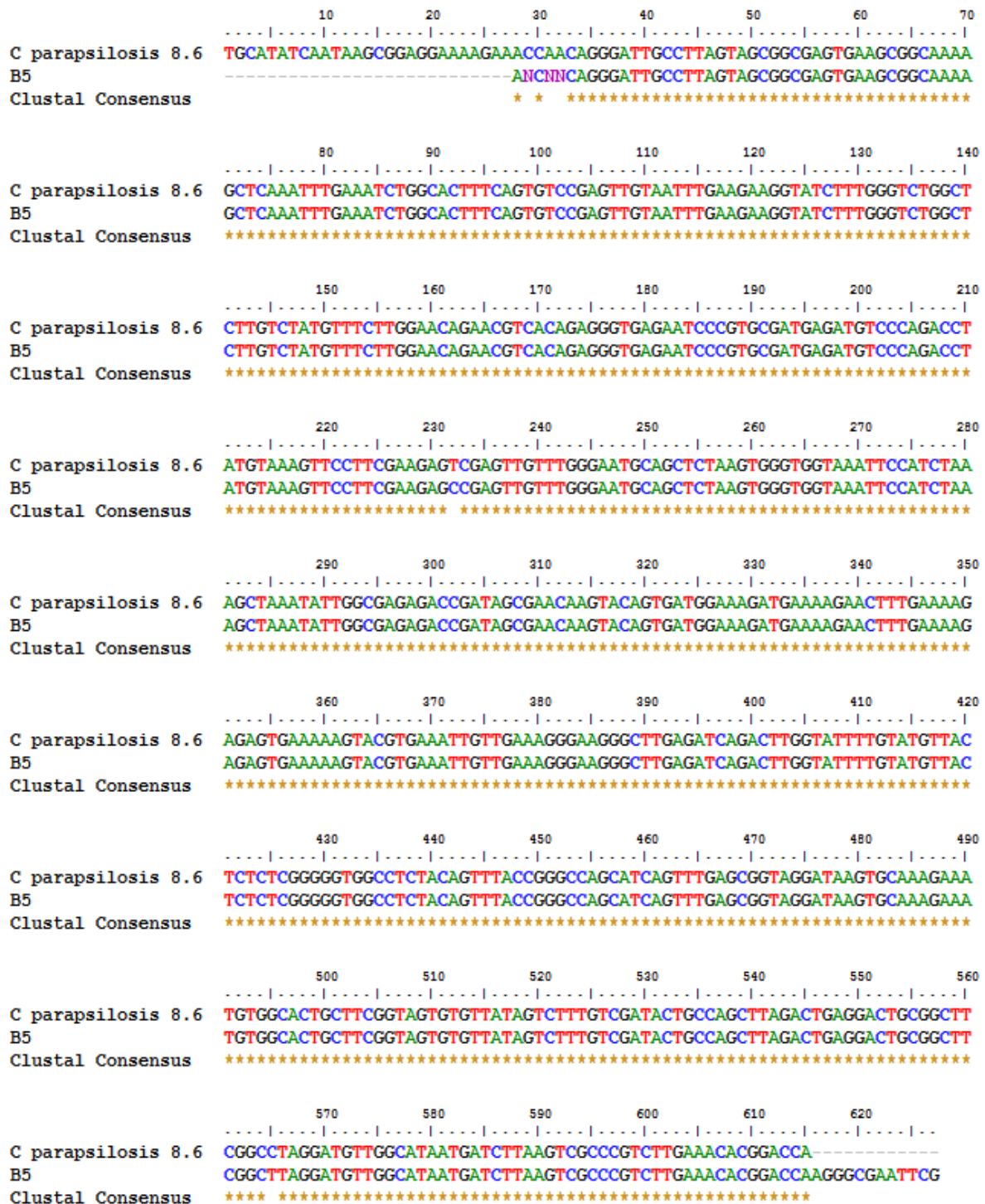


Figura V.6 Secuencia B5 alineada con *Candida parapsilosis* con el número de acceso EU605804

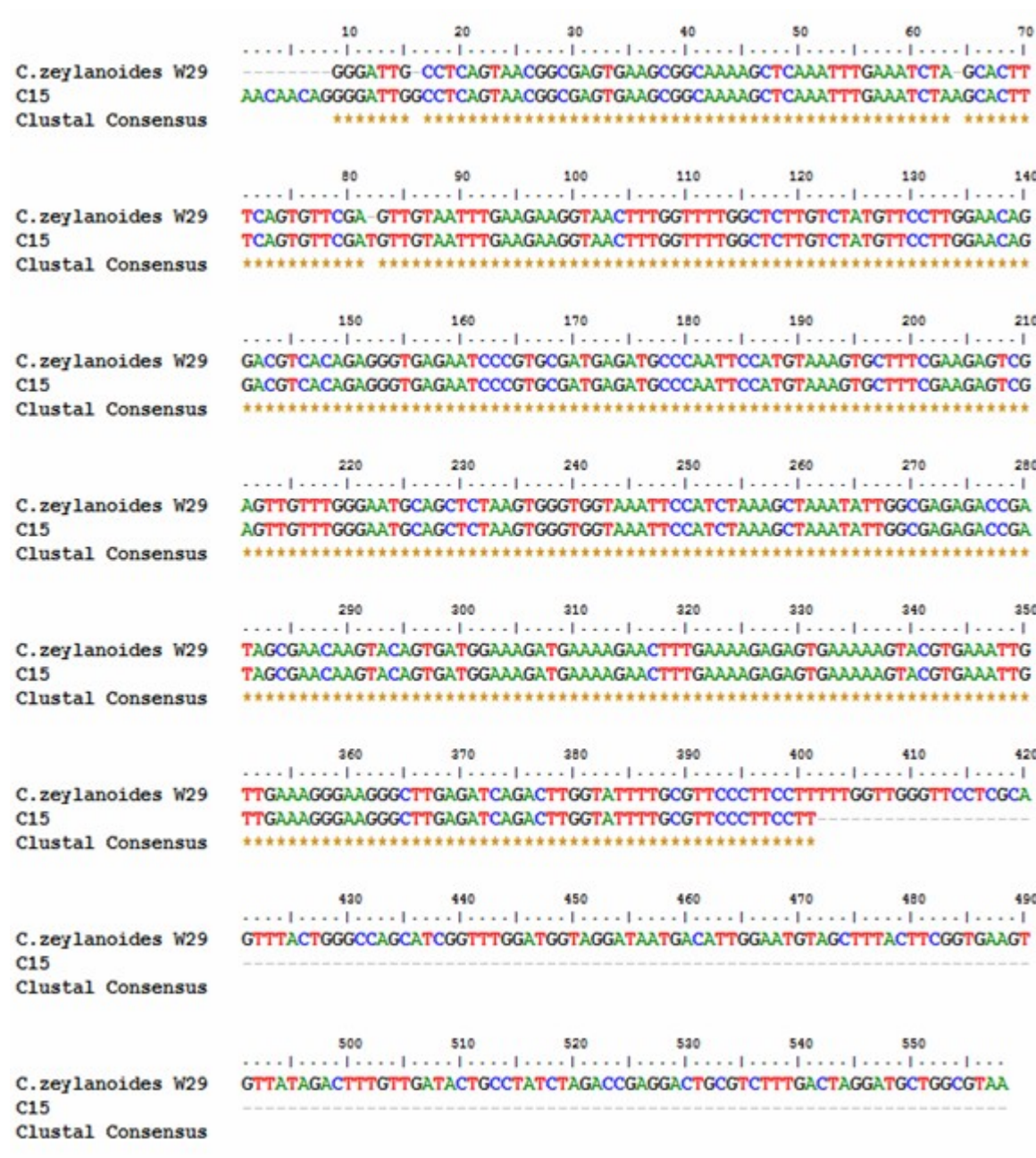


Figura V.7 Secuencia C15 alineada con *Candida zeylanoides* con el número de acceso FJ480853

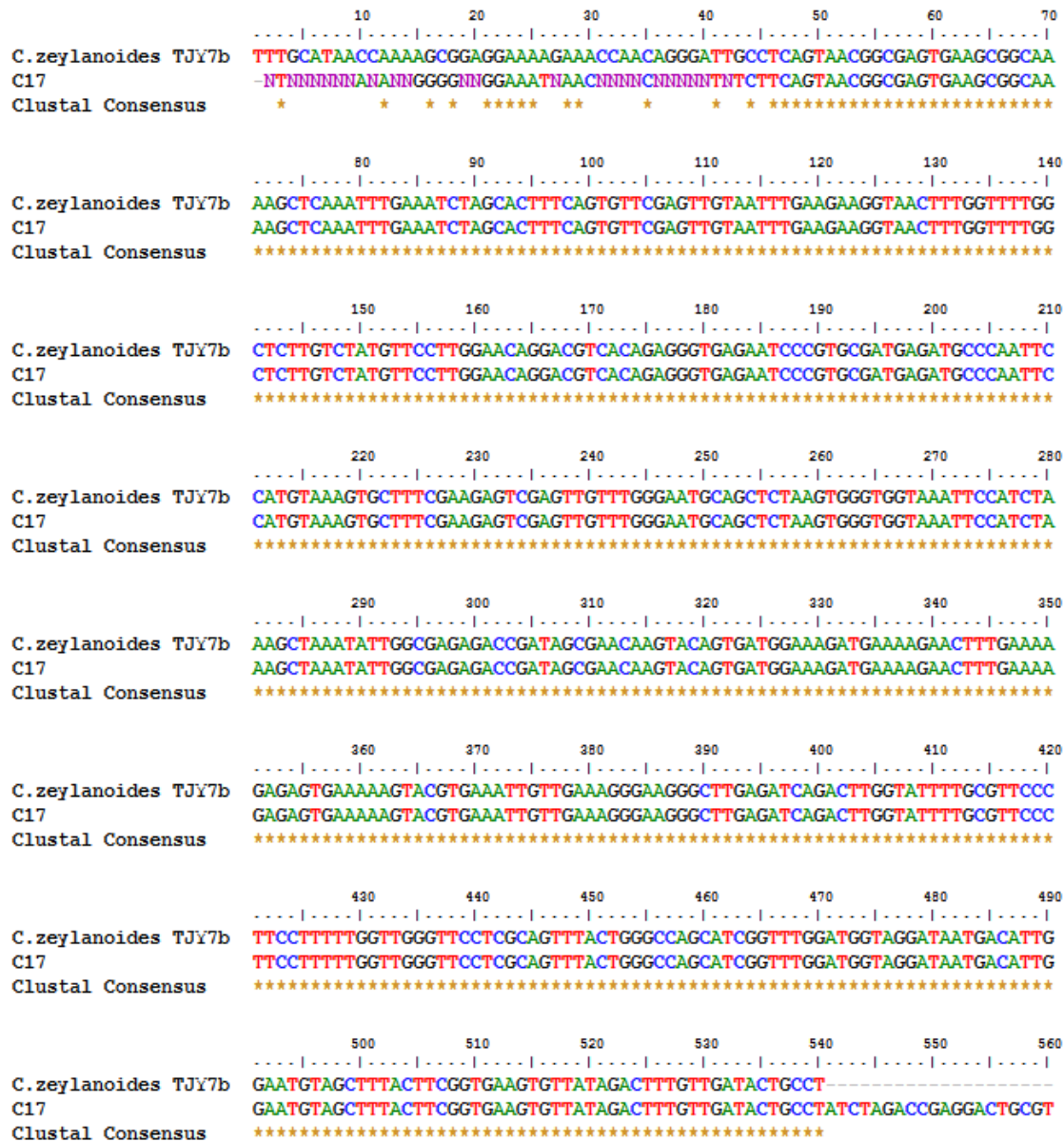


Figura V.8 Secuencia C17 alineada con *Candida zeylanoides* con el número de acceso EU327099

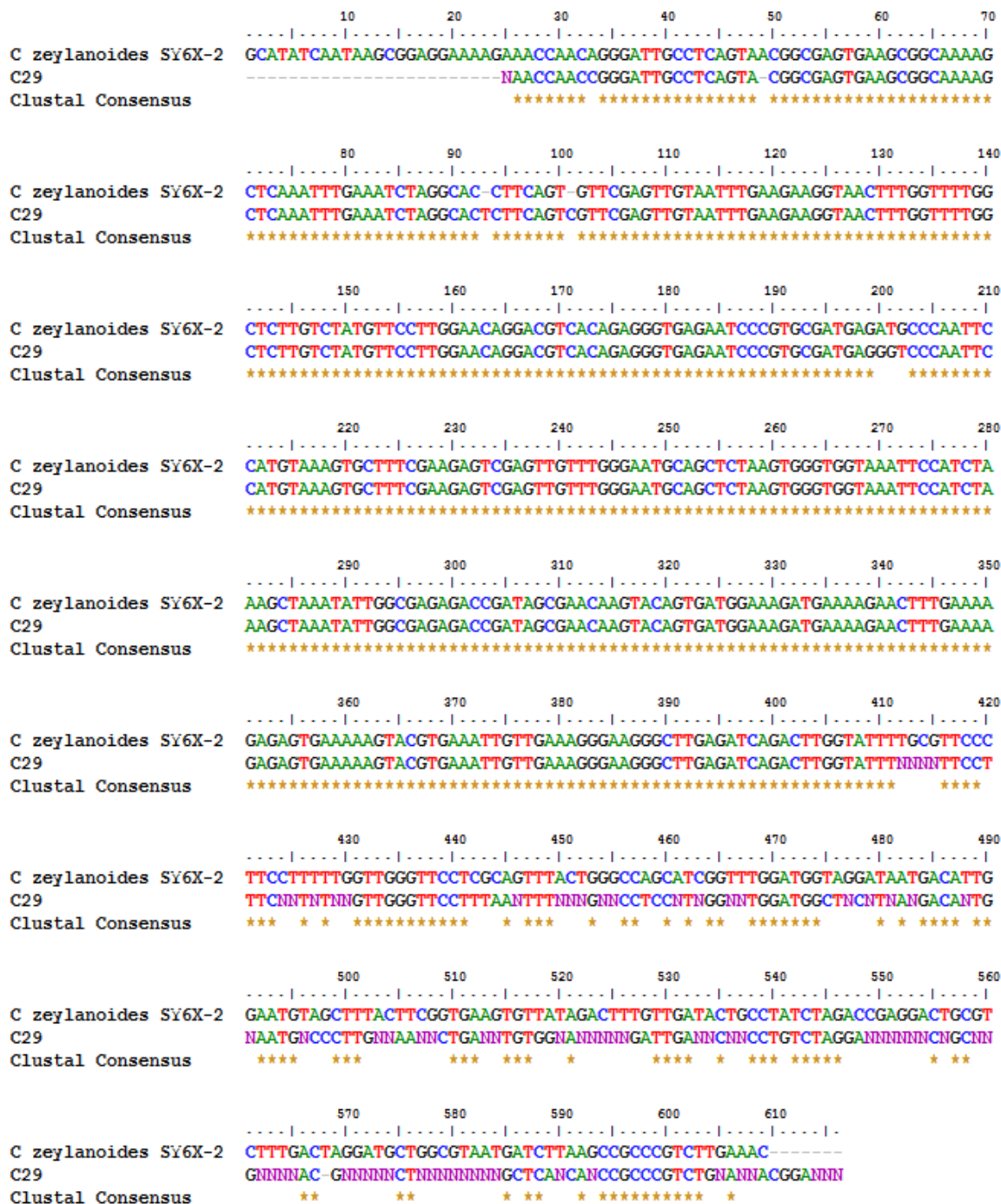
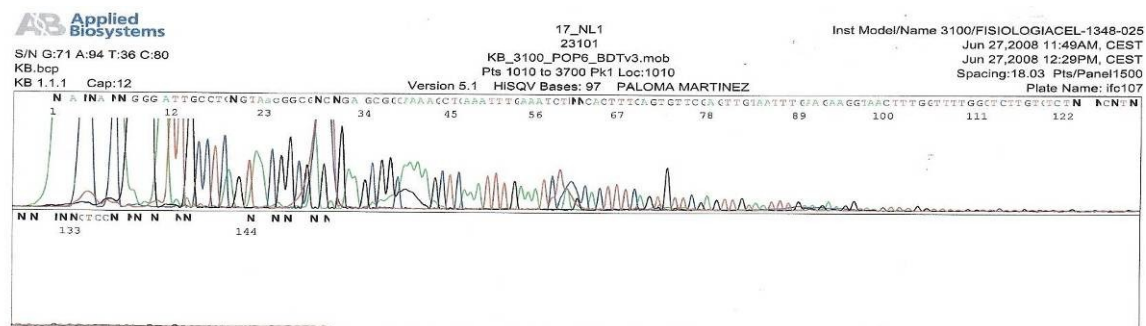


Figura V.9 Secuencia C29 alineada con Candida zeylanoides con el número de acceso EU285537



Printed on: Wed Jul 02,2008 02:28PM, CEST

Electropherogram Data Page 1 of 1

Figura VI.1: *Candida zeylanoides* TJY7b (C17). Cebador NL1 directo

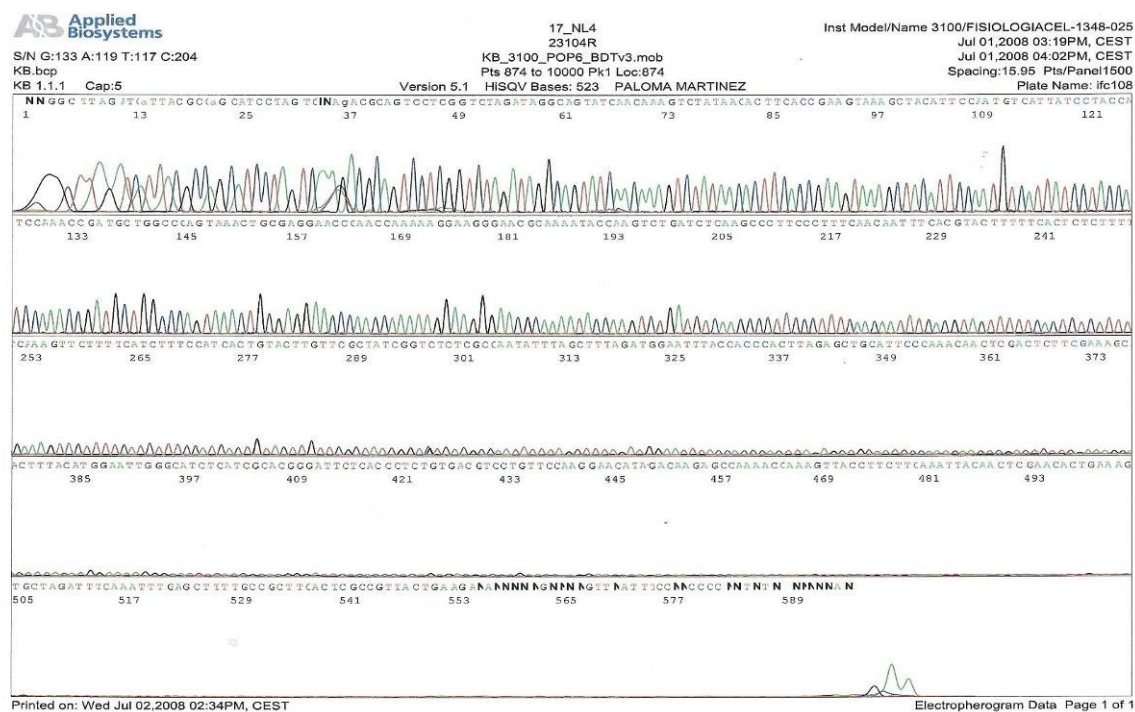
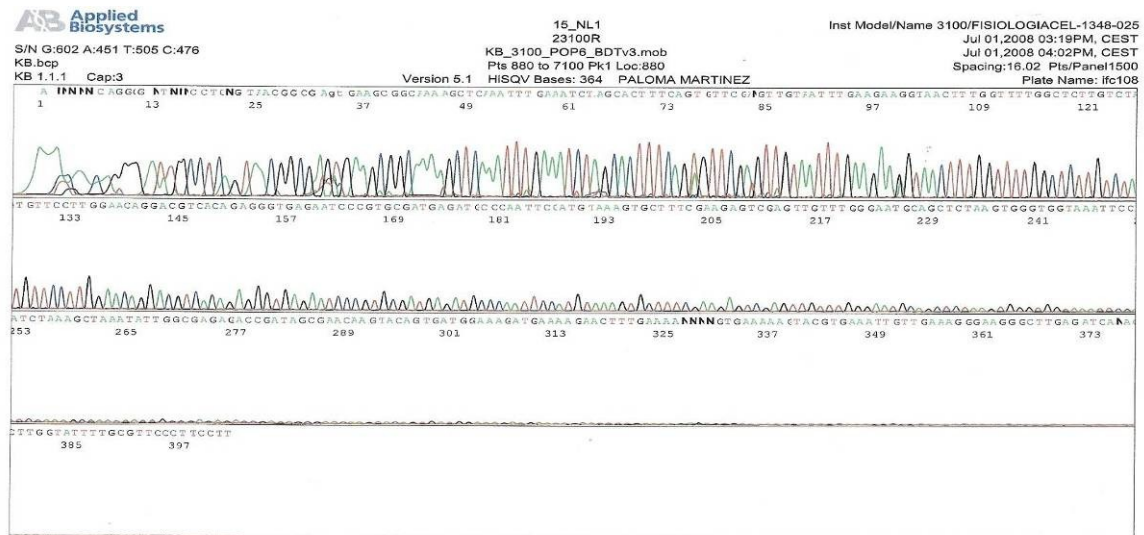


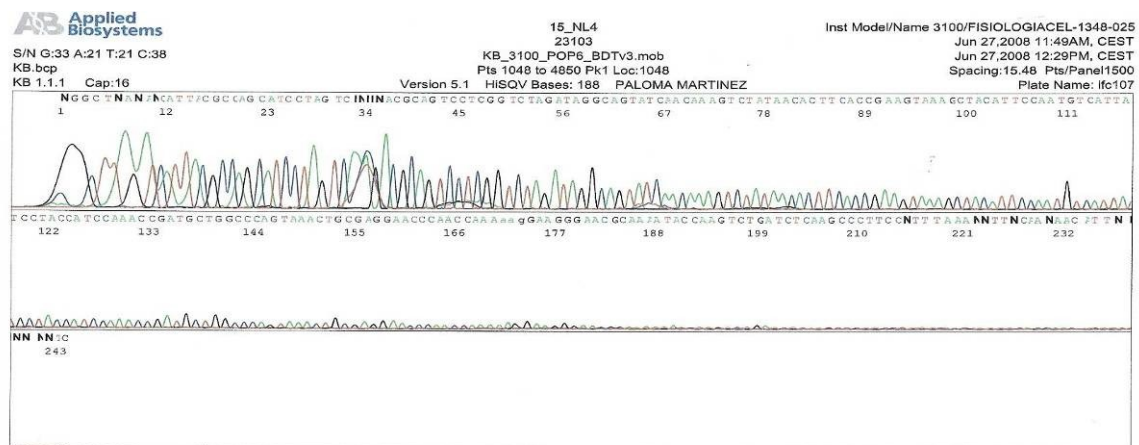
Figura VII.2: *Candida zeylanoides* TJY7b (C17). Cebador NL4 reverso.



Printed on: Wed Jul 02,2008 02:33PM, CEST

Electropherogram Data Page 1 of 1

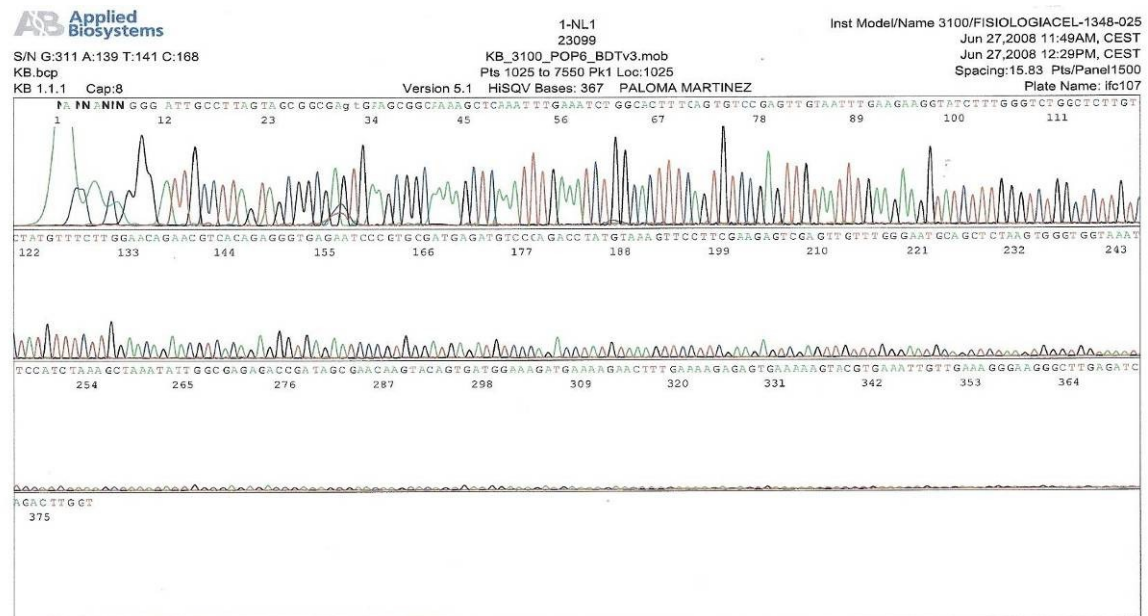
Figura VII.3: *Candida zeylanoides* 10C-1(C15). Cebador NL1 directo.



Printed on: Wed Jul 02, 2008 02:29PM, CEST

Electropherogram Data Page 1 of 1

Figura VII.4: *Candida zeylanoides* 10C-1(C15). Cebador NL4 reverso



Printed on: Mon Jun 30,2008 12:25PM, CEST

Electropherogram Data Page 1 of 1

Figura VII.5: *Candida zeylanoides* SY6X-2 (C9). Cebador NL1 directo.

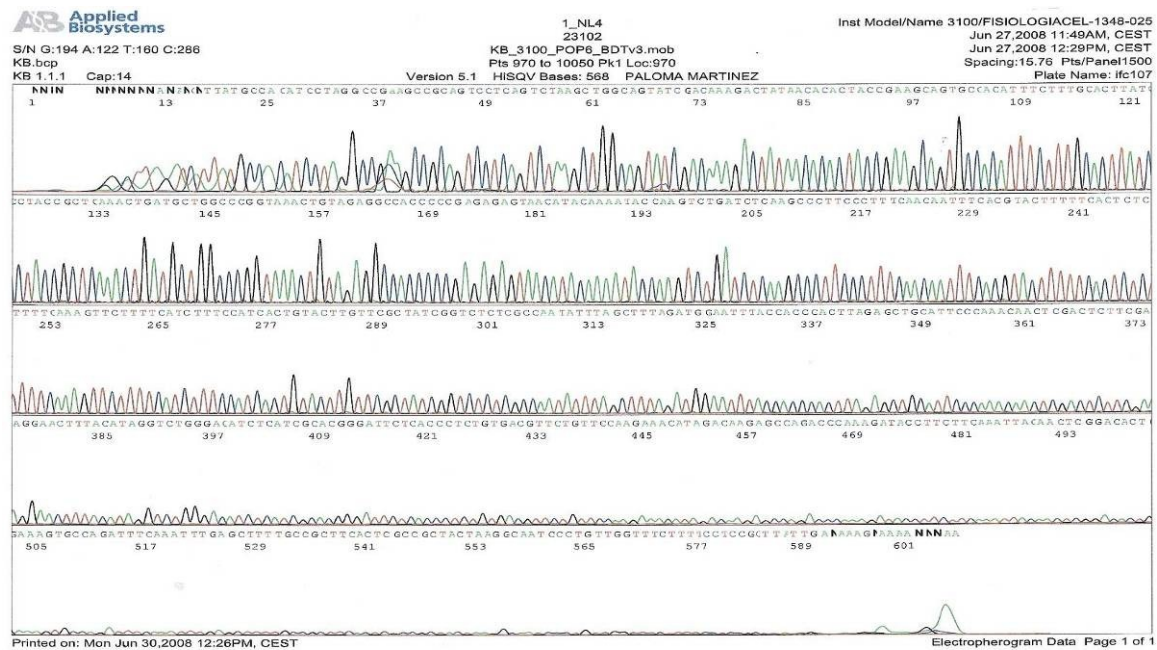
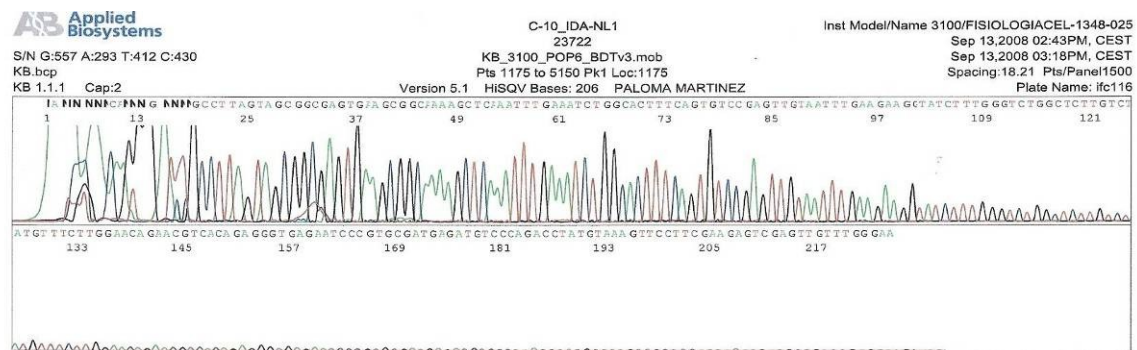


Figura VII.6: *Candida zeylanoides* SY6X-2 (C9). Cebador NL4 reverso.



Printed on: Wed Sep 17, 2008 02:48PM, CEST

Electropherogram Data Page 1 of 1

Figura VII.7: *Candida parapsilosis* UM7 (C10). Cebador NL1 directo.

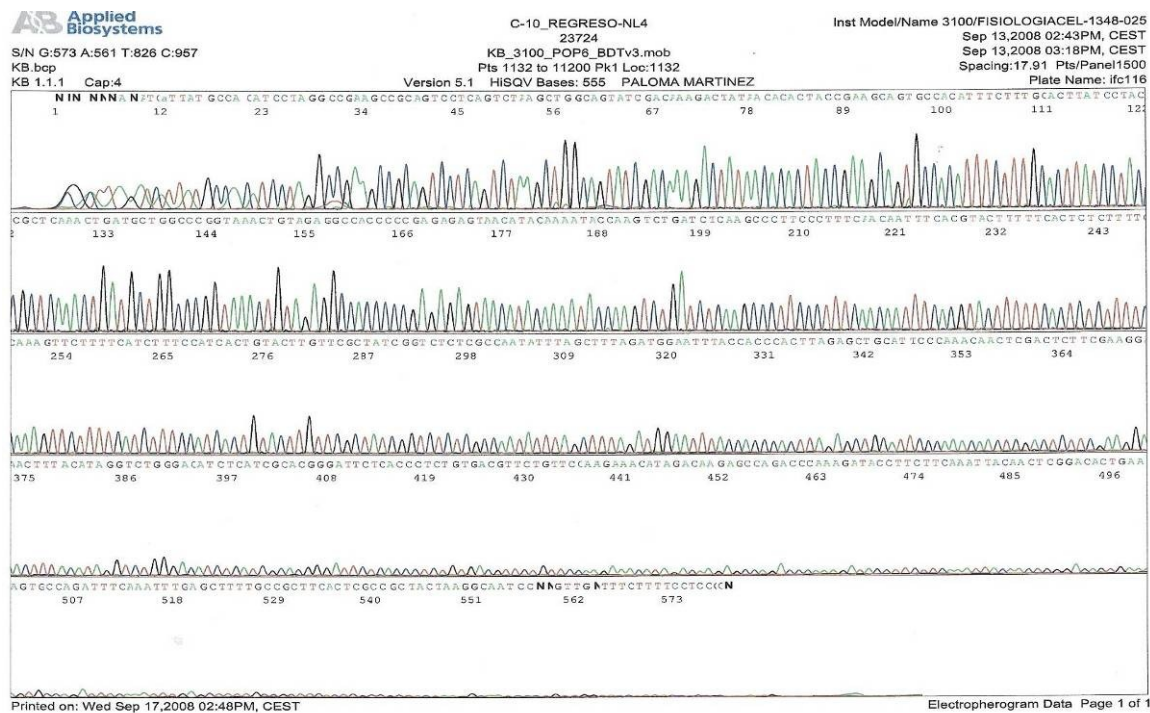


Figura VII.8: *Candida parapsilosis* UM7 (C10). Cebador NL4 reverso

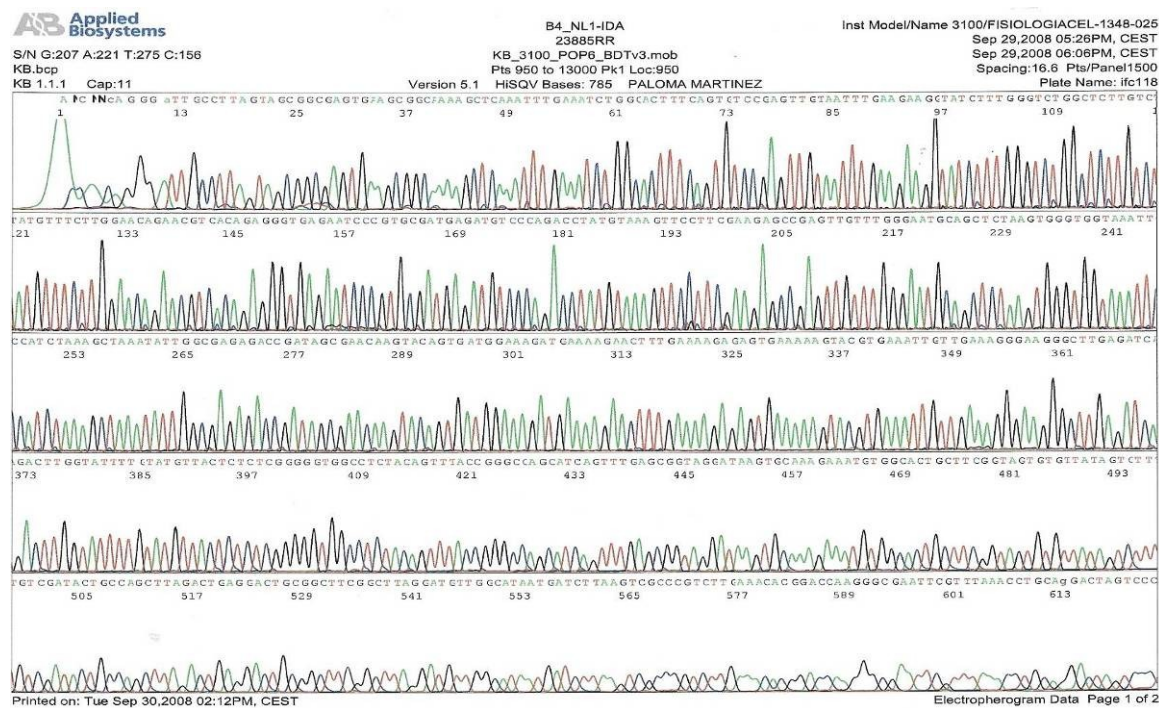


Figura VII.9: *Candida parapsilosis* 8.6 (B5). Cebador NL1 directo

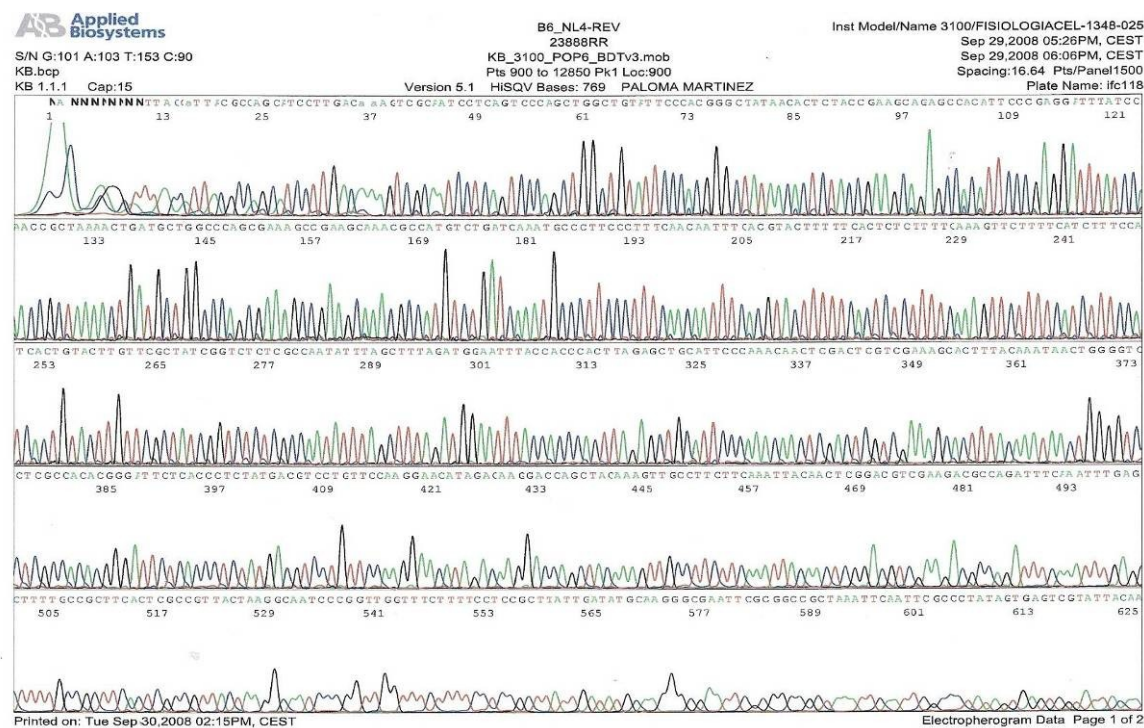


Figura VII.10: *Kluveromyces lactis* AS2.1494 (B7). Cebador NL4 reverso

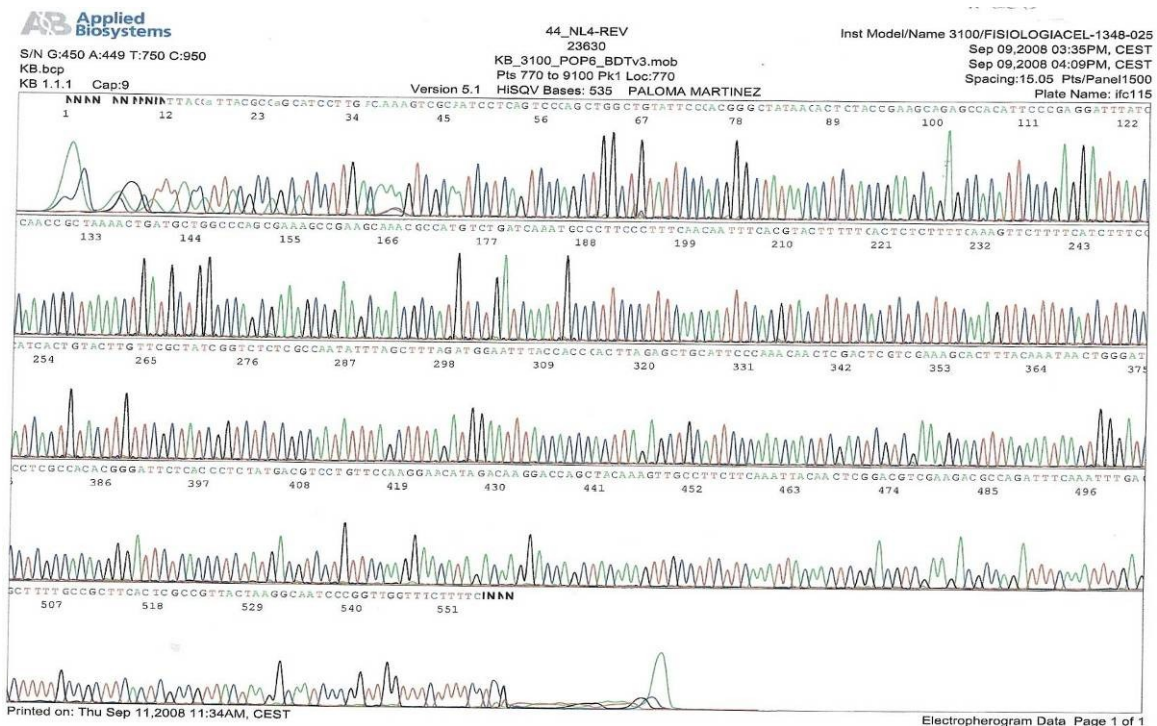


Figura VII.11: *Kluyveromyces lactis* AS2.1494 (C44). Cebador NL4 reverso

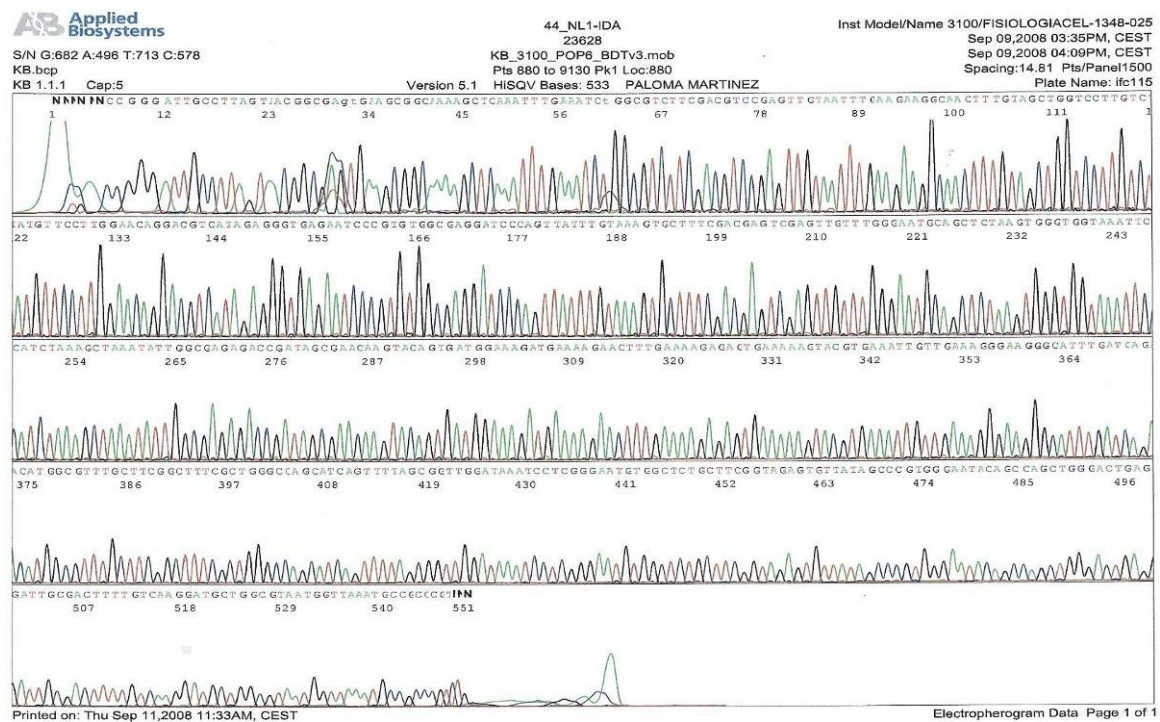


Figura VII.12: *Kluyveromyces lactis* AS2.1494 (C44). Cebador NL4 reverso

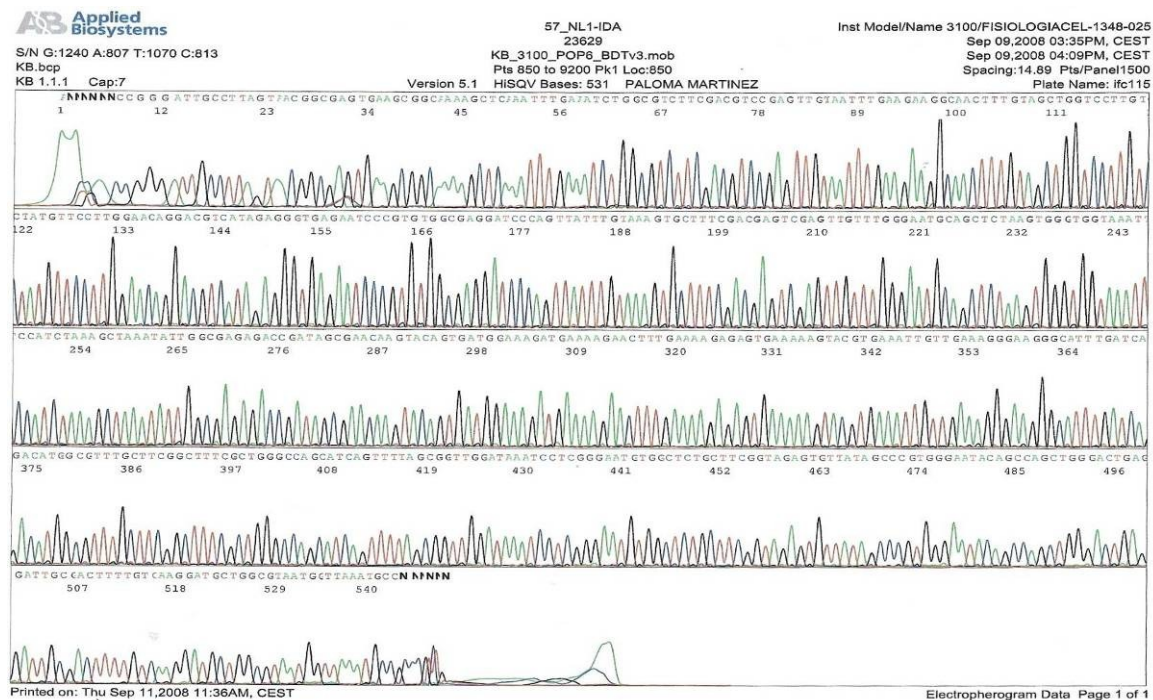


Figura VII.13: *Kluveromyces lactis* AS2.1494 (C57). Cebador NL1 directo

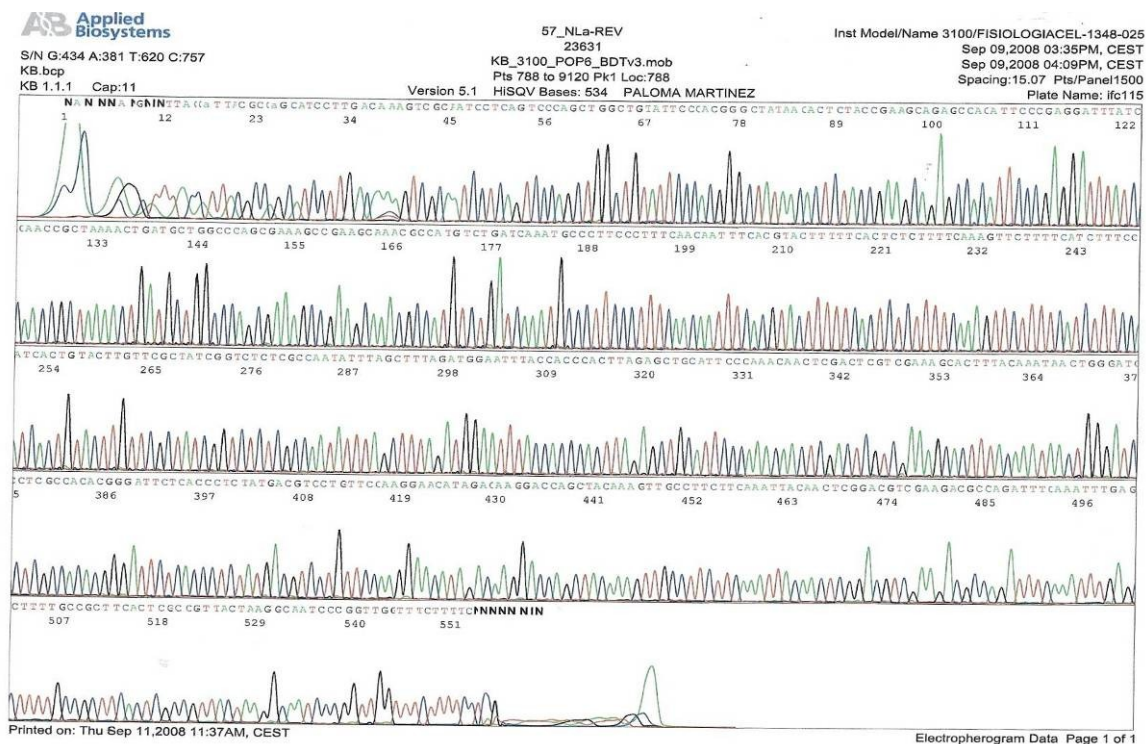


Figura VII.14: *Kluveromyces lactis* AS2.1494 (C57). Cebador NL4 reverso