



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
DEPARTAMENTO DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD
Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

**Análisis de las comunidades microbianas autóctonas
durante la maduración de quesos artesanales de dos
regiones del Sur del Ecuador**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE MAGISTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

AUTORA: DRA. ROSA CECILIA PALACIOS OCHOA

DIRECTORA: PhD. SONIA ELIZABETH ZAPATA MENA

CUENCA-ECUADOR

2016

DEDICATORIA

A mis hijos Jorge y Nicolás

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes personas e instituciones:

Universidad del Azuay por el auspicio y oportunidad otorgados para cursar esta maestría

Universidad San Francisco de Quito por el auspicio y colaboración brindada para la realización de esta investigación.

Departamento de los Laboratorios de Química de la Universidad del Azuay de manera especial a la Ing. Ximena Orellana por las facilidades prestadas para la realización de pruebas físicas.

A la MSc. Diana González por su aporte en la parte tecnológica de elaboración de los quesos conjuntamente con los técnicos de FEEP.

Personal Técnico del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad San Francisco de Quito por el apoyo en realización de los análisis moleculares, en especial a la MSc. Lorena Castañeda

Al personal técnico del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cuenca en la persona de la Blga. Jazmín Salazar, por el apoyo en la extracción de ADN de las muestras y Ph D. Eduardo Chica por su valiosa orientación.

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis, Ph D. Sonia Zapata Mena, por su increíble calidad humana, el apoyo brindado para la realización de este trabajo y su valioso aporte de conocimientos y experiencia.

A mis amigos y compañeros por su valiosa colaboración en distintas áreas de este trabajo: Ph D. Francisco Salgado, Ph D. Antonio Vallecillo, Ph D Ma. Elena Cazar, MSc. Juan Maldonado.

Cecilia Palacios

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1.1 Origen de las muestras	14
1.2 Elaboración de queso y muestreo	15
1.2.1 Tecnología de producción de los quesos semimaduros.....	15
1.2.2 Muestreo	16
1.3 Protocolo experimental	16
1.3.1 Determinación de pH	16
1.3.2 Determinación de Coliformes y Escherichia coli.....	16
1.3.3 Caracterización genotípica.....	17
CAPÍTULO 2	19
RESULTADOS.....	19
2.1 Evaluación de la medición del pH durante la maduración.....	19
2.2 Calidad y seguridad microbiológica de los quesos.....	19
2.3 Caracterización molecular, diversidad y dinámica microbiana.....	20
2.3.1 Descripción taxonómica.....	21
2.3.3 Diversidad beta	26
2.3.4 Análisis de conglomerados (CLUSTER).....	28
CAPÍTULO 3	29
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Principales vías metabólicas que conducen a la formación de aromas. Marilley, M.G. Casey / International Journal of Food Microbiology 90 (2004) 139–159	5
Fig. 2. Diagrama de flujo de la producción de los quesos en las dos regiones.....	15
Fig. 3. Productos de la extracción de ADN	17
Fig. 4. Productos de la primera amplificación del gen 16S.....	18
Fig. 5. Diferencia de variación del pH en quesos de Jima y Lactahuayco	
Fig. 6. Total de taxones y etiquetas determinados por secuenciamiento de última generación. En las cuatro muestras analizadas: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco.....	21
Fig. 7. Abundancia relativa de Phylum en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco	21
Fig. 8. Abundancia relativa de los principales órdenes bacterianos presentes en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco.....	22
Fig. 9. Abundancia relativa de las principales familias bacterianas presentes en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco.....	22
Fig. 10. Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos presentes en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco	23
Fig. 11. Evaluación de la diversidad alfa: Curva de acumulación de especies según el estimador Chao 1 para las secuencias correspondientes a las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco	24
Fig. 12. Evaluación de la diversidad bacteriana mediante el índice de equidad de Shannon de las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco	25
Fig. 13. Curva rango – abundancia de especies según el modelo paramétrico de vara quebrada correspondiente a las especies detectadas mediante el secuenciamiento de última generación en las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco	26
Fig. 14. Matriz de correlación según los índices, Weight UniFrac, Unweighted UniFrac y Bray Curtis, cuyos valores se encuentran en ese orden en la figura, para evaluar la diversidad beta en las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco.....	27

Fig. 15. Escalado multidimensional practicado sobre las comunidades microbianas de las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco	28
Fig. 16. Dendrograma de similitud de los géneros bacterianos presentes en las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de la región de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de la región de Lactahuayco	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de sabor de algunas clases de quesos. (Smith et al., 2005)	6
Tabla 2. Variación de los recuentos de Coliformes y E. coli durante los 60 días de maduración de los quesos	20
Tabla 3. Resumen de ANOVA de los valores de pH, Recuento de Coliformes y E coli de las muestras de queso procedentes de las regiones de Jima y LLactahuayco	20
Tabla 4. Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos en las muestras de Jima y Lactahuayco a 30 y 60 días de maduración.....	23
Tabla 5. Abundancia relativa de las especies bacterianas detectadas en las muestras de Jima y Lactahuayco a 30 y 60 días de maduración.....	24
Tabla 6. Índices de diversidad en las muestras de las dos regiones en los dos tiempos de maduración.....	25
Tabla 7. Géneros bacterianos identificados después de la secuenciación de la región V4 en las muestras de los quesos de Jima y Lactahuayco durante la maduración.....	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Etapas del proceso de elaboración de los quesos	59
Anexo 2. Técnica para extracción de DNA mini kit Thermo Fisher scientific	61
Anexo 3. Placas Compact Dry del recuento de Coliformes y E. coli	62
Anexo 4. Sitios de procesamiento de los quesos	63

ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS AUTÓCTONAS DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS ARTESANALES DE DOS REGIONES DEL SUR DEL ECUADOR

RESUMEN

El análisis de las comunidades microbianas involucradas en la maduración de quesos elaborados artesanalmente en las regiones de Jima y Lactahuayco mediante el uso de secuenciación de última generación del gen 16S muestra que *Lactococcus* y *Streptococcus* son los géneros dominantes durante el proceso de fermentación y que la menor proporción de su microbiota está integrada principalmente por los géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Serratia* y *Meiothermus* y las especies: *Lactobacillus brevis*, *L. zaeae*, *L. paralimentarius*, *Acinetobacter johsonni*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

Revela que la riqueza específica bacteriana es diferente en los quesos de cada región y en cada tiempo de maduración y que las muestras de Lactahuayco son más homogéneas en composición y abundancia, también demuestra la especificidad frente al área de producción.

En base a los resultados obtenidos, se puede deducir que diferentes factores tales como las prácticas de elaboración, condiciones de higiene y ambientales, influyen en la dinámica y diversidad de los grupos bacterianos desarrollados en el queso y probablemente en sus características particulares.

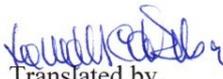
Palabras Clave: 16S, diversidad microbiana, filotipaje, bacterias fermentadoras

ABSTRACT

The analysis of the microbial communities involved in the maturation of artisanal cheese in the regions of Jima and Lactahuayco was carried out by using the 16S gene next-generation sequencing methodology. This study showed that *Lactococcus* and *Streptococcus* are the dominant genera during the fermentation process, and that the lowest proportion of its microbiota consists mainly of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Serratia* and *Meiothermus* genus, and of *Lactobacillus brevis*, *L. zaeae*, *L. paralimentarius*, *Acinetobacter johsonni*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* species. It determines that the specific bacterial richness is different in the cheeses of each region and in each time of maturation; and that the samples of Lactahuayco are more homogeneous in composition and abundance. It also demonstrates the specificity in relation to the production area.

Based on the results obtained, it can be inferred that different factors, such as production practices as well as hygiene and environmental conditions, influence the dynamics and diversity of the bacterial groups developed in cheese, and probably in their particular characteristics.




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Rosa Cecilia Palacios Ochoa

Trabajo de graduación

Ph. D Sonia Zapata

Diciembre 2016

ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS AUTÓCTONAS DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS ARTESANALES DE DOS REGIONES DEL SUR DEL ECUADOR

INTRODUCCIÓN

Los quesos fermentados producidos artesanalmente poseen características peculiares, resultado de la microbiota nativa, cuyo estudio es de gran importancia para entender la función que cumplen los microorganismos en el proceso tecnológico, (Neviani, 2006,2009; Marino et al., 2003).

En algunos países con tradición en la elaboración de quesos fermentados naturalmente, se han realizado investigaciones importantes orientadas a la salvaguardia y valorización de la microbiota láctica autóctona presente en los productos lácteos típicos. (MiPAF, 2006). Los primeros estudios se basaron en los aspectos fenotípicos, mientras que en la actualidad la utilización de técnicas moleculares con un enfoque ecológico ha permitido identificar la complejidad de la microbiota implicada en las fermentaciones naturales. (Díaz & Wachter, 2003; Cocolin et al., 2013)

En las últimas décadas se han abordado aspectos como la biodiversidad, estructura y dinámica de las poblaciones microbianas de quesos tradicionales como es el caso del queso Oscypek un queso PDO (protected designation of origin) escaldado y ahumado originario de Tatra región montañosa de Polonia. (Alegría et al. 2012). De igual manera se ha caracterizado la microbiota del queso Herve queso de origen belga, utilizando análisis metagenómico (Dalcenserie et al. 2014), y del Karakacanski skakutanac un queso fresco artesanal de leche de oveja producido en la región oriental de Croacia (Pogacic et al., 2010). Existen varios trabajos sobre el aislamiento e identificación de microorganismos implicados en la fermentación de algunos quesos, como el queso de una granja danesa (Gori et al. 2012), y el queso feta tanto fresco como madurado de tres regiones montañosas de Grecia (Bozoudi et al., 2016).

En cuanto a las investigaciones relacionadas con la dinámica de las poblaciones microbianas durante la elaboración y maduración de los alimentos, se ha estudiado algunos quesos como el queso español Cabrales, queso de pasta azul (Flórez & Mayo, 2006), y los reconocidos quesos italianos como el Grana Padano producido con leche cruda y cultivos naturales no

definidos (Pogacic et al., 2013), Montasio, Pecorino, Parmigiano Reggiano, que ostentan la denominación DOP (Denominación de Origen Protegido), entre otros (Carraro, 2010; Mormile, 2011; Neviani et al., 2013).

En el continente americano en el estado de Tabasco en México, se ha trabajado sobre el aislamiento, identificación y caracterización bioquímica y molecular de las bacterias ácido lácticas (BAL) involucradas en la elaboración de queso crema tropical (Ramos et al., 2009) y sobre la microbiota nativa mediante caracterización fenotípica del queso Oxaca en tres fases de su elaboración; en países de Latinoamérica como Venezuela, Perú y Colombia se han realizado estudios sobre el aislamiento de BAL en quesos de elaboración artesanal (Alvarado et al., 2007; Crsitóbal y Maurtua, 2003; López, 2011).

El Ecuador es un país que no tiene una fuerte tradición quesera, pero existen muchas comunidades indígenas que elaboran queso semimaduro, para consumo local y comercializan a pequeña escala sus productos, algunas trabajan bajo la coordinación y la capacitación de Organizaciones no gubernamentales (ONG) cuyo objetivo es producir en mejores condiciones de higiene y calidad.

Con las últimas leyes y acuerdos ministeriales que promueven la producción nacional, como la ley orgánica de Económica Popular y Solidaria aprobada el 2011, se aseguró la producción de intercambios, el consumo de bienes y servicios que permitan satisfacer necesidades y generar ingresos a los ecuatorianos, con lo que se está dando un mayor crecimiento del mercado de productos elaborados en comunidades rurales.

En el Ecuador existen pocos estudios sobre la microbiota de los quesos artesanales por lo tanto el objetivo de este trabajo es analizar las comunidades microbianas autóctonas de los quesos semimaduros elaborados en las regiones de Jima y Llactahuayco durante dos meses de maduración y contribuir de esta manera a la conservación de la biodiversidad y especificidad de estos productos, establecer diferencias en la biodiversidad microbiana de los quesos de las dos regiones y durante el tiempo de maduración y además determinar la calidad microbiológica de los quesos, lo que servirá para promover una fermentación más controlada y con nuevas investigaciones, desarrollar a futuro un cultivo iniciador de cepas autóctonas.

Para identificar la microbiota presente en quesos madurados de forma artesanal se usó filotipaje como herramienta para caracterizar los microorganismos presentes a lo largo de los 60 días de maduración del queso, esta metodología permite trabajar directamente con el ADN del queso, obtener secuencias de la subunidad pequeña del ribosoma (16S) para determinar la diversidad de microorganismos presentes en las muestras de este estudio. Los métodos de secuenciación masiva de ADN tienen mayor sensibilidad y especificidad que los métodos convencionales basados en el aislamiento en medios de cultivo, puesto que ahora se estima que más del 99% de los microorganismos de los ambientes naturales no son cultivables por técnicas estándar (Cocolin et al., 2013).

Los microorganismos en la producción de quesos

El queso representa una matriz alimentaria con un ecosistema muy complejo en el que existen una gran diversidad de microorganismos que provienen del intestino de los animales, ambiente, pasto, de la leche cruda o de una inoculación partir de un lote anterior, y que son responsables de las características peculiares, fenómeno que se debe al desarrollo de las bacterias autóctonas y de las que continúan desarrollándose durante la fase de maduración (Bottazzi, 1993; Neviani, 2006; 2001; Settani & Moschetti, 2010).

En este ambiente son importantes las interrelaciones microbianas, así como las características del sustrato, tipo y cantidad de nutrientes, el pH, actividad del agua, potencial redox así como las particularidades del proceso de producción, la temperatura de cocción de la cuajada, la concentración de sal adicionada, los diferentes parámetros tecnológicos, y las condiciones ambientales en donde se da la maduración de los quesos; de las modificaciones de estos parámetros depende la supervivencia de los microorganismos y la estructura final del producto. (Neviani y Mucchetti, 2006; Beresford et al., 2001).

Además la fermentación que se produce en este ecosistema es decisiva en la calidad y seguridad microbiológica al inhibir el crecimiento de patógenos y causantes de alteración. (Caplice & Fitzgerald, 1999; Ross et al., 2002)

Es importante el entendimiento de la actividad metabólica de los microorganismos en el interior del queso, el desarrollo de nuevos conocimientos basados en el enfoque ecológico puede servir para la explotación de microorganismos para la producción de nuevos o mejores alimentos fermentados, aumentar los rendimientos y mejorar la calidad, seguridad y composición de los alimentos. (Ross et al., 2002)

Los procesos de fermentación conllevan beneficios importantes como el alargamiento del tiempo de vida útil de un alimento, mejoramiento de la digestibilidad de algunos productos alimenticios, la producción de compuestos que contribuyen al aroma y sabor, también de productos relacionados con la salud de las personas, como aminoácidos esenciales, vitaminas, antioxidantes, probióticos y otros como péptidos bioactivos que pueden servir para nuevas aplicaciones. (Caplice & Fitzgerald, 1999; Ross et al., 2002; Kabak et al, 2011)

Papel de las Bacterias ácido lácticas en la tecnología alimentaria

En la materia prima cruda que se fermenta en forma natural se pueden encontrar muchas especies de bacterias, levaduras y mohos, de los cuales las bacterias más comunes que están relacionadas con la transformación de los alimentos son las conocidas como Bacterias ácido lácticas o BAL (Ray & Joshi, 2014)

Las BAL pertenecen a dos phylum distintos, denominados: *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Dentro de los *Firmicutes*, las BAL pertenecen al orden *Lactobacillales* e incluyen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*,

Lactococcus, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* y en el phylum *Actinobacteria*, las BAL incluyen únicamente especies del género *Bifidobacterium* (Liu et al., 2014).

Los géneros de BAL asociados con los alimentos fermentados son *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaerobios o microaerófilos o aerotolerantes (Liu et al., 2014).

Los miembros de las BAL se han subdividido en dos grupos distintos basado en su metabolismo sobre los carbohidratos. Las homofermentativas que incluyen los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y algunos lactobacilos los cuales utilizan la vía metabólica Embden-Meyerhof-Parnas para convertir una mol de glucosa en dos moles de lactato y las heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de la glucosa, mediante la vía metabólica de la hexosa-monofosfato o pentosa, generando la mitad de energía de la que produce el grupo homofermentativo. Al grupo de las heterofermentativas corresponden los géneros *Leuconostoc*, *Weissella* y algunos lactobacilos (Ross et al., 2002; Marilley et al., 2004; Liu et al., 2014)

Las BAL son ampliamente utilizadas en la elaboración de una gran variedad de alimentos fermentados principalmente quesos, embutidos y ensilados; las características de este tipo de productos se deben a la diferente tecnología aplicada y a las cepas de BAL usadas para la fermentación, sus sabores, texturas y apariencia dependen directamente del crecimiento microbiano que provee las enzimas y metabolitos necesarios para la producción de los alimentos (Johnson & Steel, 2013). También es relevante su reconocimiento por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) como un componente alimentario seguro para el consumo humano GRAS (Generally Recognized As Safe) y sus funciones durante y después de la fermentación de los alimentos (Ross et al., 2002).

El rol que desempeñan las BAL incluye:

- Inhibición de bacterias productoras de deterioro y de patógenos
- La producción de compuestos antimicrobianos tales como: ácidos orgánicos, acetaldehídos, etanol, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, reuterina y bacteriocinas entre otros
- Desarrollo de aroma, sabor, textura como productos finales del catabolismo de carbohidratos

metil cetona y alcoholes secundarios que contribuyen al aroma (Bottazzi, 1987; Mucchetti, 2006).

La degradación de la caseína de la leche a péptidos y aminoácidos es un proceso clave ya que los aminoácidos son precursores de otros compuestos responsables del sabor cuando sufren procesos de transaminación, deshidrogenación, descarboxilación o reducción. Estos dan una amplia variedad de compuestos de sabor, como el ácido fenilacético, p-cresol, metano tiol, 3 metil butirato, 2 metil butanol, entre otros. (Fox y Wallace, 1997; Marilley et al., 2004). Para que se produzca la degradación de las proteínas es necesario la lisis celular que permite la liberación de las enzimas proteolíticas actividad que se debe principalmente a las bacterias iniciadoras de la fermentación (Beresford, 2001).

Los derivados del catabolismo de los aminoácidos aromáticos tienen impacto en la generación de aromas, como es el caso de la formación de benzaldehído que se caracteriza por un aroma a almendras amargas, el fenil acetaldhído como la miel y el fenil propanoato por un aroma floral (Marilley et al., 2004). También se ha señalado que los productos del catabolismo de aminoácidos sulfurados contribuyen de manera importante al sabor de algunos quesos como el Cheddar y en otras variedades. (Mc. Sweeney et al., 2004)

Tabla 1. Componentes de sabor de algunas clases de quesos. (Smith et al., 2005)

Metabolism	Gouda	Cheddar	Camembert	Swiss - type (and Massdam)
Amino acid	3- Methylbutanal	3- Methylbutanal	3-Methylbutyrate	
	3- Methylbutanol	Isovaleric acid	3-Methylbutanal	
	Methanethiol	Methional	Methional	Methional
	Dimethylsulfide (DMS)	Methanethiol	Methanethiol	3-Methylbutanal
	2- Methylpropanol	DMS	DMS	Skatole
	Dimethyltrisulphid (DMTS)	DMTS	Benzaldehyde	
Sugar		Propionic acid		Propionic acid
	Diacetyl	Diacetyl	2,3- Butanedione	Diacetyl
Fat	Butyric acid	Butyric acid	1- Octen-3-ol	
	Butanon	Acetic acid	Butyric acid	
	Hexanal	1-Octen-3-one	1-Octen-3-one	
	Pentanal	Butanone	2-Undecalactone	
			γ -Decalactone	
Rest and combined pathways	Ethyl butyrate	Ethyl butyrate		Ethyl butyrate
	Limonene	Ethyl hexanoate	Phenylethyl acetate	Ethyl hexanoate
References	[Neeter and De Jong 1992], [Engels 1997]	[Christensen and Reineccius 1995], [Curioni and Bosst 2002]	[Kubickova and Grosch 1997]	[Curioni and Bosset 2002], [Prieninger and Grosch 1994]

El metabolismo de los azúcares, es esencial para la diferenciación de los quesos, la lactosa puede ser degradada por la vía glucolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) o la fosfoctolasa, que se lleva a cabo principalmente por el género *Leuconostoc*, dando como productos L o D-Lactato o una mezcla racémica de los dos, aunque algunas especies pueden producir también etanol (Bottazzi, 1987; Fox y Wallace, 1997; Marilley et al., 2004).

La utilización total o parcial de los azúcares por parte de BAL hace que no queden disponibles para los microorganismos causantes de enfermedad y deterioro y se induce además la modificación de las características físico-químicas del queso consecuentemente a la acumulación de metabolitos primarios como el ácido acético, alcohol etílico y CO₂. (Beresford et al., 2001; Neviani y Mucchetti, 2006)

La acidificación hace al sustrato hostil para gran parte de microorganismos patógenos, favoreciendo la coagulación enzimática en el proceso de caseificación, la modificación estructural de la matriz de la leche, inducida por la fermentación desempeñan un rol central en la definición de las características del producto (Mucchetti, 2006), tiene además un efecto indirecto en el sabor del queso, actúa más bien por la capacidad reguladora sobre la actividad enzimática, al permitir el crecimiento de varios microorganismos e inhibir otros durante la maduración (Marilley et al., 2004).

La producción de D-lactato durante la maduración es probablemente mayor en los quesos elaborados a partir de leche cruda; el lactato puede ser oxidado a acetato y CO₂, en esta transformación puede influir el tamaño del queso la permeabilidad al oxígeno de la corteza siendo un importante compuesto de sabor en muchos quesos, también se pueden formar como resultado de citrato, o a partir del catabolismo de los aminoácidos. (Fatma et al., 2003)

También es importante el metabolismo producido por las bacterias propiónicas del grupo lácteo, PAB (Propionic acid bacteria), que en la actualidad incluyen las especies *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici*, todas estas se relacionan con la fermentación natural mientras que *P. freudenreichii* se ha usado como cultivo iniciador en la fermentación controlada de quesos (Ray & Bhunya, 2008), en ambos casos las bacterias propiónicas dan lugar a una fermentación secundaria del ácido láctico con producción de ácidos propiónico y acético, que contribuyen al sabor, así como de CO₂ responsable de la formación de ojos en la pasta. (Fatma et al., 2003)

Algunas BAL como *Leuconostoc spp.* y *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* pueden también metabolizar el citrato originando ácido acético, acetaldehído, acetoína y diacetilo, compuestos que intervienen directamente en el aroma. (Marilley et al., 2004)

Selección de cepas autóctonas

Los microorganismos del queso se consideran pertenecientes a dos grupos principales: el de las Bacterias lácticas iniciadoras o SLAB (Starter lactic acid bacteria) y las Bacterias lácticas no iniciadoras o NSLAB (Non-starter lactic acid bacteria) que constituyen la flora secundaria; las iniciadoras pueden estar compuestas por cepas definidas y frecuentemente están integradas por las especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*, estas bacterias se añaden en forma deliberada al inicio de la

elaboración, o pueden proceder de una mezcla no definida de cepas contaminantes naturales de la leche y en algunos casos del inóculo del suero, tienen como función principal la producción de acidez, reduciendo el pH de la leche a 5.3 en 6 horas, a 30-37 °C. (Beresford et al., 2001), contribuyen a la maduración mediante la producción de enzimas proteolíticas que dan lugar a la formación de aminoácidos y liberación de compuestos de sabor (Morales et al., 2008).

El grupo de NSLAB está compuesto principalmente por: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus spp.* y *Pediococcus spp.*, éstas no contribuyen a la acidez pero si tienen que ver con otros aspectos que influyen en la maduración del queso como el desarrollo de cualidades organolépticas. (Beresford et al., 2001; Licitra & Caprino, 2012)

El origen de las NSLAB ha sido objeto de controversias ya que se han encontrado tanto en leche cruda como pasteurizada, siendo probable una contaminación post-pasteurización, una pasteurización defectuosa o la contaminación durante el proceso; en otros estudios sin embargo se afirma que las NSLAB pueden sobrevivir a la pasteurización en un estado subletal, revitalizarse y crecer durante la maduración, aceptándose como principales fuentes de éstas bacterias la materia prima, el ambiente de elaboración y de maduración de los quesos. Estas han sido consideradas importantes en las interrelaciones con otras bacterias mediante la competencia por metabolitos limitantes y en la producción de inhibidores como bacteriocinas (Beresford, 2001; Yoon et al., 2015).

Se han reconocido muchas especies pertenecientes a la flora secundaria como *E. faecium* y *E. faecalis* relacionados con una contaminación fecal y se han calificado como microorganismos no deseados, sin embargo, se ha señalado que pueden contribuir al desarrollo de las características organolépticas debido a sus metabolitos secundarios, además de inhibir patógenos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium spp.* y *V. cholerae* por la producción de bacteriocinas (Ross et al., 2002; Giraffa et al., 2003). La presencia del grupo enterococos como parte de la flora natural de algunos productos artesanales ha sido asociado con infecciones en pacientes inmunosuprimidos, y la aparición de cepas multidrogoresistentes pero también se señala su rol positivo en el desarrollo del sabor del queso (Beresford, 2001; Yoon et al., 2015).

A pesar de que existe un aumento en la preferencia de los consumidores por los quesos elaborados a partir de leche cruda debido a sus características organolépticas, no deja de ser importante el riesgo que pueden representar estos productos para la salud por su implicación en la producción de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Yoon et al., 2015) debido a que bacterias patógenas de humanos pueden estar incluidas como parte

de la flora secundaria o de inicio dependiendo de las condiciones higiénicas del proceso de elaboración y maduración del queso.

Los principales patógenos relacionados con los quesos de leche cruda y que ha sido causa de la aparición de brotes de enfermedades son: *S. aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* serotipo O157:H7, *Salmonella* especies, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Cl. perfringens* y *Yersinia enterocolitica*, en algunos países *Brucella*, y *Mycobacterium tuberculosis* (Ray & Bhunia, 2008; Karns et al., 2005, 2007) por lo que los quesos elaborados con leche cruda se han considerado productos inseguros.

Varios serogrupos de *E coli* productora de Toxina Shiga (STEC) han sido aisladas de quesos de leche cruda (Yoon et al., 2016), pero así mismo existen otros trabajos en los que se ha evaluado el crecimiento y supervivencia de diferentes serogrupos de STEC como: O26:H11, O103:H2, O145:H28, y O157:H7, a través de todo el tiempo de maduración y en base a éstos estudios se ha determinado que una rápida acidificación y una larga maduración hace posible la eliminación de STEC, además se ha observado que el serogrupo O157:H7 tiene un crecimiento débil y menos retención que otros serogrupos. (Miszczycha et al., 2013).

En otros estudios realizados desde el año 1999 hasta el 2011 en Estados Unidos se reportaron algunos serovares de *Salmonella* como: S. Newport, S. Typhimurium, S. Dublin, S. Montevideo, y S. Java, causantes de brotes asociados al consumo de leche y queso, la mayoría de los casos de salmonelosis fueron relacionados con el consumo de queso elaborado con leche no pasteurizada. (Haiping et al., 2013). De igual forma existen muchos reportes sobre brotes provocados por *S. aureus* L. *monocytógenes*, *Campylobacter jejuni* y *Brucella*, sin embargo, el riesgo microbiológico del queso se puede reducir asegurando una buena higiene de los entornos de producción de leche y quesos así como de la etapa posterior a la fabricación complementándose con una supervisión microbiológica constante (Yoon et al., 2015)

El grupo de bacterias Coliformes también puede estar presente en los quesos elaborados con leche cruda y han sido identificadas como causa de uno de los defectos de los quesos semimaduros, la producción de gas de forma temprana; en quesos duros como el Cheddar este fenómeno se ha relacionado a una producción lenta de la acidez o cuando se utiliza leche muy contaminada con ésta clase de bacterias. Se ha indicado que son necesarios aproximadamente 10^7 UFC/g de Coliformes para producir los defectos de producción de gas en los quesos (Nsofor & Frank, 2013). En general las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* como los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* pueden ser responsables de la descomposición de los quesos y la producción de olores y sabores adversos. (Yoon, et al., 2015). Así mismo la producción tardía de gas y sabores desagradables en quesos duros son el resultado del metabolismo de lactato (o glucosa) por *Clostridium* spp. debido a la producción de ácido butírico e hidrógeno (Nsofor & Frank, 2013).

Las Bacterias lácticas iniciadoras naturales implican una enorme biodiversidad y número elevado de cepas, así como la especificidad en relación a la distribución geográfica, por lo que se han realizado muchos estudios para seleccionar cepas de BAL de nichos ecológicos naturales con la finalidad de encontrar marcadores para controlar o modificar características y encontrar nuevas aplicaciones para conservar aromas y de sabores que se consideran más intensos y que son atribuidos a la microbiota autóctona de elaboraciones artesanales (Mucchetti, 2006)

En las últimas décadas, algunas investigaciones han puesto de manifiesto que el uso de cultivos iniciadores comerciales en la elaboración de quesos da como resultado la pérdida de algunas de las características típicas lo que no sucede cuando se elaboran con leche cruda (Coconcelli & Cappa et al., 2006; Poznanski et al., 2004), señalándose que hay algunos cambios que se producen con la pasteurización como la desnaturalización de las enzimas autóctonas impidiendo la formación de muchos compuestos, que involucran sabores más fuertes y específicos, que además determinan una maduración más rápida, adicionalmente se evita su interacción con las caseínas y se produce la eliminación de algunos miembros termolábiles de la microbiota (Fatma et al., 2003; Yoon et al., 2015).

En cepas de BAL aisladas de quesos artesanales elaborados con leche de cabra, se ha constatado una amplia biodiversidad y variabilidad tanto inter, como intra-especie (Pogacic et al., 2013) así como también un gran potencial enzimático responsable del catabolismo de aminoácidos destacándose la alta actividad C-S liasa mostrada por las cepas de lactococos, muy superior a la observada en los lactobacilos y leuconostoc estudiados en otros tipos de quesos (Morales et al., 2003).

El conocimiento profundo de las rutas metabólicas y enzimas implicadas en el catabolismo de los aminoácidos en las BAL, permite la identificación y selección de cepas con propiedades aromáticas interesantes, y por lo tanto, el control de la producción de características organolépticas en queso. Por lo que se está haciendo un esfuerzo importante en la caracterización bioquímica, genética y tecnológica de cepas silvestres aisladas de quesos elaborados artesanalmente, con el fin de potenciar caracteres directamente asociados a la microbiota. (Beresford et al., 2001; Ruiz y Wachter, 2003)

Avances para el mejoramiento de productos lácteos

Los microorganismos presentes en los alimentos se han analizados desde épocas anteriores utilizando principalmente técnicas basadas en cultivos, pero a partir de los años 90 se comenzaron a aplicar métodos independientes de cultivo, que permiten rescatar microorganismos que están en cantidades pequeñas, en el estado viable pero no cultivable

y en general evaluar el ecosistema microbiano. Algunos de estos métodos están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) realizándose la amplificación de los ácidos nucleicos extraídos directamente de la matriz del alimento y con el producto de PCR los análisis específicos para establecer diferencias en las secuencias de ADN (Cocolin et al., 2013).

La más utilizada en el campo alimentario es DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), otras aplicadas en menor escala son: TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), SSCP (single strand conformation polymorphism) y T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) (Cocolin et al., 2013).

Los tres primeros permiten separar fragmentos de ADN de doble cadena, de la misma longitud pero con diferentes secuencias, la huella genética se obtiene gracias al efecto del diferente comportamiento mediante la denaturación de las moléculas en gradiente lineal de denaturación con agentes químicos (urea y formamida) en DGGE o físicos (temperatura) en TGGE. En el caso de SSCP la principal diferencia se basa en la movilidad de una cadena simple de DNA. Las bandas de ADN obtenidas mediante estas técnicas son individualizadas, aisladas y secuenciadas (Randazzo et al., 2009; Kergourlay et al., 2015).

En el análisis T-RFLP se mide el polimorfismo de los fragmentos terminales de restricción de un marcador genético amplificado mediante PCR, los primers pueden ser marcados en la extremidad 5' con una molécula fluorescente, una vez amplificados los fragmentos se separan mediante electroforesis sobre gel de poliacrilamida o mediante electroforesis capilar automática mediante laser. El resultado es un electroferograma constituido de una serie de picos que difieren por la movilidad (longitud molecular), altura y área, lo que representa la diversidad microbiana presente en la comunidad examinada (Cocolin et al., 2013)

Un avance en lo que se refiere a secuenciación se dio en el año 2005 cuando se desarrolló el primer método de secuenciado masivo que tiene como principal característica, el secuenciamiento de miles de fragmentos de ADN en forma paralela, lo que significa que el número de secuencias obtenidas durante una corrida supera el máximo de 96 secuencias que se obtenían con los secuenciadores capilares de última generación que utilizaban el método de Sanger (Kergourlay, 2015).

Estos métodos pertenecen a las técnicas de secuenciación de última generación NGS (por sus siglas en inglés) y han revolucionado el estudio de ecosistemas microbianos, con la posibilidad de un secuenciamiento de genes de alto rendimiento (HTS), tienen ventajas con respecto a la de DGGE en la que solo las bandas bien definidas pueden ser secuenciadas y como consecuencia solo una fracción de la microbiota puede ser evaluada e identificada, en cambio con NGS una cantidad masiva de secuencias son generadas a partir de una única

ejecución de secuenciación y su análisis ofrece la posibilidad de obtener un gran cantidad de información en un tiempo relativamente corto (Escalante et al., 2014; Kergourlay et al., 2015).

En este contexto son importantes los denominados análisis metagenómicos que constituyen una herramienta poderosa para realizar análisis del material genético directamente extraído del ambiente, como un todo, en este enfoque se incluyen etapas que van desde la extracción de DNA ambiental o metagenoma, la amplificación de regiones de interés y la secuenciación; esta tecnología se está aplicando a una gran diversidad de ambientes naturales como el aire suelo y plantas y en los últimos años se ha dedicado a estudiar también ecología microbiana de los alimentos tanto frescos como fermentados (Keygourlay et al., 2015).

En el futuro se pretende que los estudios no se basen únicamente en el gen 16S rRNA y que sea posible una identificación de especies pertenecientes a todos los organismos vivos presentes en un determinado alimento, de esta manera se conseguiría al mismo tiempo la evaluación de composición de ingredientes, así como de su población microbiana, esto con un enfoque multi ómico que incluya una metatranscriptómica (estudio del ARN total transcrito) y metabolómica (estudio de la totalidad de metabolitos) entonces se podría obtener una mayor información sobre la interacción de las bacterias entre sí y con su entorno (Dugat-Bony et al., 2015).

En la actualidad ya se dispone de la secuenciación parcial o completa de un sinnúmero de BAL (Liu et al., 2014) a partir de lo que se puede realizar el análisis comparativo de secuencias genéticas de sus enzimas, discernir sobre rutas metabólicas y entender la producción de aromas y sabores característicos, usar esta información molecular para aislar cepas de interés tecnológico como son algunas cepas de cultivos iniciadores que poseen especificidad en peptidasas. (Marilley et al., 2003, Sieuwertz et al., 2008).

La proteómica ha permitido también realizar la determinación de proteínas durante la maduración de los quesos y establecer que en la etapa inicial, las proteínas que se encuentran en mayor proporción son las correspondientes a bacterias del género *Lactobacillus* y que éstas son las relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la producción de energía. (Cárdenas et al., 2014).

La expresión de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés y reparación de ácidos nucleicos, son un indicativo de que los microorganismos que se desarrollan durante la manufactura del queso están sujetos a diferentes condiciones de estrés como son: calentamiento de la leche (55°C), el ácido producido, la adición de sal y las diferentes temperaturas de incubación que se utilizan durante la maduración (12-24°C). Las proteínas mayormente representadas en esta etapa, son derivadas de *Propionibacterium freudenreichii*, responsable de la mayor producción de ácido propiónico. (Gagnaire et al., 2004).

Otras aplicaciones de la herramienta proteómica son la identificación rápida de patógenos y de consorcios microbianos que no son cultivables, (González & Herrera 2005), el

discernimiento de los mecanismos de patogenicidad y producción de toxinas, la detección de proteínas implicadas en la resistencia de los microorganismos, la evaluación de la seguridad de los ingredientes, detección y control de microorganismos agentes de deterioro y de biomarcadores de proteínas causantes de alergias así como la determinación de la calidad y autenticidad de los alimentos (Rizo et al., 2014).

Al complementarse las metodologías genética, proteómica, metabolómica y la liberación de bases de datos de una mayor cantidad de genomas, se obtendrá una información más robusta que contribuirá a un mejor estado nutricional y repercutirá en una condición superior de salud de los consumidores (Rizo et al., 2014).

CAPÍTULO 1

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Origen de las muestras

Las muestras estudiadas pertenecen a Jima y Lactahuayco poblaciones en las que se elaboran quesos de manera artesanal.

Lactahuayco es una comunidad que pertenece a la parroquia de Ingapirca perteneciente a la Provincia del Cañar, las temperaturas de la parroquia, van desde los 4°C a los 12°C, con precipitaciones que van de 600 a 1.600 mm anuales, las lluvias se caracterizan por ser de larga duración y de baja intensidad especialmente en la parte alta. La humedad relativa es superior al 80%, por los pajonales y la cubierta vegetal herbácea. La altitud de la comunidad de Lactahuayco va desde los 3.964 a los 4.460 m.s.n.m. (PDOT Ingapirca, 2015). Lactahuayco era parte de la antigua comunidad Huyrapungo por lo que a sus habitantes se les conoce comúnmente como Huayrapungos quienes se caracterizan por haber conservado la mayoría de sus rasgos culturales intactos (Ayabaca y Cordero, 2012)

La actividad pecuaria relevante es la crianza de ganado bovino lechero manejado de una manera tradicional. La superficie de sus parcelas van desde 5-30 ha, con un número de bovinos que oscila entre 7 - 20 cabezas de ganado por productor.

La producción de leche en la parroquia es de 57.900 L/día, de los cuales 37.700 L se comercializa de forma organizada a través de los centros de acopio de las comunas, en tanto que 20.200 L se comercializa a través de intermediarios, que corresponde al 65% y 35% respectivamente (PDOT Ingapirca, 2015).

La *Asociación La Dolorosa de Lactahuayco* está dedicada a la recolección y transformación de la leche cruda para la obtención de derivados lácteos, como yogurt, queso fresco y queso semimaduro. La capacidad de producción total de la planta es de 600 L/ día de leche. Los asentamientos poblacionales se ubican en su mayoría entre los 2600 y 3000 m.s.n.m.;

Jima es parroquia del cantón Sigüig de la Provincia del Azuay, las altitudes varían en este sector entre los 2247 y 4091 m.s.n.m. Posee temperaturas que oscilan entre los 3 hasta los 18 grados centígrados, con una temperatura media de 12 grados centígrados. Con una humedad de 59-88%. El centro parroquial de Jima se sitúa a una altura de 2700 m.s.n.m. mínima fluctúa casi siempre entre 4 y 8 °C pudiendo bajar hasta los 0 °C. La precipitación anual en esta zona va de los 800 a 2000 mm, la mayoría de eventos se presentan con larga duración pero de baja intensidad.

La producción diaria de leche en el Sigüig, es de 33.665 litros. El pasto cultivado es el principal cultivo pecuario del cantón; se caracteriza por una falta de manejo, dedicado principalmente

a la ganadería de producción de leche, y en menor porcentaje para la producción de carne. El pasto principal encontrado en el Cantón es el Ray grass (*Lolium multiflorum*)

La principal actividad a la que se dedica el 67 % de la población económicamente activa, de la parroquia Jima es la agricultura, ganadería y pesca; El principal producto comercializado es la leche con el 48%, el quesillo ocupan el tercer lugar en la comercialización. (PDOT Sigsig, 2012).

Jima se caracteriza por la existencia de productores artesanales de quesillo y quesos semimaduros en pequeñas asociaciones y llevan su producto a las despensas que se ubican en la cabecera parroquial, desde donde se recoge el producto y se comercializa principalmente en Cañar, Loja y la ciudad de Cuenca, de igual manera son comercializados en las ferias locales.

1.2 Elaboración de queso y muestreo

1.2.1 Tecnología de producción de los quesos semimaduros

Para el estudio se elaboraron tres lotes específicos de quesos en cada región, bajo la supervisión de técnicos del FEEP (Fondo Ecuatoriano Populorum Progressio), institución privada con finalidad social que ofrece el apoyo interdisciplinario para el desarrollo de asociaciones rurales. Las etapas del proceso se describen en Anexo 1

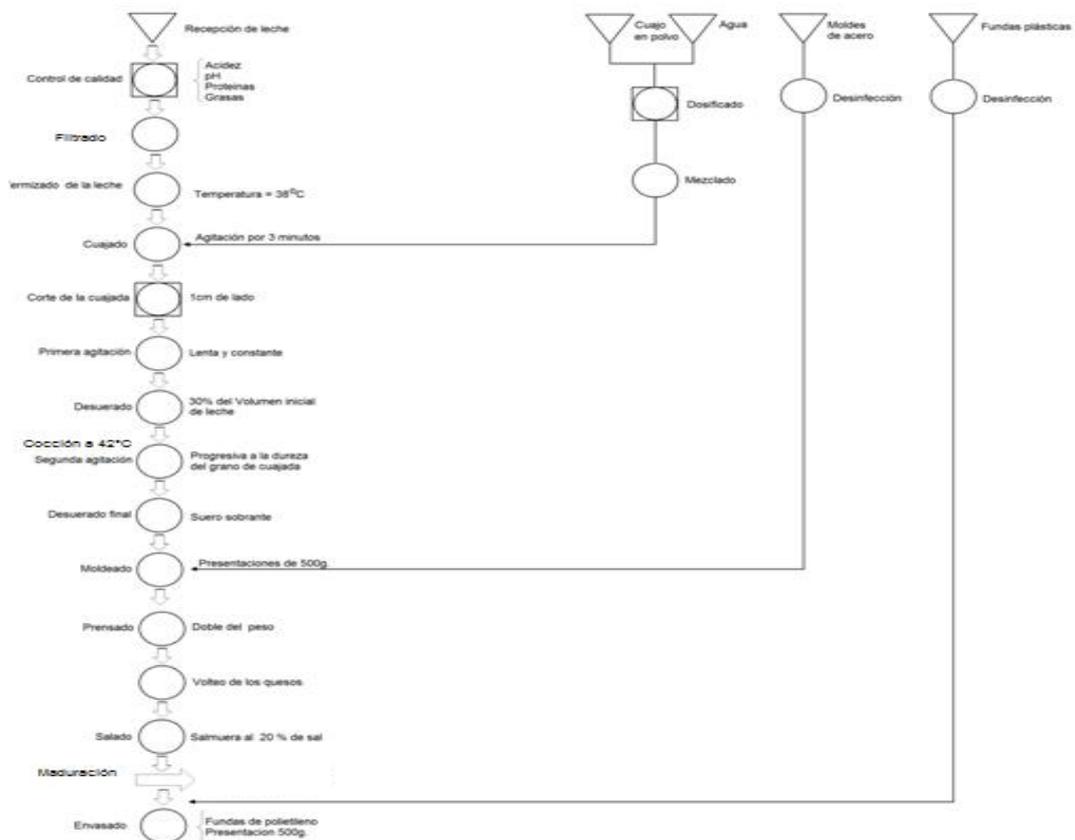


Fig. 2. Diagrama de flujo de la producción de los quesos en las dos regiones. (FEEP, 2016)

1.2.2 Muestreo

Los quesos fueron muestreados inmediatamente después de su elaboración, y a los 15, 30 y 60 días de maduración, en número de 3 unidades muestrales de cada lote dando un total de 24 unidades muestreadas. Para el efecto se utilizó un cuchillo estéril, y se hizo un corte en triángulo del cual se ocupó la parte central.

1.3 Protocolo experimental

1.3.1 Determinación de pH

En un vaso de precipitados se mezclaron 10 g de muestra molida de queso con 20 ml de agua destilada y se procedió a la medición eléctrica de la actividad de iones Hidrógeno presente en las muestras mediante un potenciómetro previamente calibrado con dos puntos de referencia (pH 4 y 7) según la técnica reportada en la norma NMX-F317-S-1978 sobre la determinación de pH en alimentos.

1.3.2 Determinación de Coliformes y *Escherichia coli*

Se contaron las bacterias del grupo Coliforme y la especie *Escherichia coli* utilizando los medios listos Compact Dry EC, con certificado AOAC No. 110402. Se pesó 10 g de cada muestra en condiciones de esterilidad y se colocó en 90 ml de agua peptonada al 1/1000 la misma que se utilizó como diluyente, la muestra se homogenizó en un stomacher durante un minuto y se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} .

Luego se inoculó 1 ml de cada dilución en las placas Compact Dry EC, las siembras se hicieron por duplicado. La temperatura de incubación utilizada fue de 37 ± 2 °C por 24 horas.

La interpretación de los resultados se hizo tomando en cuenta para coliformes las colonias color rojo o magenta, mientras que las colonias de *E. coli*, contadas fueron las de color azul. Sumando las colonias rojas y azules resulta la cifra total del grupo coliforme. La detección y diferenciación se debe a que el medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos que son Magenta-GAL y X-Gluc específicos para cada clase de bacteria.

Para la expresión de resultados el criterio adoptado fue contar el número de colonias desarrolladas en la placa, si el número de colonias se encuentra entre 25 y 250 colonias, se multiplicó la cantidad de colonias por el inverso de la dilución y se expresó el resultado como UFC/g. Cuando esto no se cumple se consideró el resultado obtenido como "VALOR ESTIMADO" del recuento. (Técnica según instrucciones para el uso e interpretación de las placas Compact Dry provista por el fabricante Nissui)

1.3.3 Caracterización genotípica

Extracción de DNA.- Se realizó utilizando el Mini Kit PureLink Genomic DNA Kits Catalog Numbers K1820-01, (Thermo Fisher scientific) para el lisado se utilizó cantidades ≤ 25 mg de queso tomado en condiciones de esterilidad, colocando en nitrógeno líquido, las demás etapas se realizaron según el protocolo provisto por el fabricante. (Anexo No. 2). Los productos de la extracción ADN se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Fig.3

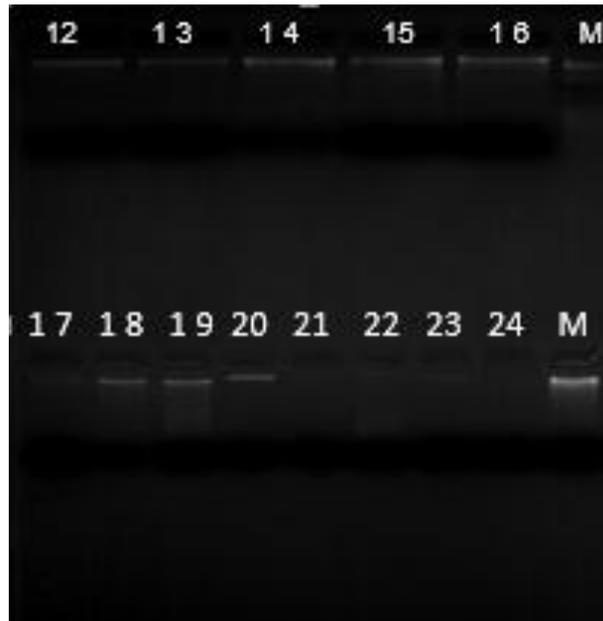


Fig. 3. Productos de la extracción de ADN: Carriles 15 y 21 muestras de queso de Jima a 30 y 60 días de maduración, carriles 18 y 24 muestras de queso de Lactahuayco a 30 y 60 días de maduración, M marcador de peso molecular 1Kb

Amplificación mediante PCR.- La amplificación del gen 16S rRNA fue realizado usando el primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 30 μ l. La mezcla de reacción contiene Buffer de reacción 1X, 1.75mM de MgCl₂, 0.12mM de dNTPs, (Promega), 0.8 μ M de cada primer y 0.25U de GoTaq Polimerasa (Promega) con el siguiente ciclo térmico: Denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C, con una extensión final de 8 minutos a 72°C. Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, (Fig. 4)

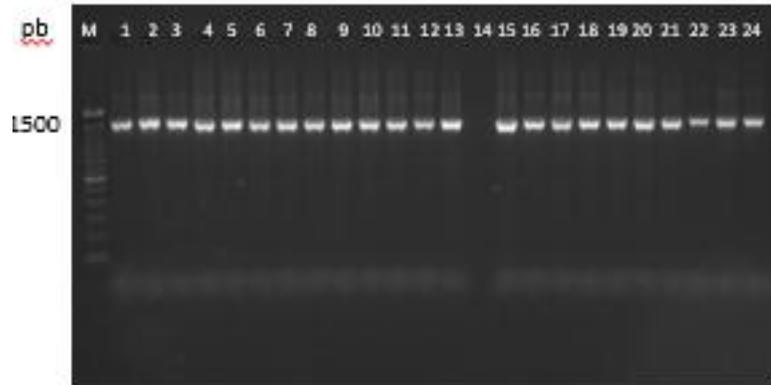


Fig. 4. Productos de la primera amplificación del gen 16S de 24 muestras de queso. M marcador de peso molecular 2000 pb, carriles 15 y 21 muestras de queso de Jima a 30 y 60 días de maduración, carriles 18 y 24 muestras de queso de Lactahuayco a 30 y 60 días de maduración.

Análisis de secuenciación de alto rendimiento.- Se determinó la diversidad microbiana mediante secuenciación de última generación NSG. Los productos de PCR inicial fueron enviados a CD genomics (NY, USA) para filotipaje en base a 16S, para la construcción de las librerías de clonas y secuenciación después de la amplificación de la región V4. CD genomics usa la plataforma ABI3730XL, Illumina Miseq (2 x 250), con 30000 lecturas por muestra.

CAPÍTULO 2

RESULTADOS

2.1 Evaluación de la medición del pH durante la maduración

En las muestras de queso procedentes de Jima los valores de pH registrados descendieron de 6.6 medido en la leche, hasta $4,90 \pm 0.03$; después de los 60 días de maduración y en las de Lactahuayco desde 6.8 hasta 5.18 ± 0.09 ; los valores de pH de los quesos de Jima durante la maduración fueron más bajos que los de Lactahuayco. (Fig 5 a y 5 b)

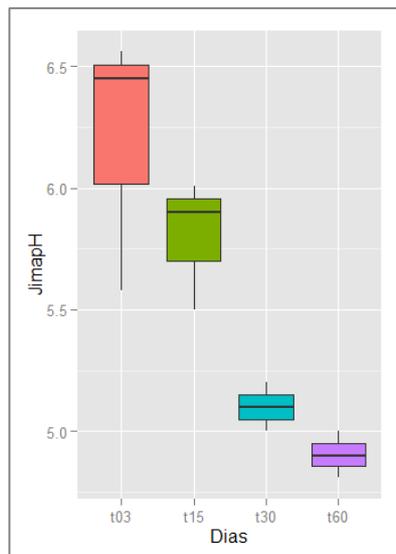


Fig. 5a Variación del pH en los quesos de Jima

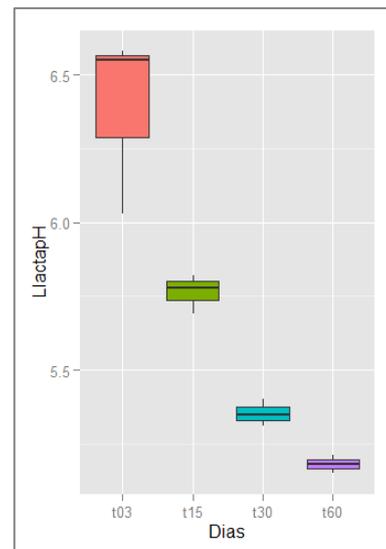


Fig. 5b Variación del pH en los quesos de Lactahuayco

El ANOVA de los valores de pH medidos durante la maduración presentó diferencias significativas entre los tiempos ($p=4.12572 \text{ E-}06 < \alpha=0.05$) no así entre los lugares Jima y Lactahuayco ($p=0.13 > \alpha=0.05$). (Tabla 3).

2.2 Calidad y seguridad microbiológica de los quesos

Los recuentos de Coliformes y *E. coli* fueron mayores (5.96 y $5,9 \log_{10}$ UFC/g) al inicio de la fermentación en los quesos del sector de Lactahuayco en comparación con los de Jima ($3,62$ y $3,44 \log_{10}$ UFC/g). (Tabla 2).

Durante el proceso de maduración los recuentos de Coliformes disminuyeron de 3.62 a $1.42 \log_{10}$ UFC/g y de 5.96 a $3.51 \log_{10}$ UFC/g en los quesos de Jima y Lactahuayco respectivamente y los recuentos de *E. coli* mostraron una disminución de $3.44 \log_{10}$ UFC/g a $0,00$ en los quesos de Jima y de 5.9 a $2.21 \log_{10}$ UFC/g en los de Lactahuayco. (Tabla 2).

Tabla 2. Variación de los recuentos de Coliformes y *E. coli* durante los 60 días de maduración de los quesos

TIEMPO/ DIAS	Coliformes log ₁₀ UFC/g		<i>E. coli</i> log ₁₀ UFC/g	
	JIMA	LLACTAHUAYCO	JIMA	LLACTAHUAYCO
3	3,62	5,96	3,44	5,9
15	3,09	5,68	3,04	5,41
30	3,06	4,98	1,99	4,33
60	1,42	3,51	0	2,21
valor p intergrupo	6,63E-08		1,72E-10	
valor p intragrupo	1,40E-06		1,32E-09	

El ANOVA de Coliformes y *E. coli* presentó diferencias significativas entre Jima y Lactahuayco ($p=6.62E-08$, $p=1.72E-10 < \alpha=0.05$) y también durante los 4 tiempos de maduración, ($p=1.39E-06$, $p=1.32E-09 < \alpha=0.05$) apoyando la hipótesis de diferencia de las medias entre lugares y tiempos de maduración. (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de ANOVA de los valores de pH, Recuento de Coliformes y *E. coli* de las muestras de queso procedentes de las regiones de Jima y Lactahuayco

PARÁMETRO	TIEMPO	LUGAR		Fcalculado	Ftabulado	P valor (alfa=0.05)
		JIMA	LLACTAHUAYCO			
Recuento de Coliformes		Promedio de UFC/g	Promedio de UFC/g	88,02	4,49	6,62E-08
	3	4133,3	90666,67			
	15	1233,33	47333,33	27,79	3,23	1,40E-06
	30	1160	95000			
	60	26,33	3243,33			
Recuento de <i>E. coli</i>		JIMA	LLACTAHUAYCO	201,82	4,49	1,72E-10
	3	2766,66	800000			
	15	1100	41333,33			
	30	96,66	33433,33	74,21	3,23	1,32E-09
	60	0	216,66			
pH		JIMA	LLACTAHUAYCO	2,53	4,49	0,130945
	3	5,37	5,42			
	15	5,8	5,76	23,54	3,23	4,13E-06
	30	5,1	5,35			
	60	4,9	5,18			

2.3 Caracterización molecular, diversidad y dinámica microbiana

La determinación de la taxonomía y grupos predominantes de bacterias a los 30 y 60 días de maduración de los quesos en las regiones de Jima y Lactahuayco, se realizó mediante el enfoque metagenómico y la secuenciación de última generación NGS, posterior a la amplificación de la región V4 del gen 16S ribosomal (16S ARNr). El total de tags (etiquetas)

y taxones obtenidos se muestra en la Figura 6, pudiéndose observar que la gran mayoría de taxones fueron etiquetados (36588 de los 37858), y que el número de OTUS (Unidades Taxonómicas Operacionales) determinado fue de alrededor de 30 en cada muestra analizada dando un total de 124 OTUs.

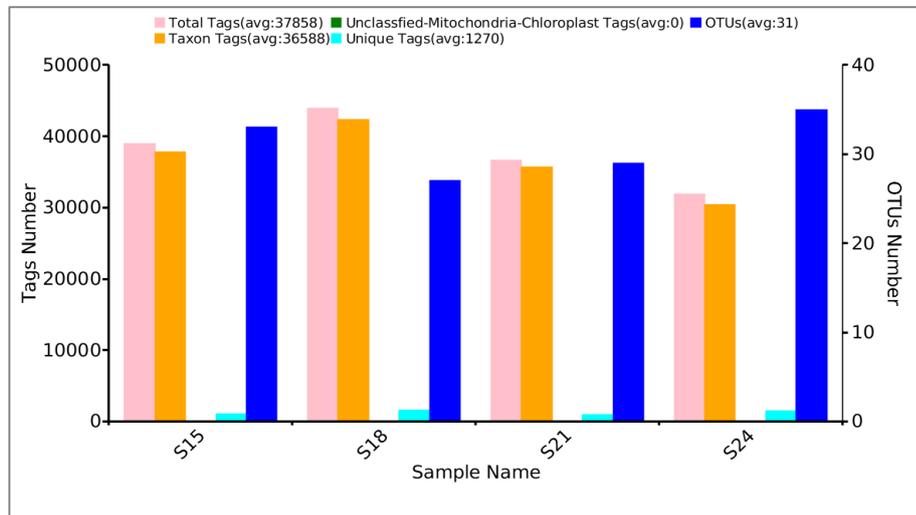


Fig. 5. Total de taxones y etiquetas determinados por secuenciamiento de última generación. En las cuatro muestras analizadas: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Llactahuayco

2.3.1 Descripción taxonómica

Se determinó que la microbiota presente en los quesos pertenece a 7 phylum: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Thermi*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* y *Bacteroides*, presentando una abundancia relativa mayor las bacterias pertenecientes al phylum *Firmicutes*, en los quesos de las dos regiones, siguiendo en abundancia las bacterias correspondientes al phylum *Proteobacterias*, con una mayor abundancia en las muestras de Llactahuayco. (Fig. 7)

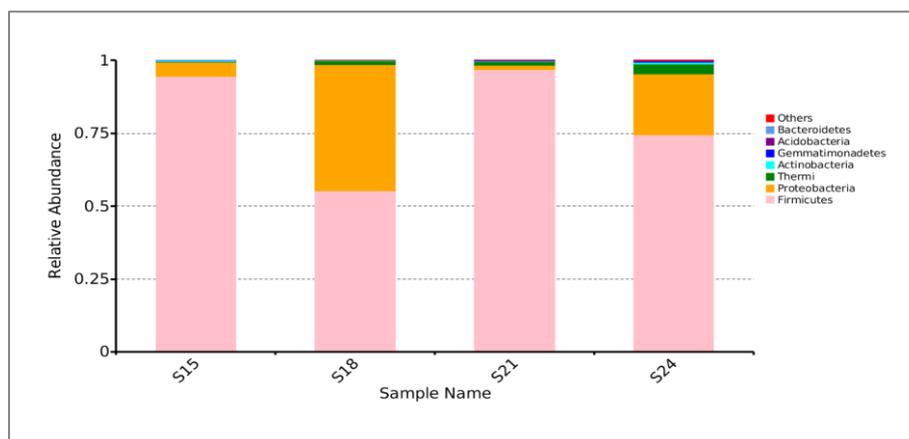


Fig. 6. Abundancia relativa de Phylum en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Llactahuayco

Las bacterias con abundancia relativa mayor en cuanto a ordenes fueron *Lactobacillales* en las muestras de Jima, presentandose en menor abundancia en las muestras de Lactahuayco en las cuales en cambio hay una abundancia relativa considerable de *Enterobacteriales*, le siguen en abundancia los ordenes *Thermales* y *Pseudomonadales*. (Fig. 8)

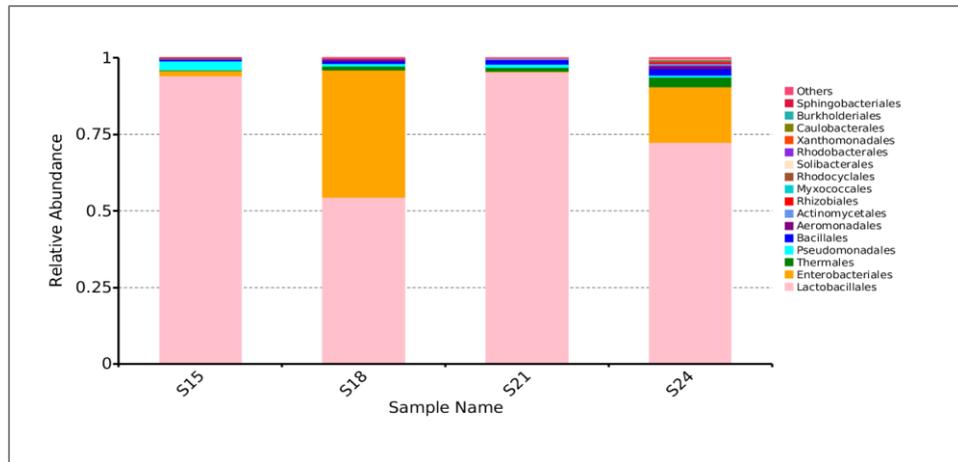


Fig. 7. Abundancia relativa de los principales ordenes bacterianos presentes en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco

Las principales familias encontradas en los quesos de los dos sectores, en orden de abundancia corresponden a *Streptococaceae*, seguida por la familia *Enterobacteriaceae* pero que presenta una abundancia relativa mayor en los quesos de Lactahuayco y en tercer lugar la familia *Lactobacillaceae*. (Fig. 9)

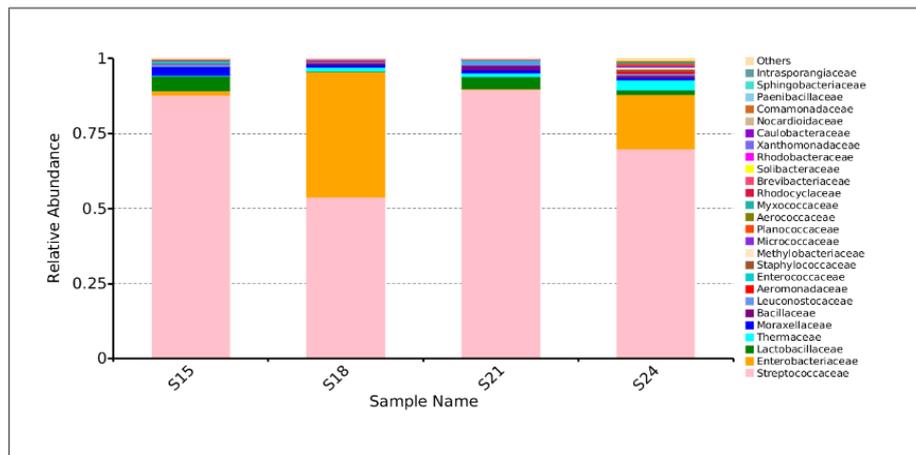


Fig. 8. Abundancia relativa de las principales familias bacterianas presentes en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco

En lo que respecta a los géneros bacterianos se encontraron abundancias relativas mayores del género *Lactococcus* en los quesos de Jima, en un porcentaje de 85,91% a los 30 días y 89% a los 60 días de maduración y en menor proporción en los de Jima, 34,25% a los 30 y

51,58% a los 60 días de maduración, seguidos en abundancia por el género *Streptococcus* que en los quesos de Lactahuayco presentaron una mayor abundancia relativa (alrededor de 19%) con respecto a Jima (1,5 a 1,8%) y en menor abundancia está el género *Escherichia* con un 3,99% a los 30 días y 1,26% a los 60 días, presentes únicamente en los quesos de Lactahuayco; *Meiothermus* está presente en los quesos de las dos regiones en menor proporción (0.29 a 3-3%), así como *Lactobacillus* en proporción de 2,99% y 1, 33% en los quesos de Jima pero no en los de Lactahuayco en los que solo se presentaron en un porcentaje de 0.24% a los 60 días de maduración. (Tabla 5 y Fig. 10)

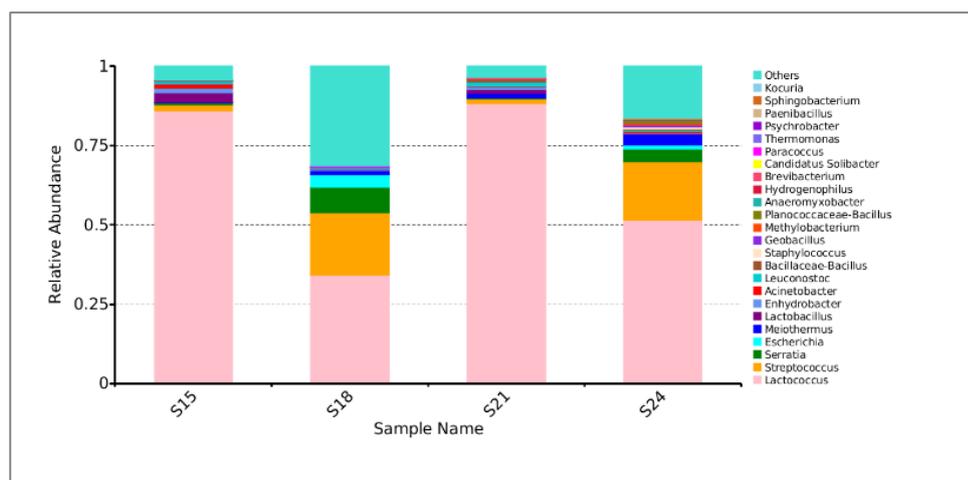


Fig. 9. Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos presentes en las muestras: S15 y S 21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco

Tabla 4. Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos en las muestras de Jima y Lactahuayco a 30 y 60 días de maduración

Géneros	JIMA		LLACTAHUAYCO	
	30 días	60 días	30 días	60 días
	Porcentaje de abundancia relativa			
<i>Lactococcus</i>	85,91	89,39	34,25	51,58
<i>Streptococcus</i>	1,86	1,47	19,66	18,61
<i>Lactobacillus</i>	2,91	1,33	-	0,24
<i>Leuconostoc</i>	0,87	1,2	0,19	0,55
<i>Escherichia</i>	-	-	3,99	1,26
<i>Serratia</i>	0,63	0,18	7,92	4,01
<i>Meiothermus</i>	0,29	1,41	1,29	3,37

En cuanto a las especies bacterianas las detectadas fueron: *Lactobacillus brevis*, *L. zeae*, *L. paralimentarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Acinetobacter johnsonii* y *Escherichia coli* esta última detectada sólo en los quesos de Lactahuayco, la abundancia relativa de las especies se muestra en la Tabla 6

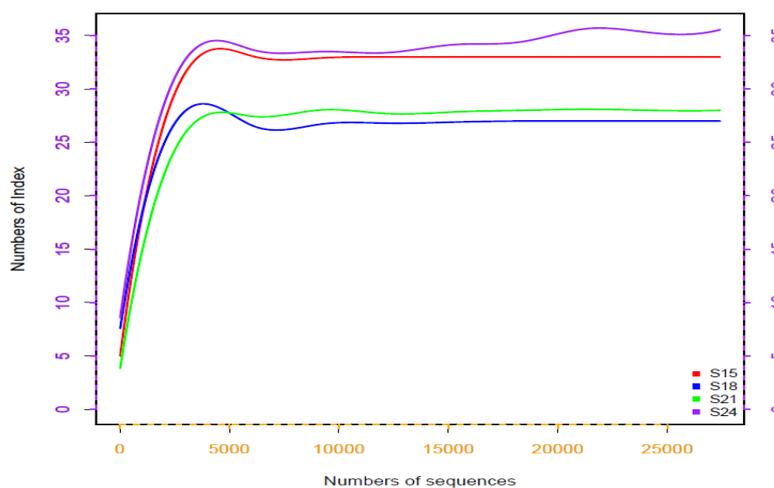
Tabla 5. Abundancia relativa de las especies bacterianas detectadas en las muestras de Jima y Llactahuayco a 30 y 60 días de maduración

Especies	JIMA		LLACTAHUAYCO	
	30 días	60 días	30 días	60 días
	Porcentaje de abundancia relativa			
<i>Lactobacillus brevis</i>	0,20-0,21	0,12-0,13	0	0
<i>Lactobacillus zeae</i>	1,82-1,92	1,06-1,11	0	0
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	0	0,12-0,13	0	0,056-0,07
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,177-0,19	0,28-0,29	3,09-4,55	1,83-2,29
<i>Escherichia coli</i>	0	0	3,98-5,86	1,25-1,56
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1,16-1,22	0,23-0,24	0,08-0,12	0,056-0,07

2.3.2 Diversidad alfa

La evaluación de la diversidad alfa (riqueza específica) considerando como comunidad homogénea cada muestra de queso de Jima y Llactahuayco a los 30 y 60 días de maduración se realizó por métodos paramétricos y no paramétricos.

El método no paramétrico basado en el estimador Chao 1 se utilizó para la construcción de la curva de acumulación de especies, en la cual se puede apreciar que después del número de 1000 secuencias, la curva se presenta asintótica lo que indica que no se encontrarían más especies aunque se aumente el número de secuencias analizadas. Chao 1 demostró que el número de especies esperadas al realizar la estimación no presenta mayores diferencias en las especies encontradas a partir del número de secuencias utilizado. Mayor riqueza se puede observar en las muestras S24 y S15 que corresponden a los quesos de 60 días de maduración de Llactahuayco y a los de 30 días de maduración de los quesos de Jima respectivamente. (Tabla 6 y Fig. 11)



Fig

11. Evaluación de la diversidad alfa Curva de acumulación de especies según el estimador Chao 1 para las secuencias correspondientes a las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Llactahuayco

Tabla 6. Índices de diversidad en las muestras de las dos regiones en los dos tiempos de maduración

Muestras	Tiempo días	Shannon H	Chao 1	Especies observadas
S15- Jima	30	1,39	33.0	33.0
S18- Llactahuayco	30	3,18	27.0	27.0
S21- Jima	60	1,12	28.0	28.0
S24- Llactahuayco	60	3,17	36.0	35.0

En cuanto a la diversidad alfa medida con el índice de Shannon que indica cómo están representadas las especies en abundancia y refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa asumiendo el valor de 0 cuando la muestra contenga una sola especie y alcanza la diversidad máxima ($H_{max} = \ln$ de Número de especies) cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos, es decir cuando la comunidad tenga una distribución de abundancias perfectamente equitativa; las muestras de Llactahuayco en los dos tiempos de maduración están mejor representadas que las de Jima ($H = 3,18$ y $3,17$ en las muestras de Llactahuayco y $H = 1,39$ y $1,12$ en las muestras de Jima), presentando una mayor diversidad y mayor equitatividad (Tabla 6 y Fig. 12)

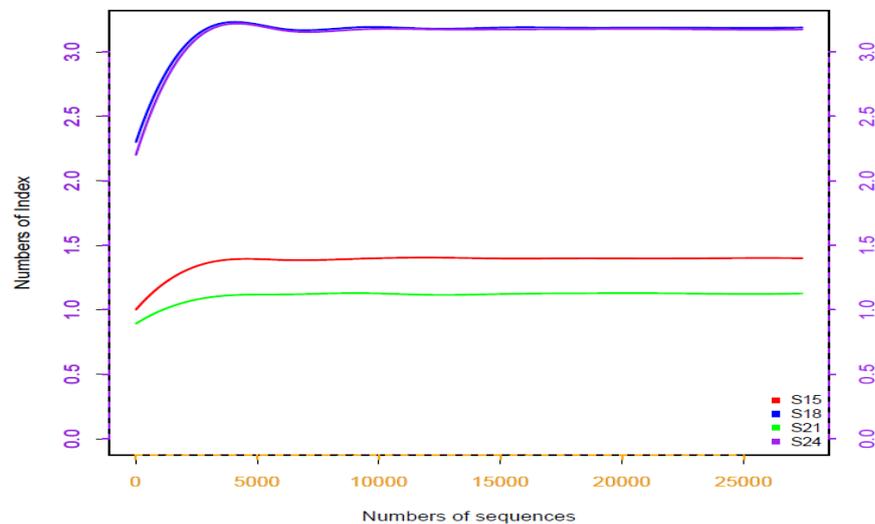


Fig. 10. Evaluación de la diversidad bacteriana mediante el índice de equidad de Shannon de las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Llactahuayco

La diversidad medida con métodos paramétricos se representa mediante el modelo de vara quebrada, que asume que las especies se organizan de acuerdo a los rangos de abundancia definidas y se pueden mostrar cómo está la comunidad. Es una curva de rango-abundancia en la que se puede apreciar que en las muestras de queso de la región de Jima hay pocas

especies abundantes y en el primer tiempo de maduración hay mayor abundancia de especies que a los 60 días. En Las muestras de Lactahuayco existe un número mayor de especies pero con abundancia menor, siendo también más abundantes en el primer tiempo de maduración. (Fig. 13)

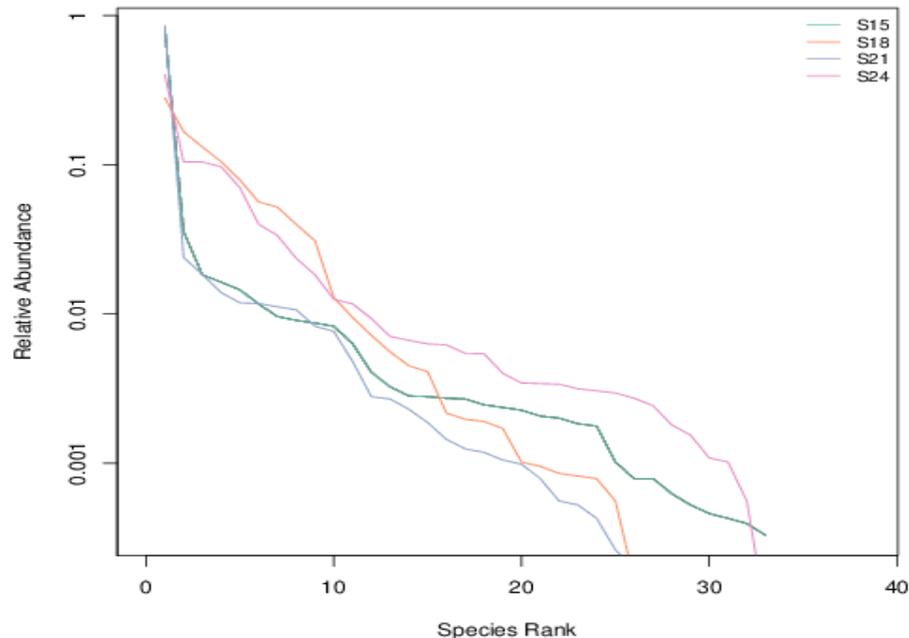


Fig. 11. Curva rango – abundancia de especies según el modelo paramétrico de vara quebrada correspondiente a las especies detectadas en las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco

2.3.3 Diversidad beta

El reemplazo en la composición y abundancia de especies entre las comunidades (muestras de las dos regiones estudiadas) se analizó teniendo en cuenta el índice de Bray Curtis que es un estadístico para cuantificar la disimilitud en la composición y abundancia entre comunidades y los índices Unweighted-UniFrac que es una medida cualitativa y utiliza el promedio no ponderado y Weighted- Uni Frac, que es una medida cuantitativa de diversidad, y utiliza el promedio ponderado, éstas dos últimas métricas se basan en información filogenética. Los valores correspondientes a cada índice se muestran en la matriz de correlación de la figura 14.

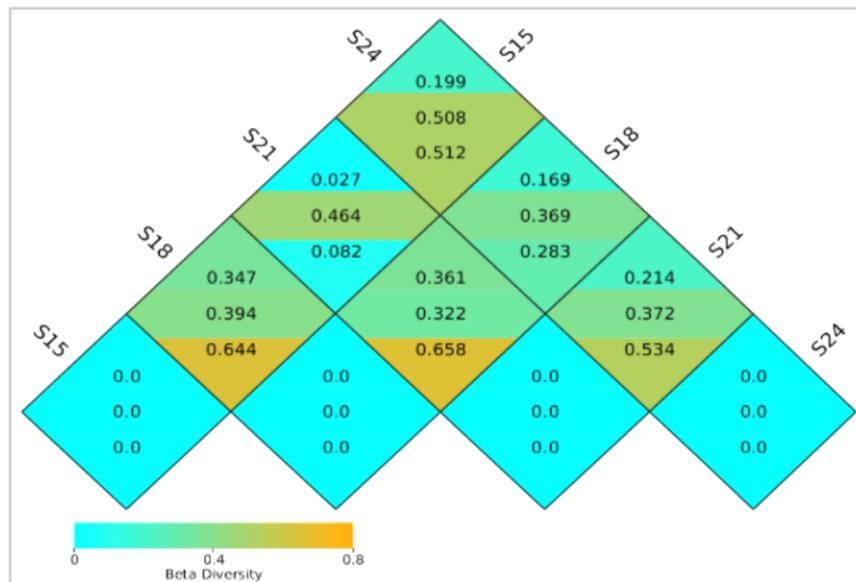


Fig. 12. Matriz de correlación según los índices, Weight UniFrac, Unweighted UniFrac y Bray Curtis, cuyos valores se encuentran en ese orden en la figura, para evaluar la diversidad beta en las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Lactahuayco

Según Unweighted-UniFrac y Bray Curtis se puede apreciar que hay un recambio de especies entre el 30 y 65 % entre las comunidades, notándose un menor recambio de especies que va de un 20 al 36% de reemplazo si se toma en cuenta los valores según la métrica Weighted-UniFrac, lo que puede ser porque Weighted-UniFrac utiliza el promedio ponderado. Se advierte una coincidencia referida a un menor reemplazo de especies según Bray Curtis y Weighted-UniFrac, entre S15 y S21 (BC=0,082; W=0.027) lo que significa que entre el 2% al 8 % de sus especies se están reemplazando, por lo tanto se puede considerar que son más homogéneas en abundancia y composición de especies, en los dos tiempos de maduración, éstas muestras corresponden a la región de Jima. (Fig 14).

El escalado multidimensional NMDS, que establece relaciones entre sujetos medidos en términos de proximidad, realizado a nivel de géneros bacterianos, indica que las muestras S15 y S21 que corresponden a los quesos de la región de Jima a los 30 y 60 días de maduración, están más próximos por lo que entre ellos hay una mayor relación, en comparación con las muestras S24 y S18 que son las muestras de queso de la región de Lactahuayco de los 30 y 60 días de maduración respectivamente, las mismas que son más distantes una de la otra y están separadas también de las anteriores, marcándose las diferencias entre los quesos según la región de origen.

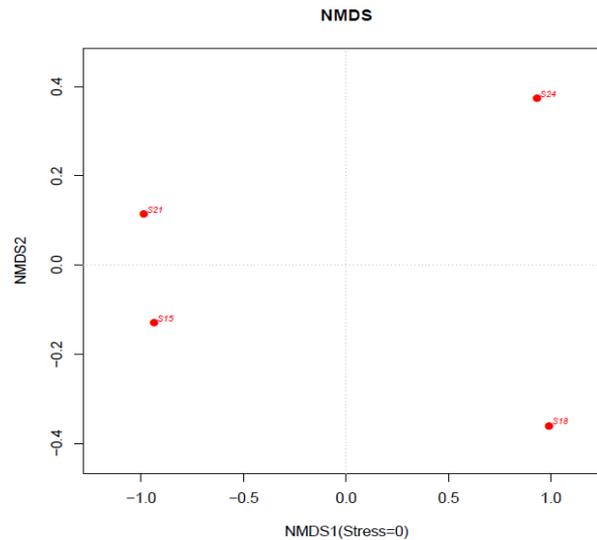


Fig. 13. Escalado multidimensional de las comunidades microbianas de las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Jima y S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de los quesos de Llactahuayco

2.3.4 Análisis de conglomerados (CLUSTER)

Utilizando el algoritmo UPGM y las distancia métrica Weighted UniFrac se pueden apreciar la formación de los cluster que clasifican las muestras por similitud a nivel de géneros en la figura 16, observándose una agrupación de las muestras correspondientes a una misma región. Por lo que se confirma la similitud entre las muestras de la misma región en cuanto a composición y abundancia relativa.

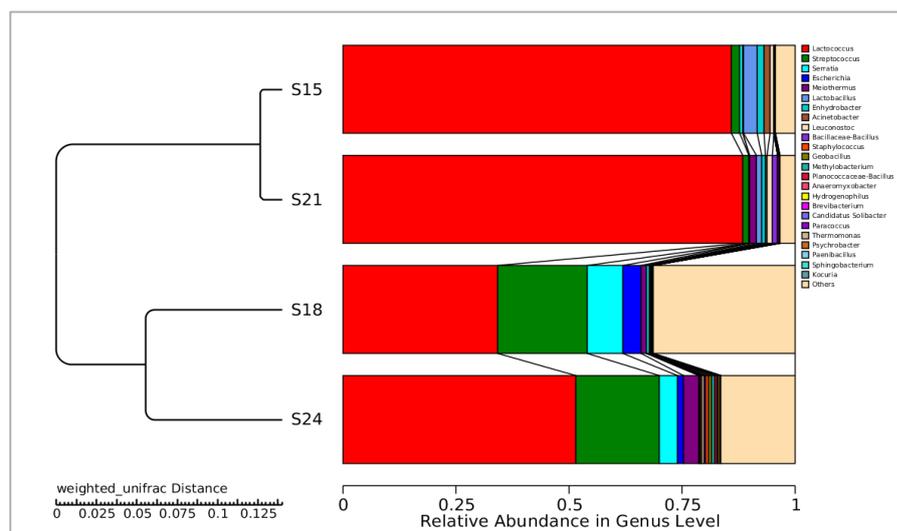


Fig. 14. Dendrograma de similitud de los géneros bacterianos presentes en las muestras: S15 y S21 a 30 y 60 días de maduración de la región de Jima, S18 y S24 a 30 y 60 días de maduración de la región de Llactahuayco

Según los resultados de agrupación el recambio de géneros bacterianos se relaciona a *Escherichia* que está presente únicamente en las muestras de Lactahuayco, *Lactobacillus* desaparece en la muestra de Lactahuayco al día 30 de maduración, el género *Staphylococcus* está presente únicamente en la muestra correspondiente a los 60 días de maduración del queso de Lactahuayco. *Methylobacterium*, *Anaeromyxobacter* *Hydrogenophilus Candidatus Solibacter* están únicamente en la muestra de los 60 días de maduración de Lactahuayco. *Psychrobacter*, *Sphingobacterium* y *Kocuria* están solamente en la muestra que corresponde a los 30 días de maduración de Jima. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Meiothermus*, *Leuconostoc* *Acinetobacter* son géneros comunes en las dos regiones y en los dos tiempos de maduración. (Tabla 4).

La diversidad en la composición de especies entre las comunidades está dada por la presencia de especies en los quesos de una sola región o en una sola etapa de maduración, como es el caso de *Lactobacillus brevis* y *L. zaeae* que están en los quesos de Jima en las dos etapas de maduración y *L. paralimentarius* está en los quesos de las dos regiones pero únicamente al final de la maduración. *Streptococcus agalactiae* está en los quesos de ambas regiones pero con mayor representatividad en Lactahuayco. *E coli* está sólo en Lactahuayco y *Acinetobacter johnsonii* en los quesos de las dos regiones pero con mayor representatividad en Jima (Tabla 5)

Tabla 7. Géneros bacterianos identificados después de la secuenciación de la región V4 en las muestras de quesos de Jima y Lactahuayco durante la maduración

Taxones	Jima		Lactahuayco	
	S15/ 30 días	S21/60 días	S18/30 días	S24/60 días
<i>Lactococcus</i>	+	+	+	+
<i>Streptococcus</i>	+	+	+	+
<i>Serratia</i>	+	+	+	+
<i>Escherichia</i>	-	-	+	+
<i>Meiothermus</i>	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i>	+	+	-	+
<i>Enhydrobacter</i>	+	+	+	+
<i>Acinetobacter</i>	+	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>	+	+	+	+
<i>Bacillaceae-Bacillus</i>	-	+	-	+
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	+
<i>Geobacillus</i>	+	+	+	+
<i>Methylobacterium</i>	-	-	-	+
<i>Planococcaceae-Bacillus</i>	+	+	+	+
<i>Anaeromyxobacter</i>	-	-	-	+
<i>Hydrogenophilus</i>	-	-	-	+
<i>Brevibacterium</i>	-	+	-	-
<i>Candidatus Solibacter</i>	-	-	-	+
<i>Paracoccus</i>	-	+	+	-
<i>Thermomonas</i>	-	-	+	-
<i>Psychrobacter</i>	+	-	-	-
<i>Paenibacillus</i>	-	+	-	-
<i>Sphingobacterium</i>	+	-	-	-
<i>Kocuria</i>	+	-	-	-

CAPÍTULO 3

DISCUSIÓN

Propiedades físicas de los quesos de Jima y Lactahuayco

El descenso del pH en los quesos al cabo de los dos meses de maduración: de 6.6 a 4.90 ± 0.03 en Jima y de 6.8 a 5.18 ± 0.09 en Lactahuayco, se deben a la conversión de la lactosa en ácido láctico durante el proceso de fermentación bacteriana, algunos autores señalan que la velocidad y el grado de disminución del pH es crítico, lo cual además de reducir los riesgos de presencia de patógenos tiene otros efectos de suma importancia como el control de la humedad durante la elaboración del queso, retención de coagulantes, pérdida de minerales, hidratación de las proteínas e interacciones electroquímicas entre moléculas proteicas produciendo como consecuencia la gelificación de la leche, la sinéresis, la formación de compuestos de sabor así como también es responsable de la textura de los quesos (Walstra et al., 2006; Johnson & Steele, 2013); el grado de disminución y los valores de pH encontrados en este estudio son aproximadamente semejantes a los reportados por otros autores al estudiar la dinámica del pH durante la maduración y la influencia de los procesos y clase de leche sobre el pH (Mormile, 2016; Martínez et al., 2015; Pandey 2003; Atasoy, 2007).

Las bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus* grupos dominantes y *Lactobacillus* género de menor abundancia, que prevalecieron durante todo el período de maduración en las muestras de quesos tanto de Jima como de Lactahuayco, son bacterias homofermentativas con un importante poder acidificante (Liu et al., 2014), lo que confirma su contribución en el descenso del pH.

Hay diferencia con el estudio realizado por Martínez et al., (2015) en queso de poro artesanal, ligeramente maduro que se elabora en Tabasco México en el que determinaron un pH de 3.96 ± 0.09 a los tres días y 4.04 ± 0.08 a los doce días de maduración, estos quesos son considerados de alta acidez lo que se debe a que al inicio de la elaboración se agrega suero del día anterior, lo que adiciona a la leche un inóculo con alta concentración de bacterias lácticas que provoca una mayor acidez; esto no sucede en la elaboración de los quesos de este estudio, en los que la acidez producida se debe únicamente a las bacterias lácticas autóctonas presentes en la leche.

La variación temporal de pH en las muestras de este trabajo, se relaciona con la disminución del recuento de Coliformes practicado en las muestras, disminución que se produjo en los quesos de las dos regiones analizadas; previamente Trmcic et al., (2016) reportan que el desarrollo de las bacterias del grupo Coliforme se ve influenciado por el pH, determinándose que por cada aumento de una unidad en el pH la probabilidad de un resultado positivo para Coliformes aumenta en un factor de 2.3, además en el mismo estudio se señala que los

Coliformes fueron detectados en quesos con pH mayor a 5. El recuento de *E. coli* presentó una disminución en los quesos de Jima hasta desaparecer y prevaleció en los de Lactahuayco durante los dos meses de maduración, en estudios anteriores se señala que *E. coli* y el serotipo *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir incluso en quesos considerados ácidos con pH 3.90 ± 0.1 (Lekkas et al., 2006; Vernozy, et al., 2005; Masoud et al., 2011), entendiéndose que su disminución en los quesos de este estudio es independiente de la influencia del pH. En el trabajo de Lekkas et al., (2006) determinaron que la sobrevivencia de *E. coli* O157 H7 en un queso ácido es mejor a 12 ° C que a 4° C; la temperatura de almacenamiento durante la maduración espontánea de los quesos de este estudio fue de alrededor de 12 ° C, por lo que probablemente ésta colaboró en la supervivencia de *E. coli*, otro factor que pudo influenciar su supervivencia puede ser el inóculo inicial que en el caso de Lactahuayco fue mayor, como se reporta en estudios de algunos autores. (Vernozy, et al., 2005; Yoon, et al., 2016)

Indicadores de calidad microbiológica

La presencia de *E. coli* en los dos tiempos de maduración en los quesos de Lactahuayco y únicamente hasta los 30 días de maduración en los quesos de Jima, significa que existe una contaminación de origen fecal que representa la posible asociación con patógenos entéricos (Trmcic et al., 2016; Cordier, 2013; Yoon, et al., 2016). Estas bacterias se detectan comúnmente en quesos de leche cruda fermentados o frescos, como se ha reportado anteriormente (González y Franco, 2015; Martínez et al., 2015; Hernández y Durán, 2013).

Entre los patógenos asociados a *E. coli*, responsables de brotes de enfermedad transmitida a través de alimentos, está EHEC productor de Toxina Shiga (STEC), ésta bacteria es frecuente en las heces del ganado vacuno (Miszczycha et al., 2016) por lo que varios serotipos de *E. coli* como el O157:H7 han sido aisladas de quesos de leche cruda (Bonyadian et al., 2014; Caro y García, 2007; Vernozy, et al., 2005; Stephan et al., 2008). Otros patógenos que también están relacionados con quesos artesanales son: *S. aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* especies, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Cl. perfringens* y *Yersinia enterocolitica*, *Brucella*, y *Mycobacterium tuberculosis* (Karns et al., 2005, 2007; Mendez et al., 2003; Vasek et al., 2004; Baylis et al., 2009; Caro & García 2007; Ercolini et al., 2004; Yoon et al., 2016). No se detectaron bacterias patógenas en el presente análisis, sin embargo por la presencia de *E. coli* en los quesos de Lactahuayco que prevaleció hasta el final de la maduración, se puede asumir que su consumo representa un riesgo para el consumidor.

El promedio del recuento de Coliformes totales al final de la maduración en los quesos de Jima fue de 26 UFC/ g y en los de Lactahuayco de 3.24×10^3 UFC/g; el de *E. coli* fue de 217 UFC/g en Lactahuayco, siendo negativo en los quesos de Jima. En la Norma técnica

ecuatoriana general para quesos maduros NTE INEN 2604:2012, no se menciona el número máximo permisible de Coliformes y de *E coli*, sin embargo los resultados de Coliformes y *E coli* al final de la maduración encontrados en los quesos de Llactahuayco evidencian recuentos más elevados de lo que la norma indica como máximo para *Enterobacteriaceae* ($M=10^3$ UFC/g) y para *E coli* (<10 UFC/g según NTE-INEN 1528:2012) lo que demuestra que los quesos de Llactahuayco no cumplen con las especificaciones de la norma ecuatoriana.

Las concentraciones de Coliformes encontradas al inicio de la fermentación (4 a 7 Log_{10} UFC/g) en las muestras de las dos regiones son aproximadamente similares a las reportadas por otros autores en muestras de quesos con maduración corta o frescos elaborados con leche sin pasteurizar (Hernández & Durán, 2013; Gonzáles et al., 2007; Rodríguez et al., 2015, entre otros). En el estudio realizado por Castillo et al., (2009) para evaluar la calidad sanitaria de queso crema tropical mexicano de la región de Tonalá- Chiapas, se encontró la presencia de Coliformes fecales en una concentración alrededor de 7 Log_{10} UFC/g en los quesos elaborados con leche sin pasteurizar y 6.66 Log_{10} UFC/g, en los de leche pasteurizada mediante un sistema de pasteurización abierto artesanal y Rodríguez et al., (2015) en quesos frescos artesanales de plazas de mercado Tunja Colombia, encontraron un promedio de Coliformes de 348×10^5 UFC /g y de *E. coli* $12,5 \times 10^5$ UFC/g; y en los quesos de leche cruda y pasteurizada de supermercados de Nueva York, los autores Trmcic et al., (2016) de 273 quesos analizados, encontraron una prevalencia más alta de Coliformes en quesos de leche cruda (42% con > 10 UFC / g) en comparación con los queso de leche pasteurizada (21%); una cantidad mayor se encontró en Perú en cuyo estudio sobre quesos expendidos en Lima encontraron que el 74.2% excedían la carga establecida para Coliformes, y el 58.6% excedían el límite para Coliformes fecales.(Cristóbal & Maurtua, 2003). La presencia de Coliformes y *E. coli* es un problema común de quesos de leche cruda y está estrechamente relacionada a las condiciones higiénico sanitarias aplicadas durante la elaboración y maduración de los quesos (Montel et al., 2014).

Diversidad y dinámica de los consorcios bacterianos

Los resultados de filotipaje de 16S rRNA, reveló una gran diversidad y riqueza bacteriana en las muestras analizadas en concordancia con estudios previamente realizados con la misma metodología. (Escobar et al., 2016; Ryssel et al., 2015; Alegría et al., 2012; Delcenserie et al., 2014)

El género *Lactococcus* fue dominante en los quesos de las dos regiones y aumentó durante la maduración en los de Jima (86 a 89 %) así como también en los de Llactahuayco pero con una menor proporción (34 al 51 %), *Lactococcus* ha sido reportado repetidamente como dominante, en otras investigaciones realizadas en quesos artesanales europeos (Alegría

et al., 2012; Flórez y Mayo, 2006; Dolci, et al., 2009; Gori, et al., 2013; Rysse, et al., 2015); el género *Streptococcus*, se encontró como género subdominante en los quesos de Lactahuayco y constituyó una proporción menor en los quesos de Jima (relación 10:1), lo que difiere de los trabajos realizados por los autores citados en los que éste género es reportado como dominante junto con *Lactococcus*; son también diferentes los resultados del estudio de Escobar et al., (2016) realizado en el queso mejicano Cotija, en el que la dominancia es de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella*, y también con otros estudios en los que la dominancia varía entre *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (Randazzo et al., 2006; Alegría et al., 2012; Mormile et al., 2016; entre otros). Los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus* pertenecen al grupo de las SLAB (Starter lactic acid bacteria) contaminantes naturales de la leche, que son importantes al inicio de la fermentación debido a que de su metabolismo homofermentativo depende el descenso del pH, lo que asegura la calidad microbiológica del producto al impedir el desarrollo de patógenos (Montel et al., 2014; Liu et al., 2014) y además contribuyen a la maduración mediante la producción de enzimas proteolíticas y formación de compuestos aromáticos (Morales et al., 2008).

A diferencia de otros estudios (Mormile, et al 2016, Giraffa, G. 2003; Poznanski, et al., 2004; Gaber et al., 2007; Alegría et al., 2012; Delcenserie et al., 2014) no se encontró el género *Enterococcus*, pero si se determinó la familia *Enterococaceae* en una abundancia menor al 1%; éstas bacterias están ampliamente distribuidas y provienen del intestino de los mamíferos y ambiente de elaboración (Montel, et al., 2014); la ausencia del género en las muestras de este trabajo se puede explicar por la presencia minoritaria de la familia a la que pertenece y probablemente a una inhibición provocada por la interacción con otros microorganismos ya que se ha señalado previamente que *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum* pueden inhibir a los *Enterococcus* a través de la competencia por metabolitos limitantes (Beresford et al., 2001) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produce su inhibición debido a la producción de antimicrobianos (Khemariya et al., 2013; Millette et al., 2006)

Los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* también identificados con abundancia relativa baja, por pertenecer al grupo de NSLAB (Non Starter lactic acid bacteria) no contribuyen a la acidez pero si influyen en la maduración del queso y en el desarrollo de cualidades organolépticas. (Beresford et al., 2001; Licitra & Caprino, 2012), éstas bacterias han sido consideradas importantes en las interrelaciones con otras mediante la competencia por metabolitos limitantes y en la producción de inhibidores como bacteriocinas (Beresford, 2001; Yoon et al., 2016), en cambio *Leuconostoc* que es más considerada una SLAB pueden metabolizar el citrato originando ácido acético, acetaldehído, acetoina y diacetilo, compuestos que intervienen directamente en el aroma. (Marilley et al., 2004)

La presencia de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en los quesos de Lactahuayco con una abundancia relativa considerable (41% y 18% a 30 y 60 días de maduración) en

comparación de los quesos de Jima (1.6% y 0.2% a 30 y 60 días de maduración), demuestra que la calidad microbiológica de los quesos no es buena, debido a que algunos géneros pertenecientes a ésta familia pueden estar distribuidas en el ambiente y en el intestino del hombre y de los animales, reportándose frecuentemente en quesos artesanales contaminados durante el ordeño, almacenamiento, transporte y elaboración. (González et al., 2007; Maifreni et al., 2013; Conte et al., 2015; Escobar et al., 2016; Delcenserie et al., 2014). Se ha señalado que tienen un alto potencial aromático debido a que catabolizan citrato, lípidos y proteínas y en trabajos de simulación se ha demostrado que producen un aumento de niveles de cetonas y compuestos ramificados (aldehídos, alcoholes y ésteres) (Chaves et al., 2006; Delbés, et al., 2012), sin embargo también algunas bacterias Gram-negativas puede producir aminas biogénicas (Maifreni et al, 2013;.. Marino et al., 2000) y además pueden representar un potencial de deterioro para los productos (Montel et al., 2014).

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* uno de los géneros que se detectó fue *Serratia* (4 a 7%) únicamente en los quesos de Lactahuayco, esta bacteria se ha reportado en pocos estudios sobre quesos artesanales (Trmčić et al., 2016; Irlinger et al., 2015). La presencia de la especie *Serratia marcesens* en leche cruda refrigerada se relaciona con animales enfermos de mastitis en el presente trabajo no se identificó esta especie. Otra investigación sobre *Serratia* especies, demuestra que éstas bacterias producen la enzima fitasa con características importantes como termoestabilidad, actividad a un rango adecuado de pH y capacidad de incrementar la biodisponibilidad de minerales en los vegetales, lo que es importante para su aplicación en la alimentación humana y animal (Harpreet et al., 2016). Se deduce que las bacterias encontradas tienen un importante potencial que puede ser aprovechado.

Otros géneros encontrados en menor proporción como *Meiothermus* y *Acinetobacter*, han sido reportados previamente en algunas variedades de quesos artesanales (Quigley, et al., 2013; O'Sullivan et al., 2015; Litopoulou, et al., 2011; Addis et al., 2001; Ryssel, et al., 2015).

Acinetobacter es una bacteria gram negativa microtrófica que puede ser encontrada en diferentes nichos ecológicos como ambientes humanos y animales (Al Altrouni et al., 2016), es frecuente en los productos de lechería, tiene una actividad proteolítica y lipolítica lo que le hace responsable de aroma y sabor en los quesos tradicionales (Koohi et al., 2014).

El género *Meiothermus* comprende bacterias aerobias estrictas, no halofílicas, moderadamente termofílicas y heterotróficas (Mori et al., 2012), se ha señalado que tiene la capacidad de formar biopelículas y adherirse a cualquier superficie (Raulio et al., 2008) *Meiothermus silvanus* ha sido aislada de quesos de manera esporádica (Broadbent et al, 2012).

La población bacteriana que constituye menos del 1 % de la riqueza total fue detectada y está constituida por géneros de bacterias que son específicas de cada área estudiada o de cada período de maduración; *Psychrobacter* que está solamente en los quesos de Jima en la muestra de los 30 días de maduración pertenece al grupo de bacterias psicrófilas aisladas previamente de algunas variedades de quesos (Delcenserie et al., 2014) y de leche cruda, están adaptadas a las bajas temperaturas de conservación de la leche (Montel, et al., 2014). Una especie perteneciente a este género *Psychrobacter celer* se utilizó para una simulación, inoculándola en la superficie de quesos y se determinó que es útil para promover la complejidad aromática debido a la producción de aldehídos, aminoácidos y cetonas fruto de la oxidación de lípidos, ácidos y tioésteres (Irlinger et al., 2012). *Staphylococcus* solamente estuvo en los quesos de Lactahuayco en la muestra de los 60 días de maduración, se ha señalado que están relacionados con la coloración de algunos quesos (Hoppe et al., 2004).

El género bacteriano *Brevibacterium* comúnmente asociado a la superficie de quesos pintados fué detectado a los 60 días de maduración en la muestra de Jima, ha sido estudiada previamente y se le considera asociada con el desarrollo de sabor y color de los quesos pintados (Mounier et al., 2007; Quigley et al., 2013). *Sphingobacterium* se ha aislado de la leche y de ambientes de las lecherías (Schmidt et al., 2012) y *Kocuria* bacteria psicrófila pigmentada también aislada anteriormente en quesos artesanales (Alessandria et al., 2010; Gaber et al., 2007) se detectó únicamente en las muestras de Jima a los 30 días de maduración.

En lo que respecta a especies se detectó *Escherichia coli* en los quesos de Lactahuayco en una proporción baja y disminuyó durante la maduración (de 3.9 a 1,5%), los recuentos bacterianos también mostraron disminución, pero no hasta el nivel permitido por la norma ecuatoriana; en los quesos de Jima no se detectó *E. coli* en los dos tiempos de maduración lo que se puede explicar porque en los cultivos a los 30 días el recuento fue bajo (96UFC/g) y a los 60 días se hizo negativo, cuando hay cantidades muy bajas de bacterias no es posible la detección por secuenciación. Escobar et al., (2016) reportaron *E. coli* en un porcentaje de 0.00007% en su estudio sobre el queso mejicano Cotija y establecieron que esta proporción no representa un riesgo para el consumidor, como la proporción es mayor a lo reportado en los quesos de Lactahuayco se confirma la contaminación de origen fecal de las muestras debido al empleo de leche cruda y el riesgo para la salud debido a la potencial asociación de *E coli* con patógenos como se mencionó anteriormente.

El tiempo de maduración puede determinar la composición y abundancia de la microbiota de los quesos, aun cuando la FDA establece 60 días de maduración para producir quesos de leche cruda microbiológicamente seguros, hay estudios en los que se señala que este tiempo no es suficiente para la reducción adecuada de algunas bacterias aunque otros estudios se

contraponen (D'Amico et al, 2010; Spano et al., 2003; Govaris et al., 2002), por lo que se debe tener en cuenta que existen otros factores que pueden tener efecto en la concentración de bacterias al final de la maduración como: la carga inicial, tipo de bacterias, clase de queso y condiciones ambientales (Montel et al., 2014), en este caso la carga microbiana de Coliformes y *E. coli* en los quesos de Lactahuayco fue más alta que en los quesos de Jima al inicio por lo que no se consiguió su disminución hasta niveles aceptables.

Las condiciones del entorno de producción son importantes porque pueden influir en la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7, se ha señalado que esta bacteria puede permanecer viable a la temperatura de 4 °C aunque exista una disminución de la carga durante la maduración (D'Amico et al, 2010) y que inóculos pequeños pueden alcanzar ciertos niveles después de la maduración y provocar enfermedad (Maher et al., 2001), sin embargo otros estudios indican que una prolongada maduración impide el crecimiento de STEC y que el serotipo *E. coli* O157:H7 presenta crecimiento más débil y se mantiene menos que otros serotipos (Miszczycha et al. 2013), también se ha demostrado que la expresión de virulencia de *E. coli* O157:H7 dentro de la matriz del queso puede ser alterada con el tiempo por la exposición prolongada a la sal, ácido, temperaturas y humedad bajas y por la presencia de cultivos iniciadores D'Amico et al. (2010). En vista de estos argumentos se deben realizar otras investigaciones respecto a *E. coli* principalmente en los quesos de Lactahuayco para determinar los serotipos bacterianos implicados.

Se detectaron algunos géneros bacterianos únicamente en las muestras de Lactahuayco y corresponden a los géneros *Thermomonas*, *Paracoccus*, *Hydrogenophilus*, *Anaeromyxobacter*, lo que implica especificidad con respecto al área de estudio, especificidad que también fue determinada por Bozoudi et al. (2016). Sobre éstos géneros bacterianos detectados no se ha determinado su influencia en la calidad de los quesos hasta el momento.

Dentro de las especies identificadas *Streptococcus agalactiae* representó una proporción mayor en los quesos de Lactahuayco (19.66-18,61%) con respecto a los de Jima (1.86-1,47-1%), esta bacteria estuvo presente en las muestras de ambas regiones y disminuyó en el segundo tiempo de maduración, su presencia indica un problema de mastitis en los animales que proveen la leche para la elaboración de los quesos (Phuektes, et al., 2001). Otras especies que constituyeron menos del 1% del total de la riqueza y que han sido previamente aisladas en quesos artesanales son *Lactobacillus brevis* y *L. zae* que se presentaron en las muestras de Jima y *L. paralimentarius* sólo en las de 60 días de maduración de ambas áreas estudiadas. Son especies que previamente han sido reportadas en múltiples estudios de caracterización de la microbiota de quesos artesanales (Flórez & Mayo, 2006; Mormile, et al., 2016; Poznanski, et al., 2003; entre otros) tienen un papel fundamental en la proteólisis secundaria y el desarrollo del aroma (Marilley & Casey, 2004)

Acinetobacter johsonni se reporta previamente en el estudio de quesos provenientes de tres áreas montañosas griegas encontrándose sólo en algunas de ellas (Bozoudi et al., 2016) en éste estudio se la detectó en las dos regiones y en los dos tiempos de maduración.

Las bacterias presentes en las muestras analizadas pueden tener su origen en la leche cruda que se utiliza en la elaboración de los quesos de las dos regiones, la leche según algunos estudios puede aportar bacterias como *Staphylococcus* sp., coryneformes, *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Enterococcus*, bacterias propiónicas, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp., mohos, levaduras y bacterias coliformes (Casalta et al., 2009; Gaya et al., 1987; Mallet et al., 2012; Masoud et al., 2012; Muehlherr et al., 2003); en la piel de la ubre y pezón de las vacas, las bacterias dominantes que se han aislado anteriormente son: *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Enterobacteriaceae* y *Lactococcus* (Montel et al., 2014). La mayoría de éstas bacterias se encontraron en las muestras analizadas.

En el procesamiento de los quesos en los dos lugares de estudio, se utilizan equipos y utensilios de distinta naturaleza como plástico, acero inoxidable y estantes de madera para la maduración. Las biopelículas (biofilms) que son considerados fuentes de recontaminación de la leche y que se forman en múltiples superficies como acero inoxidable elastómeros, silicones, vidrio y plásticos en general (Marchand et al., 2012), podrían estar presentes en las superficies en contacto con los quesos analizados; anteriormente se ha reportado que en la mayor parte de biopelículas de bacterias Gram negativas se han identificado bacterias como: *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, y *Pseudomonas* especies y que las biopelículas de bacterias Gram positivas están compuestas por *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, y bacterias ácido lácticas tales como *Streptococcus*, *Leuconostoc*, y *Pediococcus* (Wirtanen, et al., 2004, Teixeira, et al., 2005; Agarwal et al., 2006; Gunduz & Tuzel, 2006). Muchas de las bacterias encontradas en el presente estudio coinciden con los tipos de bacterias que generalmente integran las biopelículas.

Las instalaciones en donde se elaboran los quesos en Jima y Lactahuayco son pequeñas y no cuentan con las condiciones necesarias para un adecuado procesamiento y la aplicación algunas normas de higiene y seguridad. Debido a que el desarrollo de las biopelículas en los entornos de procesamiento aumenta la probabilidad de contaminación microbiana de los productos lácteos con bacterias patógenas y deteriorantes y dentro de las biopelículas las bacterias pueden estar protegidas de los desinfectantes por la cooperación multiespecífica y presencia de sustancias poliméricas extracelulares, es importante disponer de protocolos estrictos de limpieza y desinfección (Marchand et al., 2012). Por lo que es necesario la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura y de algunos procedimientos indispensables como un programa de limpieza y desinfección con su evaluación

correspondiente, así mismo sería importante la indagación sobre bacterias productoras de biopelículas en los equipos y herramientas que se utilizan en la elaboración de los quesos tanto en Jima como en Lactahuayco.

En la maduración de los quesos en las dos regiones se utiliza estantes de madera, los mismos que pueden ser una fuente de contaminación por microorganismos, debido a su porosidad, irregularidad y dificultad de limpieza (Montel et al., 2014) además se ha determinado previamente que las herramientas de madera utilizadas en la producción de quesos, poseen biopelículas y constituyen reservorios de microorganismos (Lortal, et al., 2008). Sin embargo las herramientas de madera como: cucharas, estantes, tinas han sido usadas desde hace cientos de años y de forma obligatoria, hasta nuestros días, en países en los que se producen quesos con Denominación de Origen Protegida (PDO), algunos productores consideran que las herramientas de madera mejoran las características organolépticas típicas del producto final; los microorganismos que se reportaron en estudios previos en instrumentos de ésta índole son *S. thermophilus*, *Lactobacillus*, leuconostocs, bacterias Gram negativas y levaduras, en la madera húmeda se reportan mohos y en la seca *Pseudomonas*. (Mariani et al., 2007; Lortal et al., 2008). En el estudio de Lortal et al., (2008) se determinó que bacterias patógenas no sobrevivieron después de limpieza y desinfección adecuada y que algunos factores influyen en este resultado como el pH ácido de la madera, temperatura a la que se somete durante el procesamiento el instrumento y a la competencia que puede provocar el *S. thermophyllus* por las bacteriocinas lo que no permite la adherencia de los patógenos, otro aspecto que se demostró es que la riqueza de especies y cepas de Bacterias Acido Lácticas aumenta a los cinco minutos de que la leche es introducida en las tinas de madera utilizadas para el ensayo (Settanni et al., 2012) y que existe una relación con el desarrollo de los microorganismos de la corteza de los quesos, además que la madera contribuye en equilibrio hídrico durante el secado del queso, aun cuando también se señala que hace falta realizar otros estudios al respecto. (Lortal, et al., 2008). En el estudio que nos compete no se detectaron bacterias patógenas pero se podría realizar futuras indagaciones para establecer el rol de la madera utilizada en la calidad de los quesos de Jima y Lactahuayco.

El análisis de diversidad alfa mostró una mayor riqueza de especies (OTU) en las muestras de Jima a los 30 días de maduración y de Lactahuayco a los 60 días de maduración, lo que significa una disminución del número de especies en los quesos de Jima y aumento en los de Lactahuayco después de la maduración, pero las muestras de Lactahuayco estuvieron mejor representadas en composición y abundancia. En cuanto a la diversidad entre las muestras de las dos regiones resultaron con menor diversidad las de Jima. Esto significa la diferente dinámica de la población microbiana en los dos sectores que se debe a múltiples factores que pueden influir en el desarrollo de los microorganismos como condiciones propias del alimento (pH, a_w , potencial redox) y los relacionados al proceso de producción como temperatura utilizada, ingredientes adicionados y las situaciones ambientales, los mismos que

determinan la supervivencia y composición final de la microbiota (Neviani y Mucchetti, 2006; Beresford et al., 2001).

La disminución de la riqueza en los quesos de Jima durante la maduración se puede explicar por las interacciones entre los microorganismos como variantes proteolíticas positivas con las variantes negativas, algunos pueden coexistir y otros son antagónicos, algunos pueden producir antimicrobianos como bacteriocinas (Smid & Lacroix, 2013), pueden competir por metabolitos limitantes, utilizar solo ciertos carbohidratos como fuentes de energía, otras bacterias son susceptibles al pH (Beresford et al., 2001). En Lactahuayco el menor número de especies a los 30 días respecto de los 60 días de maduración puede ser porque algunas probablemente fueron afectadas por la temperatura a la que se someten los quesos durante la elaboración (42 °C) disminuyendo su representatividad a los 30 días, evidenciándose un aumento de especies durante la maduración probablemente porque algunas bacterias estaban en proporciones pequeñas a los 30 días y se desarrollaron gracias a la producción de metabolitos por otras bacterias o por que encontraron condiciones favorables provistas precisamente por las bacterias iniciadoras cuyo rol es proveer un ambiente adecuado en lo que se refiere a factores de crecimiento (potencial de óxido reducción, pH, humedad) que permite la actividad enzimática y el crecimiento de la NSLAB, generalmente éstas bacterias crecen sobre productos de lisis de las bacterias lácticas iniciadoras (Beresford et al., 2001, Steele, et al., 2013), razón por la que se detectan en el segundo tiempo de maduración. Otra explicación para el aumento de especies a los 60 días, puede ser por una posible inoculación de bacterias a partir de biopelículas existentes en los utensilios empleados en diferentes etapas del procesamiento (Lortal, et al., 2008; Settanni et al., 2012). Hay que recalcar que algunas de las especies que aparecen en el segundo tiempo de maduración en los quesos de Lactahuayco son especies raras como *Methylobacterium*, *Hydrogenophilus*, *Anaeromyxobacter*, entre otras; sobre las que es necesario futuras investigaciones para establecer su papel en la calidad de los quesos. Las interacciones de los microorganismos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de las características del producto final probablemente en las características organolépticas específicas de los quesos de Jima y Lactahuayco.

Importancia y perspectivas a futuro

El secuenciamiento de última generación permitió obtener una amplia información sobre los consorcios bacterianos involucrados en la producción de los quesos de Jima y Lactahuayco lo que es de suma importancia ya que estos conocimientos servirán para obtener quesos con mayor calidad y seguridad para los consumidores.

Se consiguió determinar el tipo de bacterias presentes en los quesos y relacionar su presencia con las funciones que probablemente desempeñan en la elaboración y maduración, principalmente con el desarrollo de sus características organolépticas. Esto

permite apreciar la potencial aplicación industrial de algunas bacterias encontradas, como la liberación de enzimas importantes, útiles para incrementar su actividad en la producción o estimular el crecimiento de otras (Steele, et al., 2013), así mismo el potencial derivado de sus características bioquímicas y fisiológicas como la resistencia a la acidez y temperaturas, que puede ser aprovechado para acelerar la fermentación o para elaborar otras variedades de quesos (*Brevibacterium*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, por ejemplo).

La caracterización bacteriana también fue útil para evaluar la seguridad microbiológica de los quesos al detectar la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal y de asociación con patógenos entéricos, lo cual servirá para realizar modificaciones en el manejo de la leche como materia prima ya que es la principal fuente de contaminación de los quesos analizados, esto favorecerá a su vez el desarrollo económico de los productores al mejorar la calidad de la leche. Por otro lado servirá para emprender una gestión eficiente del proceso de producción de los quesos, para la obtención de productos inocuos, empezando por el control de la materia prima, la capacitación de los productores, implementación de buenas prácticas de manufactura, revisión y ajuste de procedimientos, entre otros.

Después de realizar las modificaciones adecuadas y la verificación del mejoramiento de la calidad de los quesos, con la divulgación pertinente se podrá estimular la confianza de los consumidores por esta clase de quesos, contribuyendo a la revalorización de los productos, y conservación de la microbiota autóctona responsable de las características organolépticas únicas de los quesos de éstas regiones.

Los datos obtenidos permitieron evidenciar el estado sanitario de los animales que proveen la leche, al determinar la presencia de bacterias productoras de mastitis (*S. agalactiae*), lo que servirá para concientizar a los productores de leche de los sectores de Jima y Llactahuayco sobre la necesidad de adoptar medidas para la prevención de ésta enfermedad y de acogerse a programas de control sanitario animal. Además servirá para que se impulse la aplicación de buenas prácticas de producción animal esto también contribuirá a la obtención de una mejor calidad de leche y redundará en beneficio para los productores.

La información obtenida es muy importante porque constituye la base para futuras investigaciones, que ayudarán a comprender de una manera más completa el ecosistema microbiano involucrado en la producción de los quesos artesanales producidos en nuestro medio, conocimientos que ayudarán de una manera certera en el control de la microbiota no deseable.

Nuevos retos en torno a esta investigación podrían ser: el análisis metabolómico que se practicaría sobre las bacterias raras y de interés industrial, para la determinación de

moléculas asociadas a características organolépticas y determinadas funciones que permitan la obtención de quesos con cualidades mejoradas y en tiempos más cortos de maduración.

Otro tema a considerar es el estudio sobre la selección de bacterias para la producción de cultivos iniciadores aunque según Escobar et al., 2016 podría ser difícil la fabricación de cultivos autóctonos por la enorme biodiversidad que determinaron al analizar el queso Cotija, por lo mismo será pertinente el emprendimiento de investigaciones para establecer la viabilidad de la propuesta que podría también orientarse a la producción de cultivos diversificados utilizando solo algunas de las bacterias autóctonas. Esta indagación daría lugar a la implementación de la tecnología adecuada para la producción de los cultivos iniciadores a escala industrial (Steel, et al., 2013). Los estudios se pueden además orientar a la selección y aplicación de bacterias para la maduración superficial de los quesos, productoras de enzimas específicas, entre otros, lo que es importante para la obtención de variedades de quesos.

Otro aspecto interesante para analizar en el futuro es el relacionado a las biopelículas involucradas en instrumentos de elaboración de los quesos especialmente los estantes de madera, lo cual sería de mucha utilidad en primera instancia para conocer las clases de bacterias, luego sus interacciones con los patógenos o con otras bacterias con el propósito de conseguir una competencia positiva o para la implementación de métodos que impidan la adherencia de las bacterias a las superficies, además conociendo la clase de bacterias de las biopelículas se puede establecer el método adecuado para su eliminación como lo indican en un estudio previo Lortal et al., (2008).

Temas que se podrían abordar y que contribuirán a la valorización de estos quesos son la determinación de los perfiles sensoriales y la caracterización de compuestos volátiles que servirán para un mejor entendimiento de la naturaleza de los quesos elaborados con leche cruda y posiblemente para potenciar los microorganismos involucrados en el desarrollo de las características de sabor de los mismos.

Un aspecto fundamental relacionado con la salud de las personas y que es importante investigar es la determinación de bacterias patógenas asociadas a *Escherichia coli* principalmente del serotipo *E. coli* O157: H7, así como también son necesarios ensayos sobre la sobrevivencia de estas bacterias a los diferentes factores relacionados con la producción de los quesos artesanales, estudios que se deberían extender a un mayor número de sectores, lo que llenaría por un lado el vacío de datos epidemiológicos que existe en la región y en el país y por otro el estudio sobre la sobrevivencia servirá para la implementar programas de desinfección efectivos. La existencia de datos epidemiológicos es importante para implementar programas de prevención a nivel de organismos como el Ministerio de Salud Pública.

Para tener una idea más completa de la microbiota implicada en la maduración de estos quesos se podría realizar estudios tendientes a la caracterización de hongos y levaduras que son microorganismos que también contribuyen en la maduración y pueden jugar un papel en el deterioro y en la producción de brotes de intoxicación por la producción de micotoxinas.

Además deben emprenderse estudios con el objetivo de explotar los beneficios potenciales de los microorganismos presentes en este tipo de productos con respecto a la salud de las personas, toda vez que teóricamente se ha argumentado que el queso tradicional está asociado a la protección de enfermedades alérgicas, y que hay relación de la microbiota presente en los quesos de leche cruda con la microbiota intestinal siendo importante el alcance de un equilibrio entre los microorganismos intestinales para evitar trastornos como se describe en la revisión de Montel et al., (2014).

Limitaciones del estudio

El filotipaje realizado únicamente con 16S rRNA, no hizo posible un análisis completo que incluya la información sobre mohos y levaduras que también son microorganismos importantes en la producción de los quesos ya sea como contaminantes de los equipos, formadores de biopelículas, productores de deterioro de los alimentos o de micotoxinas (Mariani et al., 2007; Beresford, et al., 2001).

El muestreo dirigido a la parte interna del queso no permitió obtener datos sobre la microbiota de la corteza, en estudios previos se señala que existe diferencias en las clases de microorganismos presentes en la parte interna de los quesos (Delcenserie et al., 2014; Ryssel et al., 2015; Brennan et al., 2002) y la corteza puede ser más propensa a la contaminación a partir de los estantes y entorno en el que se produce la maduración (Montel et al., 2014).

Una limitación fue el costo del análisis lo que impidió el análisis de un mayor número de muestras que incluyan otras etapas de la producción de los quesos, para evaluar de una mejor forma algunos aspectos como la dinámica de las bacterias desde el inicio de la fermentación incluyendo la leche.

La identificación de miembros de una comunidad de baja abundancia es imposible (Ercolini, 2016), lo que puede explicar el hecho de que no se detectaron algunas especies que se reportan en estudios previos sobre quesos artesanales.

La exactitud y fiabilidad de la estructura final de la microbiota alimentaria que se determina dependen del correcto ensamblaje de lecturas de las secuencias lo que es difícil cuando se trata de comunidades de diversidad media y alta, depende además de la calidad de la base de datos de referencia utilizada para establecer la taxonomía, las bases de datos suelen tener

secuencias de mala calidad y bases de datos curadas que tienen cobertura limitada (Ercolini, 2016). Es probable que los datos obtenidos no sean absolutamente exactos y no representen la biodiversidad real de los quesos estudiados, por las razones expuestas, pero a pesar de estas limitaciones, se ha podido confirmar el gran potencial de la técnica de secuenciación de alto rendimiento para el análisis de las comunidades microbianas presentes en los quesos de Jima y Lactahuayco.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que las comunidades de bacterias autóctonas de los quesos de Jima y Lactahuayco poseen una alta diversidad. Encontrándose como géneros dominantes a *Lactococcus*, y *Streptococcus* durante todo el periodo de maduración. Las principales especies bacterianas identificadas fueron: *Lactobacillus brevis*, *L. zaeae*, *L. paralimentarius*, *Acinetobacter johsonni*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

Se determinó la presencia de géneros de bacterias que no han sido comúnmente asociados a la microbiota de los quesos como: *Anaeromixobacter*, *Hydrogenophylus*, *Methylobacterium*, *Thermomonas*, *Paracoccus*, *Paenibacillus*, *Sphingobacterium* y que además son específicos a cada región, su papel en la calidad de los quesos se desconoce al momento.

La presencia de *Escherichia coli* en los quesos de Lactahuayco hasta el final de la maduración demostró la baja calidad microbiológica de los quesos, la ausencia de condiciones higiénicas durante la fabricación y el riesgo para la salud de los consumidores.

Se reveló diferencias en la diversidad bacteriana de las muestras de una misma región durante la maduración y entre las regiones estudiadas así como la especificidad frente al área de producción, demostrando la influencia de las prácticas de elaboración en la seguridad microbiológica de los quesos, en la dinámica de los microorganismos durante la maduración y probablemente la responsabilidad de los microorganismos en el desarrollo de características organolépticas en los quesos.

El conocimiento sobre los consorcios bacterianos presentes en los quesos analizados permitirá la selección de las bacterias útiles para determinadas funciones como la fermentación controlada de la superficie usando bacterias que producen pigmentaciones, que aceleran la fermentación mediante la producción de ciertas enzimas o para la preparación de cultivos iniciadores de bacterias autóctonas con características específicas que contribuirán para una producción más uniforme y para conservar las propiedades organolépticas del producto.

RECOMENDACIONES

El principal problema detectado mediante esta investigación es el relacionado con la seguridad de los productos por la presencia de la bacteria *Escherichia coli* en los quesos de Lactahuayco hasta el final de la maduración, por lo que se recomienda una rápida gestión de la calidad y seguridad del proceso de producción, para que se establezcan las medidas correctivas basadas en el análisis de la infraestructura y de todos los elementos involucrados, que principalmente deben enfocarse en la obtención de la materia prima libre de contaminación mediante la aplicación de buenas prácticas de ordeño, procedimientos estándares de sanitización así como la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) además se podría evaluar la posibilidad de incrementar el periodo de maduración y de adicionar en el proceso la termización de la leche; la organización FEEP (Fondo Ecuatoriano Populorum Progresium), que trabaja en la capacitación de estas poblaciones sería la encargada de emprender nuevas capacitaciones ya que es importante seguir trabajando hasta conseguir la concientización de los productores de leche con el objetivo de obtener mejores estándares de calidad de leche y de quesos de estos sectores. La Universidad del Azuay podría incluir dentro de sus proyectos de vinculación con la sociedad, programas de capacitación sobre higiene y control de calidad de los procesos de producción de quesos artesanales orientados a los productores de Jima y Lactahuayco.

Se recomienda el monitoreo continuo de los microorganismos en los quesos de estas dos regiones, esto ayudará a establecer los cambios en la composición microbiana que está sujeta a varios factores como los ambientales, los del proceso y del entorno en donde se desarrollan los animales que proveen la leche, entre otros. Los datos que se obtengan de la revisión constante formarán parte de la historia de los quesos y pueden contribuir a la conservación de sus características. Si bien en este país no existen quesos con denominación de origen protegido, es algo por lo que se podría optar en el futuro. Además servirá para establecer de manera continua el estado sanitario de los productos permitiendo asegurar la salud de las personas.

Es importante la continuidad de los estudios que se basen en las técnicas que se utilizaron en este trabajo que por ser robustas, facilitan la obtención de una ingente cantidad de información, por lo que deben ser aprovechadas al máximo, es necesario ir encadenando los datos obtenidos como en este caso los de la caracterización y dinámica poblacional bacteriana de los quesos, que se recomienda complementar con los de una funcionalidad bacteriana, así se podrán obtener resultados más eficientes, sobre las actividades de algunas de las bacterias encontradas, que al ser determinadas podrán explotarse para fabricar insumos para la producción de alimentos o para producir alimentos con características mejoradas, esto promoverá a su vez la implementación de tecnologías a nivel local y el desarrollo de la industria alimentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addis, E., Fleet, G., Cox, J., Kolak, D., Leung, T. (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 69, 25-36.
- Alegría, A., Szczesny, P., Mayo, B., Bardowski, J., Kowalczyk, M. (2012). Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 78(6): 1890–1898.
- Alegría, A., Alvarez, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 44–51
- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmasso, A., Civera, T., Cocolin, L., (2010). Microbiota of the Planalto de Bologna: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (12), 2211–2221.
- AlAltrouni A., Joly Guillou L., Hamze M., Kempf M. (2016). Reservoir of *Non baumannii* Acinetobacter Species. *Frontiers in Microbiology* 7, 49, 1-12
- Microbiota of the Planalto de Bologna: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (12), 2211–2221.
- Alvarado, C., Chacón, Z. Otoniel, J., Guerrero, B., López, G. (2007). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. *Revista Científica*, 17 (3), 301-308
- Agarwal, S., Sharma, K., Swanson, B., Yuksel, G., Clark, S. (2006). Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in cheddar cheese. *J Dairy Sci* 89(5), 1452–66.
- Atasoy, A. (2007). Evaluation of pH change kinetics during different stages of Kashar cheese production from bovine, ovine and caprine milk. *Journal of Food Processing and Preservation* 32, 416–428.
- Ayabaca, B., Cordero, D. (2012). Huayrapungo, desde el punto de vista etnográfico y arqueológico (Tesis de pregrado no publicada). Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias

de la Educación, Especialización de Historia y Geografía. Universidad de Cuenca. Cuenca. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/468>

- Baylis CL. (2009). Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* 62:293–307.
- Beuchat, L., Golden, D. (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43(1), 134–142.
- Bonyadian, M., Moshtaghi, H., Akhavan Taheri, M. (2014). Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and entero-aggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. *Veterinary Research Forum*, 5, 29-34.
- Bottazzi V. (1987) Aggiornamento di Microbiologia dei Batteri Lattici. Centro Sperimentale del Latte. Milano. Italia
- Bozoudi, D., Torriani, S., Zdragas, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2016). Assesment of microbial diversity of the dominant microbiota in fresh and maturaure PDO Feta cheese made at three mountainous áreas of Greece, *LWT Food Science and Technology*, 72, 525-533
- Brennan, N., Wards, A., Beresford, T., Fox P., Goodfellow M., Cogan T. (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a semear cheese. *Appied and Enviromental Microbiology*. 68, 820-83
- Broadbent, Jr., Brighton C., McMahan, D., Farkye, Y., Johnson, M. Steel J. (201). Microbiology of Cheddar cheese made with different fat contents using a *Lactococcus lactis* single-strain starter. *J. Dairy Sci.* 96, 4212–4222
- Caplice, E., Fitzgerald, F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Food Microbiology*, 50, 131-149
- Cárdenas, C., Barkla B., Wachter, C., Delgado-Olivares, L., Rodríguez, R (2014). Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy. *Food. J. Proteomics* 111: 139-147.
- Carraro, L., (2010) Caratterizzazione molecolare delle comunità batteriche coinvolte nella maturazione del formaggio Montasio D.O.P. (Tesis de doctorado no publicada). Scuola di dottorato in Scienze Veterinarie. Dipartimento di Sanità Pubblica Patologia Comparata. Università degli studi di Padova, Padova Digital University Archive. Italia. Recuperado de <http://paduaresearch.cab.unipd.it/2762/>
- Caro, I., García, M. (2007). Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 410-413.

- Casalta, E., Sorba, J.-M., Aigle, M., Ogier, J.-C., (2009). Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 243–251.
- Castillo, C., Romero, P., Leyva, G., Santos, A. (2009). Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de tonalá, chiapas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Sin mes, 111-119.
- Chaves, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., A. Serio, A., Paparella, A., Suzzi, G. (2006). Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology* 101, 353–360
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation, *Food Microbiology*, 167, 29-43
- Cocconcelli, P., Cappa, F. (2006) Studio del microbiota di formaggi tradizionali a latte crudo. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 57 (5), 345-355
- Conte F., Ravida A., Mandanici, A., Ferrantelli, V., Chetta, M., Verzera, A. (2015) Maiorchino Cheese: Physico-Chemical, Higienic and Safety Characteristics. *Italian Journal of Food Safety*. 3, 4 (1), 4352
- Cordier, J.ICMFS (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (2013) Microbiological criteria and Indicator microorganisms. En: Doyle, M. y Bchanan, R. (Editores), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th. Ed. ASM Press, Wshington, D.C. Capítulo Capítulo 4 81-90 doi: 10.1128/9781555818463
- Cristóbal, R., Maurtua, D. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Pan American Journal of Public Health*, 14(3), 158-164
- D'Amico, D.J., Donnelly, C.W. (2010). Microbiological quality of raw milk used for small scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *J. Dairy Sci.* 93, 134–147.
- Delbès C., Pochet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Bord, C., Lebecque, A., Coton, M., Desmasures, N., Coton, E., Irlinger, F., Montel, M. (2012). Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiology* 30, 74-82

- Delcenserie, V., Taminiau B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., Daube G. (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis, *Dairy Science*, 97, 6046–6056
- Díaz, G., Wacher, C. (2003). Métodos para el estudio de las comunidades microbianas en alimentos fermentados. *ALAM Latinoamericana de Microbiología*, 45 (1-2), 30-40
- Dolci, P., Barmaz, A., Zenato, S., Pramotton, R., Alessandria, V., Coccolin, L., Rantsiou, K., Ambrosoli, R. (2009). Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *Journal of Applied Microbiology* 106, 278–287.
- Dugat, E., Straub C, Teissandier A, Onésime D, Loux V, Monnet C, et al. (2015) Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses. *PLoS ONE* 10(4): e0124360. doi:10.1371/journal.pone.0124360
- Escalante, A., Barbolla, L., Ramírez, S., Eguiarte, L. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 1249-1264
- Escobar, A., Sanchez, A., Quirasco, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology* 57, 116-127
- Escobar, G., (2012). Estudio de la distribución espacial de la microbiota bacteriana en queso Cotija por la técnica de FISH (Tesis). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México. Disponible en: www.dgbiblio.unam.mx.
- Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V., & Coppola, S. (2004). PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1090-1096.
- Ercolini, D. (2016). High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Journal ASM. Org.* 79, 10 3148-3155
- Fatma, A., Hassan, M., Gawad, A., Enab, A. (2013) Flavour Compounds in Cheese (Review). *Research on Precision Instrument and Machinery*, 2, 15-29
- Flórez, A., Mayo, B. (2006). PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales Cheese. *International Dairy Journal*, 110, 165-171
- Fox, P., Wallace, J. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*. 45: 17-85.

- Gaber, E., Buchet, A., Ogier, J. (2007). Biodiversity of Bacterial Ecosystems in Traditional Egyptian Domiati Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, (4) 1248-1255
- Gagnaire, V., Piot, M., Camier, B., Vissers, J., Jana, G., Leónila, J. (2004). Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 185-201.
- Gaya, P., Medina, M., Nuntez, M., 1987. Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and Salmonellas in raw ewes'milk. *J. Appl. Microbiol.* 62, 321–326.
- Gemechu, T. (2015). Riview on latic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African Journal of Food Science*, 9 (4), 170-175
- Giraffa, G. (2003). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 251–260
- González, U., Pérez, V., Clemente, A., Mazariegos, M., Ruiz, M., Rodríguez, M. (2007). Determinación de Coliformes totales en los productos lácteos y su comparación entre dos queserías del municipio de Pijijiapan, Chiapas, México. *Bioquímica*. 32, 98
- González, L., Franco, M. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*. 18 (3), 250-257
- Govaris, A., Papageorgiou, D., Papatheodorou, K. (2002). Behavior of Escherichia coli O157:H7 during the manufacture and ripening of Feta and Teleme cheeses. *J. Food Prot.* 65:609–615.
- Gori, K., Ryssel, M., Ameborg, N., Jespersen, L. (2013). Isolation and Identification of the Microbiota of Danish Farmhouse and Industrially Produced Surface-Ripened Cheeses. *Microbial Ecology* 65(3), 602–615
- Gunduz G., Tuncel, G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*. *Int. J. Gen Mol Microbiol* 89, 3-4, 329-336
- Haiping, L, Wang, H., D'Aoust, J., Maurer, J. (2013) Foodborne patogenic bacteria. *Salmonella* Species. En: Doyle, M. y Bchanan, R. (Editores), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th. Ed. ASM Press, Wshington, D.C. Capítulo 10, 225-261
- Harpreet, Kaur, Raiveer Singh, Harcharan Singh, Vinod Kurmar. (2016) Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desiderable characterisctcs for food and feed aplicacions. *Journal Biotech*, 6 (1), 64

- Hayaloglu, A., McSweeney, P. (2014). Primary Biochemical Events During Cheese Ripening. En: Taylor and Francis Editores. *Dairy Microbiology and Biochemistry*. 7, 134-166. DOI: 10.1201/b17297-8
- Hernández, N., Durán, T. (2013). Calidad sanitaria de los puntos iniciales de proceso de manufactura de queso. *Horizonte Sanitario*, 12, (2), 58-62
- Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W., Geis, A., Heller, K. (2004). Molecular Identification and Differentiation of *Staphylococcus* Species and Strains of Cheese Origin System. *Appl. Microbiol.* 27, 211–218
- Irlinger, F., Yuen In Yung, A., Sarthou, A., Delbès, C., Montel, M., Coton, E., Coton, M., Hélinck, S. (2012). Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 153, 332–338
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., Bony, E. (2015). Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *Journal FEMS Microbiology Letters*, 362, 1-15.
- Johnson, M. Steele, J. (2013) Fermented Dairy Products. En: Doyle, M. y Buchanan, R. (Editores), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th. Ed. ASM Press, Washington, D.C. Capítulo 32, 825-836. doi: 10.1128/9781555818463.ch32
- Kabak, B., Dobson, A. (2011). An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Food Science and Nutrition*, 51(3), 248-260
- Karns, J., Van, J., McClusky, B., Perdue, M. (2007) Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E.coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science* 90(7):3212-3219.
- Karns, J., Van, J., McCluskey, B., Perdue, M. (2005) Prevalence of *Salmonella enterica* in bulk tank milk from US dairies as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science* 88(10):3475-3479.
- Kergourlay, G., Taminiou, B., Daube, G., Champomier, M. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*, 213 31–39
- Koohi, M., Bari, M., Mehrnoosh, F., Abad, M. (2014) A research on existence and special activities of *Acinetobacter* in different cheese. *Intenational Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2 (2) 517-525.

- Khemariya, P., Singh, S., Nath, G., Gulati A. (2013). Insolation, Identification, and Antibiotic Susceptibility of *Lactococcus lactis* from Dairy and Non dairy Sources. *Czech J. Food Sci*, 31 (4), 323-331
- Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutsinas, L., Kontominas, M., G, Samelis, J. (2006) Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. *Food Microbiology*, 23 268–276
- Lortal, S., Licitra, G., Valence, F. (2012). Wooden Tools: Reservoirs of Microbial Biodiversity in Traditional Cheesemaking. *Microbial Spectrum*, 2(1) 1-8
- Licitra, G., Caprino, S. (2012). The Microfloras and Sensory Profiles of Selected Protected Designation of Origin Italian Cheeses. *Microbiology Spectrum*, 2(1), 1-12
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. (2011). Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research* 101:17-339 32. 340
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. En: Zhang, H. y Cai, Y. (Editores), *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice*, Capitulo 2, 103-203. DOI: 10.1007/978-94-017-8841
- López, A. (2011). Diversidad de la microbiota fúngica del queso paipa fabricado en Pacho, Cundinamarca. *ION*, 24(1), 77-84
- Lozupone, C., Lladser, M., Knights, D., Stombaugh, J., Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME Journal* 5, 169-172
- Maifreni, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., Inocente, N., Biasutti, M., and Marino, M. (2013). Identification of the *Enterobacteriaceae* in Montasio cheese and assessment of their amino acid decarboxylase activity. *Journal of Dairy Research*. 80 (1), 122-127.
- Maher, M., Jordan, K., Upton M., Coffey A. (2001) Growth and survival of *E. coli* O157: H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 90, 201—207
- Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J., Notz, E., Carnet, A., Eyoug RN., Oulahal, N. (2007). Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. *J. Dairy Sci* 90, 1653-1661
- Marilley, L., Casey, M. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Food Microbiology*, 90, 139-159

- Marino, M., Maifreni, M., Rondini, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 229, 133-14
- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S., Rondinini, G., (2000). The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenicamines in cheese. *Applied Microbiology* 31, 169-173.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Herman, L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive reviews in food science and Food Safety*, 11, (2) 133-147
- Martínez, K., Hernández, M., Recino, B., Gonzáles, N., Jiménez, R. (2015).Tiempo de maduración y perfil microbiológico del queso de poro artesanal. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2 (5), 15-24
- Masoud, W., Vongensen F., Lillevang S., Al- Soud, W., Sorensen, J., Jakobsen M. (2012) The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 153, 192–202
- McSweeney, P. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, (2/3), 127-144
- McSweeney, PLH., Sousa, M. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review, *Lait* 80, 293–324.
- Millete, M., Dupont, C., Archambault, D., Lacroix M. (2006). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 274–282
- Miszczycha, S., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus, F., Montel, M., Thevenot, D. (2013). Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes in Various Experimentally Contaminated Raw-Milk Cheeses contaminated Raw-Milk Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* ,79 (1), 150-158
- MIPAF Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali. (2006). Valorizzazione e salvaguardia della microflora lattica autoctona presente in formaggi tradizionali italiani. *Sci Tecn Latt-Cas*. 57(5), 301-308.
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza, 84 pp.

- Mounier, J., Rea, M., O'Connor, P., Fitzgerald, G., Cogan, M. (2007). Growth Characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. Isolated from Surface-Ripened Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7732-7739.
- Montel M., Buchin, S., Mallet, A., Delbes, C., Vuitton, D., Desmasures, N., Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177, 136–154
- Montville, T., Matthews, K. (2013) M Physiology, Growth, and Inhibition of Microbes in Food. En: Doyle, M.y Bchanan, R. (Editores), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th. Ed. ASM Press, Wshington, D.C. Capítulo 1, 3-18
- Morales, P., Fernández, E., Gaya, P., Nuñez, M. (2008). Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* , 127,168–171
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P., Núñez, M. (2003). Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese. *Int. Dairy J.* 13: 201–209.
- Mori, K., Takao, L., Ishibashi, J., Kimura, H. (2012). *Mehiothermus hypogaeus* sp. Nov. A moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62, 112–117.
- Mormile, A., (2011). Studio della microflora lattica autoctona del Pecorino di Tramonti: un formaggio artigianale prodotto nel territorio del Parco Regionale dei Monti Lattari. (Tesis de Doctorado no publicada) Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli studi di Napoli Federico II. Napoli. Italia. Recuperadode: http://www.fedoa.unina.it/8625/1/Mormile_Amalia_24.pdf
- Mormile, A., Barile, M., & Raffaelina Mercogliano, R., Johansson, P., Björkroth, K., Aponte, M., Murru, N. (2016) Dynamics of lactic acid bacteria in “Pecorino di Tramonti”—a ewe's milk cheese—with particular emphasis on enterococci: a preliminary study *Ann Microbiol* (2016) 66:179–185, DOI 10.1007/s13213-015-1094-1
- Mucchetti G., Neviani E. (2006). *Microbiologia e Tecnologia Lattiero-Casearia, Qualità e Sicurezza*. Tecniche Nuove Editore. Italia
- Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J.E., Stephan, R., (2003). Microbiological Quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.* 86, 3849–3856
- Neviani, E., Mucchetti, G. (2006) *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza*.

- Neviani, E., De Dea Lindner, J., Bernini, V., Gatti, M. (2009). Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural médium. *Food Microbiology* 26, 240–245
- Neviani, E., Bottari, B., Lazzi, C., Garri, M. (2013) New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. *Frontiers in Microbiology*, 4 (36), 1-14
- Nsofor, N., Frank, J. (2013) Microbial spoilage and public health concerns: Milk and Dairy Products. En: Doyle, M.y Bchanan, R. (Editores), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th. Ed. ASM Press, Wshington, D.C. Capítulo 10, 169-179
- NTE-INEN 1528:2012 Norma Técnica Ecuatoriana para queso fresco
- NTE INEN 2604:2012 Norma Técnica Ecuatoriana general para quesos maduros
- O'Sullivan, D., Cotter, P., O' Sullivan, O., Giblin, L., McSweeney, P., Sheehan, J. (2015). Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a Continental-type cheese. *Applied and Environmental Microbiology* . 81 (7), 2525-2533
- Pandey, P., Ramaswamy, H., St-Gelais, D. (2003). Evaluation of pH change kinetics during various stages of Cheddar cheese-making from raw, pasteurized, micro-filtered and high-pressure-treated milk. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 36,497–506
- PDOT-Ingapirca (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia Ingapirca Actualización, (2015-2019) Recuperado de http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/0360017390001_PD YOT%20Ingapirca,%20Oct%2027-2015%20Sin%20Mapas_28-10-2015_23-37-43.pdf
- PDOT-Sigsig (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del cantón Sigsig actualización, 2014) Recuperado de: http://app.sni.gob.ec/visorseguimiento/DescargaGAD/data/sigadplusdiagnostico/PDO T%20SIGSIG%202014_15-11-2014.pdf
- Pogačić, T., Samaržija D., Corich, V., D'Andrea, M., Kagkli, D., Giacomini, A., Čanžek Majhenič A., Rogelj, I. (2010). Microbiota of Karakačanski skakutanac, an artisanal fresh sheep cheese studied by cultureindependent PCR-ARDRA and PCR-DGGE *Dairy Science Technology*, 90, 461–468
- Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 141– 151

- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford T, Ross R, Fitzgerald G, Cotter P. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS 177 Microbiology Reviews* 37:664-698.
- Ramos, B., Bucio, A., Bautista, C., Aranda, E., Izquierdo, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y Ciencia*, 25(2), 159-171. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v25n2/v25n2a6.pdf>
- Randazzo, C., Caggia, C., Neviani, E. (2009). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J Microbiol Methods*. 78(1):1-9.
- Randazzo, C., Vaughan, E., Caggia, C., (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology* 109, 1–8.
- Raulio, M., Järn, M., Ahola, J., Peltonen, J., Rosenholm, J.B., Tervakangas, S., Kolehmainen, J., Ruokolainen, T., Narko, P., and Salkinoja-Salonen, M. (2008) . Microbe repelling coated stainless steel analysed by field emission scanning electron microscopy and physicochemical methods. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35 (7), 751-760
- Ray, R., Joshi, V. (2014) Fermented Foods: Past, Present and Future. ICAR- Central Tuber Crops Research Institute. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/268740847>
- Ray, B., Bhunia, A. (2010). Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. 4ª. Edición. McGraw Hill. México. p 73-74
- Ray, B., Bhunia, A. (2010). Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. 4ª. Edición. McGraw Hill. México. p 246-250
- Rizo, J., Cárdenas, C., Rodríguez, R. (2014). Los Alimentos: una Aproximación Proteómica en su Estudio. *BioTecnología*, 18 (3), 30-45
- Ross, R., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Food Microbiology*, 79, 3-16
- Rodríguez, J., Borrás, L., Pulido, M., García, D. (2015). Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja, Colombia. *Revista cubana de Higiene y Epidemiología*, 53, (3)
- Ryssel, M., Pernille, J., Al-Soud, W., Sørensen, S., Arneborg, N., Lene Jespersen, L. (2015). Microbial diversity and dynamics throughout manufacturing and ripening of

- surface ripened semi-hard Danish Danbo cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 215, 124–130
- Schmidt, V., Wenning, M., Scherer, S. (2012). *Spingobacterium lactis* sp. nov. and *Spingobacterium alimentarium* sp. nov., isolated from raw milk and a dairy environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62, 1506–1511
- Smid, E., Lacroix, C. (2013). Microbe-Microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology, Food Biotechnology*. 24- 148-154.
- Settani, L., Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits *Food Microbiology*, 27(6), 691-697
- Settanni, L., Di Grigoli, A., Tornamb_e, G., Bellina, V., Francesca, N., Moschetti, G. Bonanno, A., (2012). Persistence of wild *Streptococcus thermophilus* strains on wooden vat and during the manufacture of a traditional Caciocavallo type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 155 (1-2), 73-81.
- Steele, J, Broadbent, J., Kok, J. (2013). Perspectives on the contribution of laticid bacteria to cheese flavor development. *Current opinion in Biotechnology. Food Technology*. 24,
- Sieuwerts, S., De Bok, F., Hugenholtz, J., Van Hylckama Vlieg, J. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl Environ Microbiol* 74:4997–5007.
- Smit G., Smit B. A., Engels W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591–610.
- Sousa, M., Ardo, Y., McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis in cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327–345.
- Spano, G., E. Goffredo, L. Beneduce, D. Tarantino, A. Dupuy, S. Massa. (2003). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of mozzarella cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:73–76.
- Stephan, R., Schumacher, S., Corti, S., Krause, G., Danuser, J., Beutin, L. (2008). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J. Dairy Sci.* 91, 2561–2565.
- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R., Vieira, M.J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiol* 22(2–3), 247–51.

- Trmčić, A., Chauhan, K., Kent, D., Ralyea, R., Martin, N., Boor, K., Wiedmann M. (2016). Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *J. Dairy Sci*, 99, 6105-6120
- Vasek, O., Cabrera, R., Coronel, G., Giori G., Fusco, A. (2004). Analisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de Corrientes Argentina. *Facena*, 20, 13-22
- Vernozy-Rozand C, Montet MP, Berardin M, Bavai C, Beutin L. (2005). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:235–241.
- Walstra, P., Wouters, J., Geurts. T. (2006) Dairy science and technology. CRC Press, New York, EU. 140-155
- Widyastuti, Y., Rohmatussolihat, Febrisiantosa, A. (2014). The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 435-442
- Wirtanen G. (2004). Hygiene control in Nordic dairies, Vol. 545. ESPOO: VTT Publication. 147–62.
- Yoon, Y., Lee, S., Choi, K. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201-215

ANEXOS

Anexo 1. Etapas del proceso de elaboración de los quesos

Recepción de materia primas. La leche es recolectada en el centro de acopio de la asociación, aquí se procede a medir la cantidad o volumen de leche a ser procesada.

Control de calidad. Los parámetros que se controlan para proceder al procesamiento son temperatura, densidad, acidez y mastitis.

Filtrado. La leche se filtra pasándola a través de un lienzo, este proceso es fundamental para eliminar cualquier contaminación física que pueda contener la leche.

Termizado. La leche es calentada a una temperatura de 38°C, temperatura ideal para la actuación del cuajo.

Cuajado. Se adiciona cuajo en polvo diluido en agua para mejorar su distribución, se agita suavemente por un tiempo de 3 minutos y se deja reposar por un tiempo de 45 minutos aproximadamente, hasta que el gel caseína- agua se encuentre estable para el corte.

Cortado. Para el cortado se utiliza una lira con una abertura de hilo de 1.0cm. de distancia, se corta varias veces de manera uniforme.

Primera agitación. Con una pala de acero inoxidable se agita la cuajada lentamente hasta obtener unos glóbulos de cuajada uniforme.

Desuerado. Se procede a desuerar un 30% del volumen inicial.

Cocción y segunda agitación. Con la finalidad disminuir aún más la humedad del grano se procede a cocinar la cuajada lentamente hasta llegar a una temperatura de 42°C, mientras tanto, se va agitando de manera más rápida conforme la dureza del grano aumenta.

Desuerado final. Una vez que la masa ha ganado peso se procede a sacar la mayor cantidad de suero de la tina quesera.

Moldeado. La cuajada se coloca en los moldes redondos de acero inoxidable de 500g, una vez colocada toda la masa en los moldes se los voltea y deja por un tiempo de unos 10 minutos que acaben de desuerar, y luego se los coloca en planchas de acero inoxidable y se los apila en la prensa.

Prensado. Se prensa los quesos por un tiempo de 60 minutos con una fuerza del doble de su peso y luego se los voltea para terminar el proceso de prensado por un tiempo de 60 minutos más, se los saca de los moldes se igualan las puntas y se transportan al tanque de salmuera.

Salado. Se colocan los quesos en un tanque de salmuera a 20°Be y temperatura de 15°C por un tiempo de 2 horas, terminado este tiempo se vuelven a colocar en las tablas de acero inoxidable y se transportan a la sala de maduración.

Madurado. Los quesos se maduran a la temperatura ambiente de la zona en tablas de madera por dos meses; durante este tiempo los quesos se voltean todos los días y cuando sea necesario se limpian con una solución de salmuera al 20%

Empacado. Los quesos se empacan en bolsas de polietileno de grado alimenticio en presentaciones de 250 g.

Anexo 2. Técnica para extracción de DNA mini kit Thermo Fisher scientific

Reactivos:

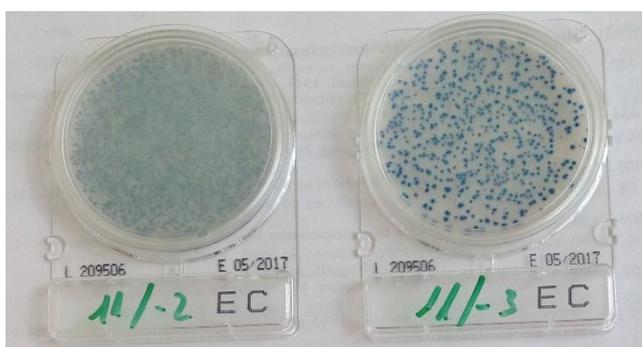
Nitrógeno líquido

Purelink Genomic DNA minikit

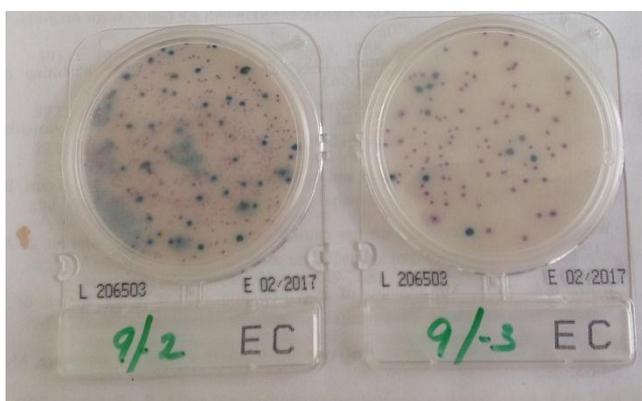
Etanol 96% frío

1	Pesar la muestra alrededor de 25 mg en condiciones de esterilidad colocar en un sobre de papel aluminio
2	Sumergir el sobre en nitrógeno líquido
3	Transferir la muestra a un tubo de 2ml con 12 perlas de zirconio, previamente enfriado en nitrógeno líquido
4	Homogenizar por 1 minuto en Tissuelyzer a 50 oscilaciones por segundo
5	Enfriar nuevamente en nitrógeno líquido por 30 segundos
6	Repetir 5 veces los pasos 4 y 5
7	Añadir 180 µl de "Digestion Buffer"
8	Añadir 20 µl de "Proteinasa K"
9	Vortex 10seg
10	Incubar a 55 °C durante 2 horas agitando en vortex cada 30 minutos
11	Centrifugar 5 minuto a 10000 g
12	Transferir el sobrenadante a otro tubo de 2 ml
13	Añadir 200 µl de "Binding Buffer"
14	Vortex 10 seg
15	Añadir 200 µl de etanol 96 % frío
16	Vortex 10seg
17	Transferir el contenido del tubo a una columna de purificación
18	Centrifugar 1 minuto a 10000 g
19	Añadir 500 µl de "Buffer 1"
20	Centrifugar 1 minuto a 10000 g
21	Añadir 500 µl de " Buffer 2"
22	Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad
23	Transferir la columna a un nuevo tubo de 2 ml
24	Añadir 50 µl de " Elution Buffer"
25	Incubar 1 minuto a temperatura ambiente
26	Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad
27	El tubo debe contener DNA

Anexo 3. Placas Compact Dry del recuento de Coliformes y *E. coli*



Muestras de Lactahuayco



Muestras de Jima

Anexo 4. Sitios de procesamiento de los quesos

Llactahuayco



Jima



Procesamiento



Quesos Jima



Quesos Lactahuayco

