



## AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS LIPOLÍTICOS DEL QUESO COTIJA

Verónica García Saturnino, Idalia Flores Argüello y Maricarmen Quirasco Baruch

L-312 Conj. E, Fac. de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México. [quirabma@servidor.unam.mx](mailto:quirabma@servidor.unam.mx), tel. y fax (55) 5622-5305.

*Palabras clave: Queso Cotija, microbiota lipolítica, ARDRA.*

**Introducción.** En la Sierra de Jalmich, México, se elabora el queso Cotija de manera artesanal desde hace más de 400 años. Éste posee características sensoriales únicas, que lo distinguen de otros quesos producidos en el país. Es un queso duro, de pasta seca y desmorable, se caracteriza por estar elaborado con leche cruda, tener un alto contenido de grasa y ser un queso maduro salado y de gusto fuerte. En su proceso de elaboración no se incluye algún proceso térmico que reduzca la microbiota presente. La lipólisis, debida a la actividad enzimática de los microorganismos presentes, aporta a la producción de compuestos de olor y sabor en el queso (1).

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar microorganismos con alta actividad lipolítica de queso Cotija auténtico, con la ayuda de técnicas de microbiología tradicional, bioquímicas y moleculares.

**Metodología.** Se analizaron 6 muestras de queso con diferentes grados de maduración. El análisis proximal, la determinación de pH, % de acidez y  $a_w$  se realizaron de acuerdo a normas mexicanas, al igual que las cuentas microbiológicas (coliformes, mesófilos aeróbios, hongos y levaduras). El aislamiento, detección de actividad y purificación de microorganismos lipolíticos se determinó en Agar Tributirina y Agar Rojo Neutro. Se utilizó el método de fenol- cloroformo- isoamílico para la extracción del ADN de los microorganismos puros y se amplificó de una región del gen 16S ó 26s rRNA por PCR. El ARDRA (2) se realizó con las endonucleasas Sau3A y HinfI. La identificación molecular fue a través de la secuenciación de la región V3 del gen ribosomal 16s para bacterias y 26s para levaduras. Se usaron pruebas API para la identificación bioquímica. La similitud de secuencias se comprobó por alineamientos con el algoritmo Clustal W 1.83.

**Resultados y discusión.** Se observó que el contenido de grasa es el componente que varía mayormente, lo que se puede atribuir a la variedad de razas de las vacas y a la alimentación de éstas, ya que lo hacen por libre pastoreo. Se observó que la acidez aumenta en quesos con mayor tiempo de maduración, y por lo tanto los valores de pH disminuyen. El  $a_w$  tiene una relación inversa a la concentración de NaCl y el tiempo de maduración de cada pieza de queso.

Dos muestras se descartaron por mala calidad microbiológica ya que presentaron una cuenta alta de coliformes. De las cuatro muestras restantes, sólo de tres se aislaron microorganismos lipolíticos ya que en el otro no hubo crecimiento en los medios selectivos, probablemente debido a su bajo valor de  $a_w$  (0.798). No se obtuvo crecimiento de mohos en ninguna de las muestras.

Se tomaron trece de las colonias lipolíticas que presentaron mayor actividad, dos eran levaduras, el resto bacterias. Se observó actividad lipolítica aún en incubación a 4°C.

El análisis de restricción del producto de PCR (ARDRA) permitió descartar microorganismos idénticos, quedando seis diferentes al final, cuyos amplicones se secuenciaron.

*Cuadro 1. Microorganismos con mayor actividad lipolítica .*

Col	Morfología	Prueba catalasa	Halo de actividad	Microorganismo
5	Bacilos Gram +	+	1.2 mm	<i>Bacillus pumilus</i>
6	Levadura	+	3.5 mm	<i>Yarrowia lipolitica</i>
7	Cocos Gram +	+	1.0 mm	<i>Staphylococcus xylosus</i>
8	Cocos Gram +	+	3.0 mm	<i>Staphylococcus psifermentans</i>
11	Cocos Gram +	+	1.2 mm	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
12	Levadura	+	1.0 mm	<i>Candida zeylanoides</i>

No se aisló ninguna bacteria láctica que presentara actividad lipolítica. Las pruebas bioquímicas arrojaron resultados similares a la secuenciación para las cuatro bacterias, aunque el método molecular resultó ser el más sensible, ya que se pudo diferenciar entre especies de *Staphylococcus* muy cercanas filogenéticamente. Los seis microorganismos se han reportado presentes en alimentos de fermentación espontánea, algunos en quesos madurados y otros como parte de la microbiota que proviene de animales.

**Conclusiones.** La microbiota identificada es halotolerante y acidófila, lo que corresponde con las características fisicoquímicas del producto. La población de levaduras, a pesar de estar presente en menor cantidad con respecto a las bacterias, posee una actividad lipolítica mayor. *Staphylococcus psifermentans* y *Yarrowia lipolitica* presentaron la mayor actividad lipolítica, ésta última es considerada microorganismo GRAS. Los datos obtenidos aportarán información para la obtención de la denominación de origen del producto.

**Agradecimientos.** Proyecto financiado por DGAPA-PAPIIT IN200705: Caracterización de la microbiota presente en quesos tradicionales mexicanos.

### **Bibliografía.**

- Marilley L, Casey M.G. (2003). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. Journal of Food Microbiol.* Vol XX p 1-17.
- Díaz G, Wachter C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* Vol.45 No.1-2. pp30-4.