

## IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS PRESENTES EN EL QUESO COTIJA ARTESANAL POR MÉTODOS MOLECULARES DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO

Paloma D. Martínez, Carolina Peña, Maricarmen Quirasco.  
Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. [quirabma@unam.mx](mailto:quirabma@unam.mx), Tel. y fax (55) 5622-5305

Palabras clave: DGGE, ARDRA y RFLP

**Introducción.** El Cotija es un queso mexicano, artesanal, elaborado con leche bronca, en la sierra entre Jalisco y Michoacán. Es un queso madurado, salado, seco y con un aroma y sabor pronunciados. En su elaboración no se utiliza algún tratamiento térmico, ni inóculos iniciadores por lo que es la microbiota nativa la responsable de sus características organolépticas. La importancia de las levaduras en el proceso de maduración se debe principalmente, a su actividad lipolítica y proteolítica. La propuesta de este trabajo fue comparar la biodiversidad de levaduras presente en muestras de queso procedentes de la región de origen por métodos moleculares: ARDRA, RFLP y PCR-DGGE [1].

**Metodología.** Se analizaron ocho muestras de queso Cotija "Región de Origen". Los medios de cultivo para aislamiento de levaduras fueron: Agar Extracto de Malta (MEA) y Agar Papa Dextrosa (PDA). Para obtener un mayor patrón discriminatorio morfocolonial se utilizó Agar Nutritivo Wallerstein Laboratory (WLN). La actividad proteolítica se verificó en medio agar leche descremada y la lipolítica en agar tributirina. A partir de ADN extraído de las levaduras aisladas, se amplificó el dominio D1/D1 del gen 26S del ADNr con los cebadores NL1 y NL4 para la técnica ARDRA; y la región ITS con los cebadores ITS1 e ITS4, para la técnica RFLP. El análisis de restricción se llevó a cabo con las enzimas HaeIII, HinfI, MboI y CfoI. Del ADN extraído directamente de las muestras de queso y de cepas aisladas, se amplificó una secuencia parcial del ADNr 26S con los cebadores NL1-clamp y LS2. Los amplicones se analizaron por DGGE. La identificación de las levaduras más representativas se realizó por secuenciación parcial del gen 26S del ADNr.

**Resultados y discusión.** Se aislaron 26 colonias de levaduras, por morfología colonial se formaron 7 grupos. Las herramientas moleculares para discriminar entre colonias, fueron ARDRA (del gen 26S ADNr) y RFLP de la región transcrita espaciadora intergénica de ADNr 5.8S (ITS). El primer método arrojó 3 grupos y el segundo 4. Para considerar a la población que no se pudo cultivar, se realizó la amplificación de un fragmento del 26S ADNr a partir de ADN extraído directamente del alimento. El análisis posterior de DGGE indicó la presencia de 8 bandas, las que se secuenciaron posteriormente. En la Fig. 1 se muestra el patrón de migración obtenido, y la identidad encontrada por comparación de las secuencias correspondientes con bases de datos.

	Identidad	Actividad proteolítica	Actividad lipolítica
B1	<i>Candida zeylanoides</i> 100%	-	+
B2	<i>Candida zeylanoides</i> 99%	-	+
B4	<i>Candida parapsilosis</i> 99%	-	+
B5	<i>Candida parapsilosis</i> 99%	No cultivado	
B7	<i>Kluyveromyces lactis</i> 99%	No cultivado	
B8	<i>Kluyveromyces lactis</i> 100%	+	-
B9	<i>Kluyveromyces lactis</i> 99%	+	-
B10	No secuenciada		
B11	No secuenciada		
B12	<i>Candida parapsilosis</i> 99%	-	+

Figura 1. Se identificaron las levaduras correspondientes a ocho bandas con diferente migración por DGGE (B1-B12). Las bandas de color verde corresponden a las levaduras obtenidas exclusivamente por el método dependiente de cultivo, las de color azul son exclusivas del método independiente de cultivo y las de color rojo fueron obtenidas por ambos métodos.

Las levaduras encontradas se han reportado en aguas marinas, productos cárnicos curados, bebidas fermentadas y en frutas. Se han reportado con actividad lipolítica y/o proteolítica, concordando con los resultados mostrados en la Fig. 1 [2].

**Conclusiones.** El DGGE es una herramienta apropiada para obtener una idea del perfil microbiano en un determinado hábitat, que complementado por análisis como el ARDRA, RFLP y morfología colonial aporta una mayor información.

**Agradecimiento.** Proyecto financiado por UNAM-DGAPA IN200705.

### Bibliografía.

- [1] Díaz, G, y Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev Latinoam Microbiol* 45:30-40  
[2] 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