



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
MICROORGANISMOS AUTOCTÓNOS DEL QUESO ARTESANAL DE  
RAYÓN CHIAPAS, PARA SU USO EN QUESO HECHO CON LECHE  
PASTEURIZADA**

**JUAN CARLOS DURÁN MOLINA**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2016

La presente tesis, titulada: **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS DEL QUESO ARTESANAL DE RAYÓN CHIAPAS, PARA SU USO EN QUESO HECHO CON LECHE PASTEURIZADA** realizada por el alumno Juan Carlos Duran Molina, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO.  
CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:   
\_\_\_\_\_  
DR. ADOLFO BUCIO GALINDO

ASESORA:   
\_\_\_\_\_  
DRA. CONSUELO DEL C. BAUTISTA MUÑOZ

ASESOR:   
\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ ANDRÉS HERRERA CORREDOR

ASESOR:   
\_\_\_\_\_  
DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JUÁREZ

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 29 DE FEBRERO DEL 2016

## RESUMEN.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar a las bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras presentes en el queso artesanal tradicionalmente elaborado con leche cruda, y evaluar su uso para elaborar queso tipo artesanal con leche pasteurizada. Se aislaron 19 cepas de BAL y 25 cepas de levaduras; y fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y de secuenciación del gen que codifica para el 16S ADNr (BAL) y del gen 18S ADNr (levaduras). De 19 cepas de BAL, se identificaron ocho especies de *Lactobacillus plantarum*, siete especies de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, dos especies de *Lactobacillus fermentum* y dos especies de *Lactobacillus helveticus*. De 25 cepas de levaduras se identificaron 11 especies de *Kluyveromyces lactis*, cinco especies de *Kluyveromyces marxianus*, cuatro especies de *Saccharomyces cerevisiae*, dos especies de *Candida orthopsilopsis*, dos especies de *Devariomyces hansenii*, y una especie de *Torulaspota delbrueckii*. Las 19 cepas de BAL y 25 cepas de levaduras fueron evaluadas para elaborar quesos con leche pasteurizada, mediante un estudio sensorial con consumidores utilizando el método del perfil ideal (IPM) en base a nueve atributos sensoriales: Tono crema, Intensidad de olor, Dureza al tacto, Dureza en boca, Salado, Amargo, Ácido, Elástico y Olor a establo, usando como referencia al queso artesanal. El perfil entre los tratamientos fue parecido al artesanal y con la ventaja de estar elaborados con leche pasteurizada además de ser bien aceptados por los consumidores. El ideal imaginario fue consistente entre los consumidores. No hubo diferencias significativas en los atributos de intensidad de sabor y olor en relación con el queso artesanal, si hubo diferencias en los atributos de dureza en boca y dureza al tacto. La fabricación de quesos con leche pasteurizada es viable y puede ser una alternativa para los consumidores que no tienen preferencia por los quesos fabricados con leche cruda.

**Palabras clave:** Bacterias ácido lácticas, levaduras 16S rDNA, 18S rDNA, queso artesanal, cultivos iniciadores, IPM.

## ABSTRACT.

The aim of this study was to characterize the lactic acid bacteria (LAB) and yeast in the traditional artisan cheese made from raw milk, and evaluate its use to produce artisan cheese from pasteurized milk. 19 LAB strains and 25 yeast strains were isolated, they were characterized by sequencing and biochemical tests gene encoding the 16S rDNA (BAL) and 18S rDNA gene (yeasts). 19 BAL strains, *Lactobacillus plantarum* eight species, *Leuconostoc pseudomesenteroides* seven species, *Lactobacillus fermentum* two species and *Lactobacillus helveticus* two species were identified. 25 yeast strains, *Kluyveromyces lactis* 11 species, *Kluyveromyces marxianus* five species, *Saccharomyces cerevisiae* four species, *Candida orthopsilopsis* two species, *Debaryomyces hansenii* two species, and *Torulasporea delbrueckii* one species were identified. The 19 strains of LAB and 25 yeast strains were evaluated to make cheese from pasteurized milk by a sensory study with consumers using the method of ideal profile (IPM ) based on nine sensory attributes: Tone cream, odor intensity, Hardness touch, hardness in the mouth, salty, bitter, acid, elastic and odor stable, using as a reference to artisanal cheese. Profile between treatments was similar to craft and with the advantage of being made from pasteurized milk as well as being well accepted by consumers. The imaginary perfect was consistent among consumers. There were no significant differences in the attributes of taste and odor intensity relative to the artisanal cheese. There were differences in the attributes of hardness and toughness mouth feel. The manufacture of cheese from pasteurized milk is feasible and can be an alternative for consumers who do not have a preference for cheeses made from raw milk.

**Keywords:** Lactic acid bacteria (LAB), yeast, 16S rDNA, 18S rDNA, artisanal cheese starter cultures, IPM.

## DEDICATORIA.

### ***Principalmente a Dios.***

Por regalarme la vida, por permitirme realizar este proyecto tan importante en mi formación profesional, por la fortaleza que me da cada día y por estar a mi lado siempre.

### ***A mis padres.***

Por haberme educado y soportar mis errores. Gracias a sus consejos y por el amor que siempre me han brindado.

### ***A mis hijos.***

Porque son el motor que me impulsa a seguir cada día y porque son el regalo más hermoso que me dio Dios.

### ***A mi esposa.***

Compañera y cómplice que me dio ánimo, fuerzas y todo su apoyo incondicional para seguir con este proyecto, te amo Martha Alicia.

### ***A mis hermanos.***

Porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo incondicional y por su amistad.

### ***A la familia Gómez Camarillo.***

Porque siempre he contado con ellos, por sus consejos, por su amistad y por permitirme ser parte de ustedes, especialmente a Mamita Mayra.

### ***A mis amigos.***

Por su valiosa amistad, consejo, apoyo y por los momentos compartidos (Carlos Zúñiga, Hugo Mendoza, Rubiel Morales, Gisela Cruz, Sandra Atondo y Liliana Reyes.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme realizar esta investigación y por su infinito amor y bondad.

A **México mi país**, que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me otorgó la beca para estudiar la maestría en ciencias de los alimentos e ingeniería en el Programa de Producción Agroalimentaria en el Trópico (PROPAT).

Al **Colegio de Posgraduados Campus Tabasco** por permitirme realizar mis estudios de postgrado dentro del PROPAT.

Al **Dr. Adolfo Bucio Galindo** por transmitirme sus enseñanzas con paciencia y bondad, por todo su apoyo incondicional, buenos consejos y dirigir el desarrollo de la tesis.

Al **Dr. José Andrés Herrera Corredor** por su apoyo, orientación y dirección de la parte de análisis sensorial de la tesis.

A la **Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz** por sus consejos orientación y dirección de la parte de identificación molecular en este proyecto de investigación.

Al **Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez** por sus valiosas aportaciones para mejorar la presente investigación.

A mi **esposa e hijos** por su apoyo incondicional y por soportar mi ausencia durante la realización de este proyecto.

A **mis compañeros y amigos de generación otoño 2013** con quienes compartí excelentes momentos.

## INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN .....	1
2	OBJETIVOS .....	3
	2.1. Objetivo general .....	3
	2.2. Objetivos particulares.....	3
3	HIPÓTESIS .....	3
4	REVISION DE LITERATURA.....	4
	4.1. Definición de queso.....	4
	4.2. Tipos y clasificación de los quesos.....	4
	4.3. Quesos artesanales .....	5
	4.4. Queso Chiapas .....	6
	4.5. Análisis de la Composición química del queso.....	7
	4.6.1. Bacterias ácido lácticas (BAL). .....	9
	4.6.2. Género <i>Leuconostoc</i> .....	11
	4.6.3. Género <i>Lactobacillus</i> .....	12
	4.6.4. Levaduras .....	13
	4.7. Cultivos de microorganismos para elaborar quesos.....	14
	4.7.1. Cultivos iniciadores. ....	16
	4.7.2. Bacterias ácido lácticas no iniciadoras (BAL-NI). ....	17
	4.8. Evaluación sensorial. ....	18
	4.8.1. Tipos de pruebas sensoriales .....	18
	4.8.2. Pruebas afectivas.....	19
	4.8.3. Pruebas discriminativas .....	19
	4.8.2. Las pruebas descriptivas .....	19
	4.9 Análisis de textura. ....	21
	4.9.1 Medición de textura .....	22
	4.9.2 Análisis del perfil de textura .....	23
5	MATERIALES Y METODOS.....	27
	5.1. Aislamiento de BAL y levaduras por el método de diluciones. ....	27
	5.2. Pureza y caracterización de cepas de BAL. ....	28
	5.3. Caracterización bioquímica de las cepas de BAL y levaduras aisladas.....	28
	5.4. Identificación de las cepas de BAL y levaduras aisladas por análisis de la secuencia de genes ADN <sub>r</sub> y RAPD.....	29
	5.4.1. Extracción de ADN de las BAL y levaduras.....	29
	5.4.2. Amplificación del gen 16S ADN <sub>r</sub> de BAL por la técnica de PCR.....	30
	5.4.3. Amplificación del gen 18S ADN <sub>r</sub> de levaduras por la técnica de PCR.....	30
	5.4.4. Electroforesis del ADN.....	31

5.4.8. Análisis del Polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD).....	32
5.5. Evaluación de BAL y levaduras aisladas del queso crema artesanal .....	33
5.5.1. Inoculación de la leche pasteurizada con las cepas de BAL y levaduras aisladas .....	33
5.6. Análisis fisicoquímico del queso crema artesanal. ....	35
5.6.1. Humedad.....	35
5.6.2. Contenido de sal (NaCl).....	36
5.6.3. Acidez.....	36
5.6.4. Determinación de pH .....	37
5.6.5 Actividad de agua (Aw) .....	37
5. 7. Textura del queso crema .....	37
5. 8 Esfuerzo cortante. ....	38
5.9 Resistencia a la penetración.....	38
5.10 Color.....	39
5.11. Evaluación sensorial. ....	40
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
6.1 Aislamiento y purificación de las BAL y levaduras a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas. ....	42
6.2. Características bioquímicas de las BAL. ....	44
6.3 Análisis de RAPD de las cepas de BAL.....	46
6.4 Identificación de las cepas de BAL por análisis de la secuencia del gen ADNr.....	47
6.5 Características bioquímicas de las cepas de levadura.....	52
6.6 Análisis de RAPD de las cepas de levadura. ....	53
6.7.1. Relaciones de homología entre las secuencias codificantes de genes 18S DNAr de cepas de levadura aisladas a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas y otras y otras levaduras previamente descritas. ....	57
6.8 Análisis de la calidad de la leche bronca. ....	59
6.9 Evaluación fisicoquímica de los quesos. ....	59
6.10. Características de color de los quesos para los 5 tratamientos. ....	60
6.11 Perfil de textura. ....	61
6.12. Esfuerzo cortante y resistencia a la penetración .....	63
6.13. Evaluación sensorial. ....	63
7 CONCLUSIONES. ....	72
8 RECOMENDACIONES. ....	73
9 BIBLIOGRAFIA. ....	73
10 ANEXOS. ....	79



## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los quesos .....	4
<b>Tabla 2</b> Composición química del queso crema de Chiapas. ....	8
<b>Tabla 3</b> Clasificación del género de Lactobacillus. ....	12
<b>Tabla 4.</b> Géneros de levaduras encontrados en quesos.....	14
<b>Tabla 5.</b> Funciones de los cultivos microbianos iniciadores.....	15
<b>Tabla 6.</b> Ejemplos de tipos de pruebas sensoriales.....	20
<b>Tabla 7.</b> Términos y definiciones de TPA.....	27
<b>Tabla 8.</b> Aleatorización de los tratamientos.....	41
<b>Tabla 9.</b> Configuración de la prueba. ....	42
<b>Tabla 10.</b> Recuento de BAL y levaduras del queso artesanal de Rayón, Chiapas. ....	43
<b>Tabla 11.</b> Características bioquímicas de las cepas de BAL aisladas del queso crema artesanal de Rayón, Chiapas.....	45
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de identidad de las secuencias del gen 16S ADNr de las cepas de BAL aisladas con las secuencias de referencias de los parientes más próximos.....	49
<b>Tabla 13.</b> Características bioquímicas de las cepas de levadura aisladas del queso artesanal de Rayón, Chiapas. ....	52
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje de identidad de las secuencias del gen 18S ADNr de las cepas de levadura aisladas con las secuencias de referencias de los parientes más próximos. ....	56
<b>Tabla 14.</b> Análisis fisicoquímicos y de calidad sanitaria de la leche bronca. ....	59
<b>Tabla 15</b> Composición química promedio del queso en los 5 tratamientos.....	60
<b>Tabla 16.</b> Parámetros de color del queso artesanal de Rayón, Chiapas y de queso elaborado con leche pasteurizada.....	61
<b>Tabla 18.</b> Determinación de esfuerzo cortante y resistencia a la penetración.....	63
<b>Tabla 19.</b> Resultados demográficos y preferencias de consumo de queso de la población encuestada. ....	64
<b>Tabla 20.</b> Análisis de regresión logística, para predecir la aceptación general y por tratamiento del queso de Chiapas*.....	68
<b>Tabla 21.</b> Análisis de regresión logística (LRA) en general y por tratamientos para predecir la intención de compra*.....	70
<b>Tabla 22.</b> Evaluación de la intención de compra con la prueba de MCNEMAR. ....	71

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Clasificación natural de los quesos de acuerdo al agente de maduración utilizado y su firmeza. Fuente: (Gunasekaran y Ak, 2003). .....	5
<b>Figura 2.</b> Diagrama general para la elaboración del Queso Crema de Chiapas. Fuente: Villegas <i>et al.</i> (2011).....	7
<b>Figura 3.</b> Bacterias lácticas y otros géneros cercanos. Fuente: (Axelsson, 2004) .....	11
<b>Figura 4.</b> Ejemplo de aplicación del método IPM (Varela y Ares, 2014).....	21
<b>Figura 5.</b> Procedimiento original para evaluar la textura de los alimentos Fuente: (Gunasekaran y Ak, 2003).....	24
<b>Figura 6.</b> Esquema de análisis de perfil de textura fuerza-tiempo (o deformación). Fuente: (Gunasekaran y Ak, 2003).....	25
<b>Figura 7.</b> Determinación del perfil de textura, empleando el Texturómetro (Texture Analyzer, marca Zhimadzu modelo EZ-S). (A) Toma de muestra y (B) Texturómetro. ....	38
<b>Figura 8.</b> Determinación del esfuerzo cortante, empleando el Texturómetro (Texture Analyzer, marca Zhimadzu modelo EZ-S). (A) Toma de muestra y (B) Texturómetro. ....	38
<b>Figura 9</b> Determinación de la resistencia a la penetración, empleando el Texturómetro (Texture Analyzer, marca Zhimadzu modelo EZ-S). (A) Toma de muestra y (B) Texturómetro.....	39
<b>Figura 10.</b> Determinación de color empleando el colorímetro de reflexión, marca Hunter Lab, Modelo Miniscan (USA). (A) Escala cromática L, a y b del colorímetro; (B) Colorímetro Hunter Lab. ....	40
<b>Figura 11.</b> Aislamiento y purificación de cepas de BAL a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas. (A) Aislamiento, (B) Purificación y (C) Morfología microscópica de bacilos de la cepa JCABB13, Aumentada a 1000x. ...	43
<b>Figura 12.</b> . Aislamiento y purificación de cepas de levaduras, a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas. (A) Aislamiento, (B) Purificación y (C) Morfología microscópica de células levaduriformes de la cepa Q12-A2, aumentado a 1000x. ....	44
<b>Figura. 13.</b> Patrones de RAPD para cepas de especies de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Leuconostoc</i> con el oligonucleótido iniciador OPA-18. Carril 1, marcador de talla molecular, carriles; 2 – 20, <i>Lactobacillus fermentum</i> (JCABB1 y JCABB9), <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (JCABB2, JCABB3, JCABB4, JCABB5, JCABB6, JCABB7 y JCABB8), <i>Lactobacillus plantarum</i> (JCABB10, JCABB11, JCABB12, JCABB13), <i>Lactobacillus helveticus</i> (JCABB18 y JCABB19). Las cepas fueron identificadas a nivel de género y especie, con base en la secuencia del gen 16S ADNr. ....	47
<b>Figura 14.</b> Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 16S DNAr de las cepas de BAL aisladas a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas y las secuencias nucleotídicas de los genes 16S ADNr de otras BAL relacionadas. La comparación filogenética se basó en el análisis de las secuencias nucleotídicas con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P) y el método de agrupamientos de Neighborth-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje. ....	51
<b>Figura 15.</b> Patrones de RAPD para cepas de especies de levadura con el oligonucleótido iniciador OPA-18. Carril 1, marcador de talla molecular, carriles; 2 – 20, <i>Kluyveromyces lactis</i> (JCABKL5, JCABKL6, JCABKL7, JCABKL8, JCABKL9, JCABKL11, JCABKL12, JCABKL13, JCABKL22 y JCABKL24), <i>Kluyveromyces marxianus</i> (JCABKM1, JCABKM2, JCABKM3, JCABKM4 y JCABKM19), <i>Debaryomyces hansenii</i> (JCABDH14, JCABDH15), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (JCABSC16, JCABSC21 y JCABSC23), <i>Torulaspota delbrueckii</i> (JCABTD17), <i>Candida orthopsilosis</i> (JCABCO10, JCABCO18).Las cepas fueron identificadas a nivel de género y especie, con base en la secuencia del gen 18S ADNr. ....	53
<b>Figura 16.</b> Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 18S DNAr de las cepas de levaduras aisladas a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S ADNr de otras levaduras relacionadas. La comparación filogenética se basó en el análisis de las secuencias nucleotídicas con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P) y el método de agrupamientos de Neighborth-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje. ....	58
<b>Figura 17.</b> Perfil textural del queso crema elaborado con leche pasteurizada y microorganismos autóctonos del queso artesanal de Rayón, Chiapas. T1: (BAL + LEV), T2: (LEV), T3: (BAL), T4: (BCO), T5: (ARTESANAL).....	62
<b>Figura 18.</b> Evaluación sensorial de atributos en queso elaborado con leche pasteurizada y microorganismos autóctonos del queso artesanal de Rayón, Chiapas. ....	65

## 1 INTRODUCCIÓN

El queso crema es un queso fresco elaborado artesanalmente con leche cruda de vaca, es de gran aceptación en el sureste mexicano principalmente en los estados de Chiapas y Tabasco. Aunque su origen puede ser en la región norte del Estado de Chiapas, su manufactura a nivel artesanal es muy similar en ambos estados (Villegas *et al.*, 2011). Su sabor ácido típico está dado por la biota microbiana que contiene (Ramos *et al.*, 2009). Los quesos elaborados con leche cruda son propensos a contener microbios patógenos. La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 indica que todos los quesos deben elaborarse con leche pasteurizada (DOF, 2010). La pasterización, es el tratamiento térmico al que se someten los productos alimenticios, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de los microorganismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos. Se asume que durante la pasterización de la leche, también se mueren los microorganismos involucrados en la generación de los componentes del sabor de los quesos artesanales, incluyendo los que no son patógenos, del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Ayad *et al.*, 2000) y las levaduras. Las BAL contribuyen a las características de sabor, olor y modifican texturas debido a la producción del ácido láctico y otros compuestos como el diacetilo o acetaldehído, comúnmente presentes en alimentos fermentados y en el queso crema (Stiles y Holzapfel, 1997); durante su crecimiento acidifican el alimento mejorando sus propiedades de conservación debido a los efectos bacteriostáticos del ácido láctico (Melgar *et al.*, 2013). El desarrollo de nuevos cultivos iniciadores o inóculos para elaborar productos lácteos fermentados, implica la identificación y caracterización de la microbiota involucrada en el sabor, olor y textura de quesos artesanales (Freitas y Malcata, 2000).

No existe información que haga referencia a cepas de cultivos lácticos iniciadores, ni levaduras obtenidas de quesos artesanales elaborados en el Estado de Chiapas.

Al estudiar el queso crema tropical tradicionalmente fabricado con leche bronca en Huimanguillo, Tabasco, se aislaron 20 cepas de BAL y se encontró que *Lactobacillus pentosus* y *L. fermentum*, produjeron más acidez (Ramos *et al.*, 2009). En estudios sobre queso crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas reportan alto

número de bacterias coliformes fecales  $\log_{10}$  7.65 ufc g<sup>-1</sup> (Romero-Castillo *et al.*, 2009), mostrando su baja calidad sanitaria. Aunque otros estudios no registraron coliformes (Villegas *et al.*, 2011).

En relación a la genuinidad y tipicidad de los quesos artesanales de Chiapas reportan que no hay diferencias sensoriales entre quesos regionales de Chiapas (Costa, Centro y Norte) (Villegas *et al.*, 2011). En quesos de la costa de Chiapas, Morales *et al.* (2011) identificaron cepas de BAL resistentes a la sal, (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *Weisella thailandensis*, *Tetragenococcus halophilus*, y *L. farciminis*). La información de elaboración del queso artesanal de Chiapas con leche pasteurizada y BAL como cultivos iniciadores es escasa (Ramos *et al.*, 2009). Además, es posible que para elaboración del queso tradicional, se necesiten levaduras, pues ellas generalmente están presentes en muchos de los quesos artesanales tropicales con leche bronca, bajo pH y alta humedad como el Lben y Jben (Pacheco y Bucio, 2010), pues son importantes en el desarrollo de aromas (Roberts *et al.*, 2005).

Existen muchos estudios orientados a caracterizar microbiota de quesos artesanales, así mismo, sobre la aplicación de cultivos para elaborar la versión con leche pasteurizada. Las metodologías sensoriales que se han usado para evaluar la utilidad de los cultivos microbianos propuestos, son de tipo descriptivas, discriminativas y afectivas. Sin embargo su empleo es limitante, pues generalmente los quesos elaborados con leche pasteurizada son diferentes a los quesos elaborados con leche cruda, ya que el sabor de estos últimos es más rico e intenso. Esto es debido a la abundante flora microbiana nativa presente en la leche cruda y el ambiente quesero que generalmente se asocia con perfiles de compuestos volátiles más complejos y calificaciones más altas en los atributos sensoriales (Montel, *et al* 2014).

Las pruebas sensoriales que se presentan en la literatura, se restringen a la aceptabilidad y a la descripción de los atributos sensoriales. Existe un nuevo método, denominado Método del Perfil Ideal (IPM), que podría ser usado en la evaluación sensorial de cepas microbianas empleadas en la elaboración de quesos. Este último, consiste en hacer una prueba única para recopilar información afectiva y descriptiva de los consumidores. El fundamento de la prueba IPM, se basa en la percepción de los consumidores, de lo cual depende el éxito de los productos en el mercado. Por lo

anterior, se le pide directamente al consumidor proporcione la información afectiva y descriptiva sobre el producto evaluado (Varela and Ares, 2014).

## **2 OBJETIVOS**

### 2.1. Objetivo general

Aislar, caracterizar e identificar bacterias ácido lácticas y levaduras del queso artesanal de Rayón Chiapas, evaluar su uso con leche pasteurizada y conocer las características fisicoquímicas y sensoriales.

.

### 2.2. Objetivos particulares

1.- Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras del Queso Artesanal de Rayón Chiapas.

2.- Identificar bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras del queso artesanal de Rayón Chiapas.

3.- Inocular leche pasteurizada con bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras aisladas del queso artesanal de Rayón, Chiapas, para elaborar queso tipo artesanal con leche pasteurizada y evaluar las características fisicoquímicas y sensoriales.

## **3 HIPÓTESIS**

La utilización de BAL y levaduras autóctonas del queso artesanal de Rayón, Chiapas, para elaborar quesos con leche pasteurizada, permite obtener quesos con las características fisicoquímicas y sensoriales del queso artesanal.

## 4 REVISION DE LITERATURA

### 4.1 . Definición de queso

Es el producto obtenido por la coagulación de la leche cruda o pasteurizada (entera, semidescremada y descremada), constituido esencialmente por caseína de la leche formando una masa prismática con un contenido de humedad del 60 % aproximadamente (Eck, 2000).

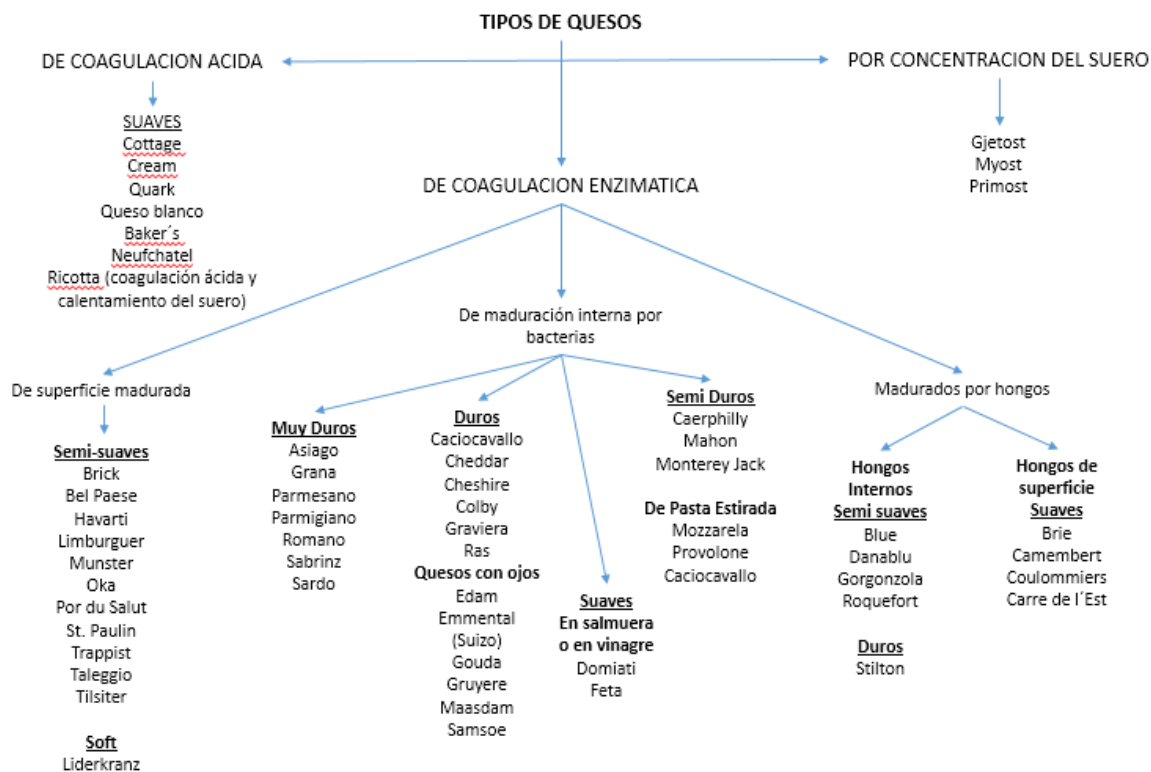
Queso es el producto fresco o madurado obtenido por coagulación y separación de suero de cualquiera de los siguientes productos: leche, nata, leche desnatada (total o parcialmente), suero de mantequilla o de una mezcla de cualquiera de ellos (Cenzano, 1992; Ordoñez, 1998).

### 4.2. Tipos y clasificación de los quesos.

El queso se produce a nivel mundial con muy diversas formas, sabores, aromas y texturas se pueden contabilizar más de 2000 variedades (Figura 1) y tipos (Fox *et al.*, 2000). En México se producen a nivel nacional 25 tipos de quesos (Cervantes *et al.*, 2008), no obstante la mayoría son frescos o de corta duración, algunos con excelentes propiedades para el fundido y desmoronamiento (Jiménez- Guzmán *et al.*, 2009). Los criterios para clasificar los quesos son diversos (Tabla 1), pero se basan principalmente en las condiciones del proceso y las características fisicoquímicas propias del tipo de queso.

**Tabla 1.** Clasificación de los quesos

Por su contenido de humedad (%)			Referencia Scott <i>et al.</i> , 1998
Duros 20 – 42	Semi duros 44 - 55	Blandos o suaves 55	
Por el tipo de coagulación			Dagleish, 1999; (Fox <i>et al.</i> , 2000; Gunasekaran y Ak, 2003
Enzimática	Ácida	Ácida/Térmica	
Por su estado de maduración (Días)			McSweeney, 2004
Frescos 6	Semi Madurados 40	Madurados >70	



**Figura 1.** Clasificación natural de los quesos de acuerdo al agente de maduración utilizado y su firmeza. Fuente: (Gunasekaran y Ak, 2003).

De acuerdo a la clasificación antes mencionada, el queso crema de Chiapas por su contenido de humedad del 38 al 50 % se le puede clasificar como un queso blando o suave; de coagulación enzimática puesto que se usa renina microbiana para la formación de la cuajada y por su estado de maduración es un queso fresco ya que normalmente se consume a los pocos días de haber sido elaborado.

#### 4.3 . Quesos artesanales

Los productos lácteos quesos y otros derivados lácteos autóctonos representan un patrimonio muy importante para cada país y una gran oportunidad de desarrollo de las áreas rurales (Terzic-Vidojevic, 2014).

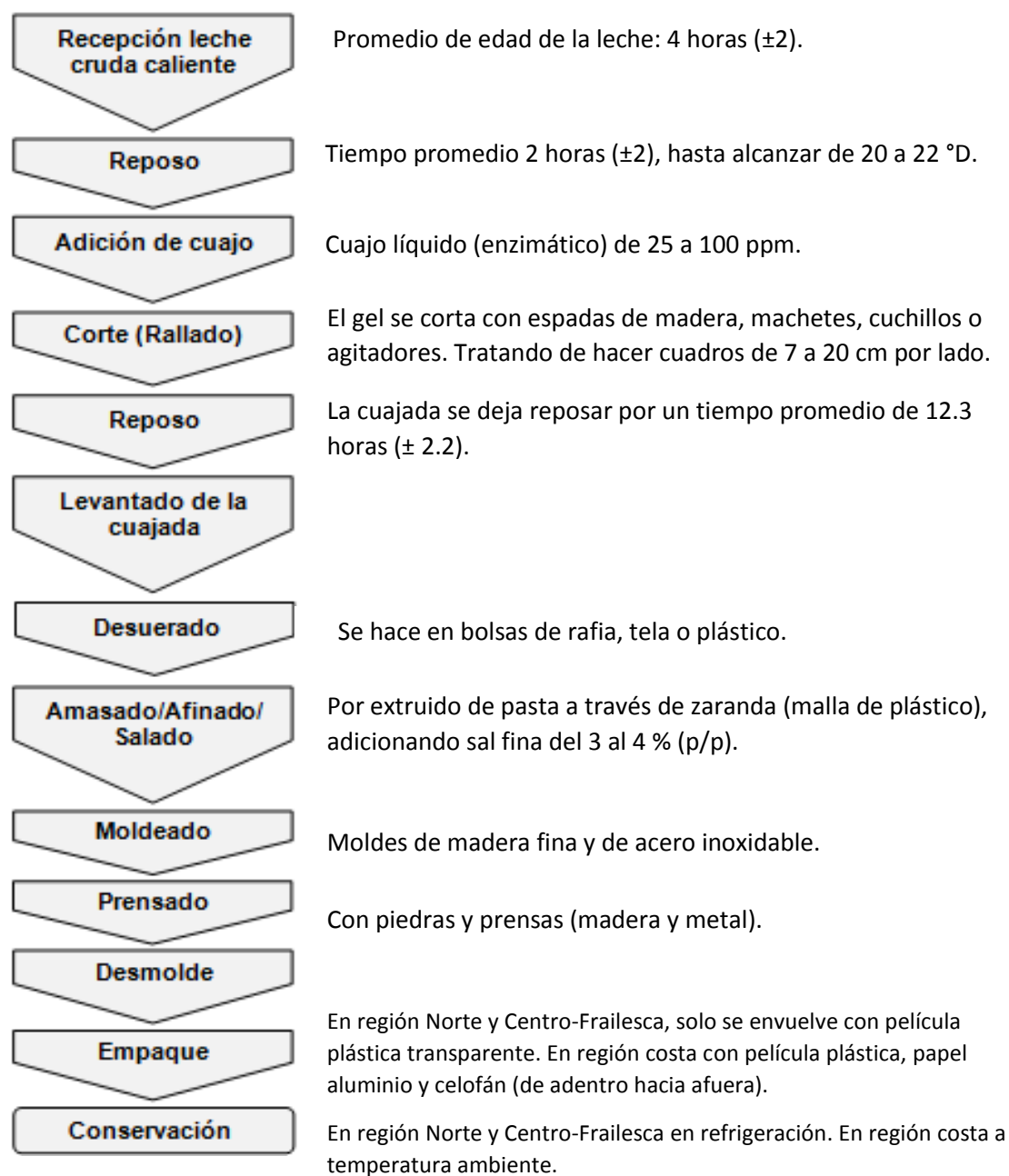
Durante la fabricación tradicional, los quesos se producen sin control de la biota de la leche, la variación constante de ésta en cantidad y calidad, da lugar a que los resultados sean siempre variables. La sustitución de la microbiota autóctona por cepas

seleccionadas permite obtener una calidad más uniforme en la producción quesera. La mayoría de los quesos artesanales se elaboran con leche cruda sin la adición de cultivos iniciadores y por ello en ocasiones se presentan problemas para la salud. Para promover los quesos artesanales, es necesario tener prácticas de manufactura estandarizadas y conocer las características (microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales) del producto final (Freitas y Malcata, 2000). La búsqueda y obtención de cepas con características tecnológicas como buena actividad acidificante, proteolítica y capacidad de sobrevivir en productos lácteos, podría facilitar el desarrollo de los procesos de fabricación, manteniendo homogéneas las características sensoriales de los quesos y otros productos lácteos fermentados (Hayaloglu *et al.*, 2005).

#### 4.4. Queso Chiapas

El queso artesanal de Chiapas, también conocido comúnmente como queso doble crema, pertenece al grupo de quesos de pasta blanda, fresca y prensada. Se elabora con leche bronca de vaca, entera o parcialmente descremada (Figura 2) y presenta una vida de anaquel que puede prolongarse hasta varios meses, en refrigeración. En el mercado, este queso se presenta en piezas pequeñas de formato prismático-rectangular y cilíndrico-plano; por su presentación, su peso oscila entre 250 a 1000 g aproximadamente. La pasta del queso artesanal de Chiapas, es altamente desmineralizada debido a un prolongado cuajado enzimático, que dura varias horas a temperatura ambiente. El producto final se muestra como una pasta blanquizca o ligeramente amarilla, con consistencia blanda o friable pero fácilmente desmoronable. Su sabor ácido y salado es agradable; este queso se fabrica para consumirse en fresco, es decir, durante los primeros tres a cuatro días posteriores a su elaboración, debido más bien a una comercialización tardada, frecuentemente termina por ser madurado. Por eso se dice que sufre una maduración involuntaria hasta de varios meses (Villegas *et al.*, 2003).





**Figura 2.** Diagrama general para la elaboración del Queso Crema de Chiapas. *Fuente:* Villegas *et al.* (2011).

#### 4.5. Análisis de la Composición química del queso.

La composición promedio del queso crema de Chiapas de acuerdo con Villegas *et al.* (2011), está indicada por las variables de la (Tabla 2), que son principalmente Humedad con un intervalo de 38 a 50 % (que lo clasifica como un queso de humedad baja a media), grasa, proteína, cenizas, calcio y una cantidad de sal (NaCl)

relativamente alta (con un intervalo de 2.7 a 4.5 %). Estos parámetros pueden presentar variaciones, mismos que son influenciados principalmente por los procedimientos de elaboración, así como por la composición de la leche.

**Tabla 2** Composición química del queso crema de Chiapas.

<b>VARIABLES</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Humedad</b>	38.22 - 49.68
<b>Grasa</b>	23.09 - 33.95
<b>Proteína</b>	15.48 - 23.37
<b>Cenizas</b>	2.16 - 9.01
<b>Calcio</b>	0.09 - 0.2
<b>NaCl</b>	2.69 - 4.48

#### 4.6. Microorganismos en la leche y los quesos.

La leche, por su propia naturaleza, es un medio rico para el crecimiento de microorganismos y es reconocido como un producto alimenticio altamente perecedero por ser muy susceptible a la contaminación microbiana. Los microorganismos de la leche sin refrigeración, proliferan rápidamente. Por lo tanto, la calidad microbiológica inicial de la leche puede variar enormemente. Existen tres fuentes básicas de contaminación microbiana de la leche: (1) desde el interior de la ubre, (2) desde el exterior de los pezones y de la ubre, y (3) a partir del ambiente, como las heces y el equipo de almacenamiento. Uno de los nutrientes de la leche más rápidamente utilizados es la lactosa, favoreciendo el crecimiento de microorganismos fermentadores de la lactosa, entre estos, varios coliformes como *Escherichia coli* y las BAL. Estos últimos, a diferencia de los coliformes, no son patógenos. Las BAL están presentes naturalmente en la leche cruda y productos lácteos crudos. Debido a su metabolismo, las BAL son los principales microorganismos responsables de la acidificación de la leche y el queso, adicionalmente muchas especies de BAL juegan un papel muy

importante en los procesos de maduración de los quesos, especialmente porque le imparten sabor, aroma y consistencia (Terzic-Vidojevic, 2014).

En la fabricación de un queso tradicional, *Escherichia coli* y las BAL, se transfieren de un lote previo a un lote nuevo mediante la adición del suero de leche. La selección natural de la flora benéfica de la leche, como los *Lactobacilos*, *Streptococos* y *Lactococos*, ocurre naturalmente en el proceso de fermentación, favoreciendo la disminución de la carga microbiana patógenos (D'Amico, 2008). En la optimización del proceso de fabricación de quesos, la adición directa de BAL seleccionadas y empleadas como cultivos iniciadores en la leche pasteurizada, es una práctica común en varios países (D'Amico, 2008).

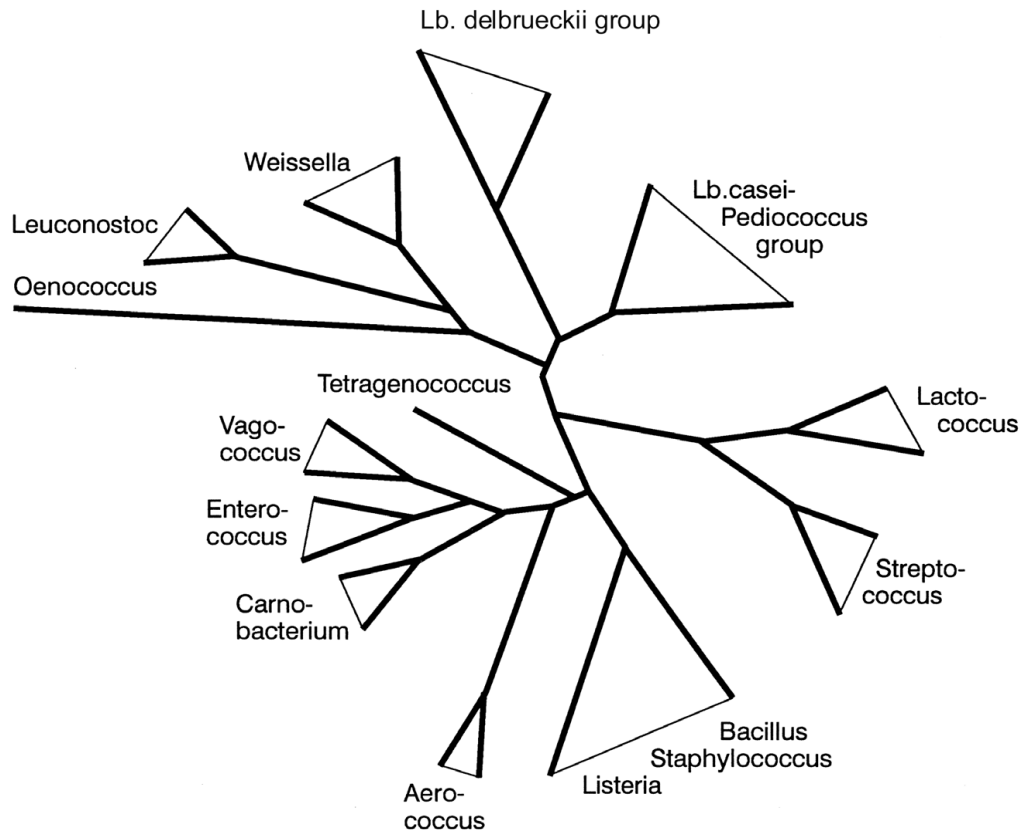
El proceso de fermentación de los productos lácteos es diferente de una región a otra, dependiendo de la microflora autóctona local, misma que se ve afectada por las condiciones ambientales de cada región geográfica. Lo anterior, limita el uso de cultivos iniciadores universales, por lo tanto, una solución racional es la selección de cultivos iniciadores a partir de la microflora autóctona que puede ser utilizada exitosamente en la industria láctea local (Terzic-Vidojevic, 2014).

#### 4.6.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).

Las BAL forman un grupo de bacterias Gram-positivas, no móviles, que no forman esporas, y con forma de bastones o cocos. Fermentan carbohidratos y alcoholes superiores en ácido láctico, principalmente. Son oxidasa negativa y catalasa negativa (Stiles y Holzapfel, 1997). Los géneros importantes en los productos lácteos son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* (Walstra *et al.*, 2001). Una característica importante utilizada en la diferenciación de los géneros BAL, es el modo de fermentación de la glucosa en condiciones estándar, es decir, sin limitaciones en las concentraciones de glucosa y en los factores de crecimiento (aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos) y con limitaciones en la disponibilidad de oxígeno. En estas condiciones las BAL se pueden dividir en dos grupos: el homofermentativo, con la conversión de la glucosa en casi cuantitativamente a ácido láctico y el heterofermentativo, con la fermentación de glucosa a ácido láctico, etanol, ácido acético y CO<sub>2</sub>. En la práctica, una prueba para la producción de gas a partir de glucosa

distinguirá entre los grupos (Axelsson, 2004). Dos principales vías de fermentación de azúcar se pueden distinguir entre las bacterias ácido lácticas. La glucólisis (vía Embden - Meyerhof - Parnas) resulta casi exclusivamente en ácido láctico como producto final en condiciones estándar, y el metabolismo se refiere a la fermentación como homoláctica. La ruta 6 - fosfogluconato / fosfocetolasa resulta en la producción de cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol, acetato, CO<sub>2</sub> y además al ácido láctico, y el metabolismo se refiere a la fermentación como heteroláctica. La clasificación de las bacterias del ácido láctico en diferentes géneros se basa principalmente en la morfología, el modo de la fermentación de la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal, y tolerancia al ácido o alcalino. La actual taxonomía se basa en parte en verdaderas relaciones filogenéticas las cuales han sido reveladas por un extenso trabajo sobre la determinación de secuencias de rRNA. Algo de los géneros recientemente descritos se determinan más fácilmente con sondas de oligonucleótidos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basado en tecnologías de uso de estas secuencias, o directa secuenciación del gen 16S rRNA. La mayoría de los géneros en la forma de grupo filogenéticamente grupos distintos, pero para algunos, en particular, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, la filogenética de racimos no se correlacionan con la clasificación actual basado en caracteres fenotípicos (Figura 3). Nuevas herramientas para la clasificación e identificación de ALB están actualmente reemplazando y / o son complementarias a las metodologías basadas en el fenotipo tradicionales. El más prometedor para uso rutinario son secuenciación genética del 16S rRNA, técnicas de toma de huellas dactilares basadas en PCR y patrones de proteínas solubles. Las BAL pueden soportar un pH bajo, porque cuando se cultivan en un medio acidificado, mantienen el pH del citoplasma más alto que el del medio de cultivo (Kashket, 1987). Su pH interno superior se mantiene bombeando protones (iones H<sup>+</sup>) al exterior a través de ATPasas (Walstra *et al.*, 1999).

A continuación se mencionan algunos géneros



**Figura 3.** Bacterias lácticas y otros géneros cercanos. Fuente: (Axelsson, 2004)

#### 4.6.2. Género *Leuconostoc*

El género *Leuconostoc* se definió previamente como una BAL heterofermentativa, con forma de coco que produce sólo D-ácido láctico a partir de glucosa y sin producir amoníaco a partir de arginina. Los leuconostocs fueron así separados de otros cocos de BAL por su metabolismo heterofermentativo y de lactobacilos heterofermentativo por la morfología y algunos rasgos clave. A veces es fácil confundir *Leuconostoc* con algunas "barras cocoides" de los lactobacilos heterofermentativos. *Leuconostocs* pueden formar cantidades significativas de diacetilo a partir del citrato en la leche, y algunas especies, principalmente *L. mesenteroides subsp. cremoris*, se han utilizado en la industria láctea para este propósito.

#### 4.6.3. Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es el más numeroso de los géneros incluidos en BAL. También es muy heterogéneo, y abarca las especies con una gran variedad fenotípica, bioquímica, y propiedades fisiológicas. La (Tabla 3) muestra un resumen de las características utilizadas para distinguir entre los tres grupos y algunas de las especies más conocidas se incluyen en cada grupo. Los base fisiológica para la división es (generalmente) la presencia o ausencia de enzimas clave del metabolismo del azúcar homo y heterofermentativos, fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfocetolasa, respectivamente.

**Tabla 3** Clasificación del género de *Lactobacillus*.

	<b>Grupo I, homofermentativos obligados</b>	<b>Grupo II, heterofermentativos facultativos</b>	<b>Grupo III, heterofermentativos obligados</b>
<b>Fermentación de la pentosa</b>	-	+	-
<b>Producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa</b>	-	-	+
<b>Producción de CO<sub>2</sub> a partir de gluconato</b>	-	+a	+a
<b>Presencia de FDP aldolasa</b>	+	+	-
<b>Fosfocetolasa</b>	-	+b	+
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb.</i> <i>delbrückii</i> <i>Lb.</i> <i>helveticus</i> <i>Lb.</i> <i>salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb.</i> <i>curvatus</i> <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb.</i> <i>buchneri</i> <i>Lb.</i> <i>fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

(a) Cuando fermentó; (b) Inducible por pentosas.

Fuente: (Axelsson, 2004).

Las clásicas vías para distinguir entre especies de lactobacilos han sido el patrón de fermentación de azúcares, la configuración del ácido láctico producido, la hidrólisis de arginina, los requerimientos de crecimiento y finalmente el crecimiento a diferentes temperaturas. El género *Lactobacillus* comprende más de 50 especies (Melgar *et al.*, 2013).

#### 4.6.4. Levaduras

Las levaduras son organismos eucariotas, ubicados en el reino de los hongos, las cuales juegan un papel esencial en la preparación de determinados productos lácteos fermentados como el kéfir, o los quesos de leche cruda derivados de kéfir y en la maduración de muchos quesos (Viljoen, 2001). El elevado número de levaduras en algunos productos lácteos acidificados puede atribuirse a su capacidad para tolerar bajos niveles de pH, de actividad de agua y de temperaturas (5° C) así como para asimilar lactosa y ácidos orgánicos (ácido succínico, láctico y cítrico) y tolerar altas concentraciones de sal y productos de limpieza y desinfectantes (Fadda *et al.*, 2004). El predominio y crecimiento de algunas especies de levaduras se ha relacionado con el proceso de maduración debido a su capacidad para producir proteasas extracelulares y lipasas (Fleet y Mian, 1987). Debido a que la levadura se recupera al final de la etapa de maduración, se considera que juegan un papel secundario en el desarrollo del aroma en el queso jben, producto de bajo pH y alto contenido de humedad, en Marruecos (Benkerroum y Tamine, 2004).

Las investigaciones sobre la composición de la flora de levaduras, indican, una gran diversidad de especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Zygosaccharomyces*, *Geotrichum*, *Kluyvero-myces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Torulaspota*. La obtención de levaduras (por ejemplo  $10^6$  y  $10^9$  UCF/g) de los quesos y su habilidad para la hidrólisis de la grasa y proteínas de la leche sugieren que estas influyen en las características organolépticas de los quesos. La función de las levaduras (Tabla 4) durante la producción del queso y su influencia en la calidad no ha sido muy explorada. La prevalencia de algunas especies de levaduras va a depender del tipo de queso; la especie comúnmente encontrada en todos los tipos de quesos es *Debaryomyces hansenii*, debido a su habilidad para crecer en presencia de sal, a bajas temperaturas, metabolizar ácido láctico y ácido cítrico; adicionalmente produce actividad proteolítica y lipolítica contribuyendo a los procesos de maduración de los quesos (Capece y Romano, 2009).

**Tabla 4.** Géneros de levaduras encontrados en quesos.

GENEROS	QUESO EN LOS QUE SE PRESENTA.	ATRIBUTOS	CARACTERISTICAS	REFERENCIAS
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Es la levadura más abundante en quesos. Limburger, Tilsitter, Port Salut, Trappist, Brick y Danish Danbo, Gouda	Produce componentes del aroma, factores para el crecimiento microbiano. Contribuye al proceso de fermentación	Crece en presencia de sal, a bajas temperaturas, bajos pH y baja aw. Con presencia de actividad proteolítica y lipolítica. Es un fuerte usuario de ácido láctico y metaboliza ácido cítrico.	Prillinger <i>et al</i> , 1999
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Queso Gouda en las primeras semanas de maduración.	Fermenta la lactosa y produce esteres primarios	Crece en quesos con ambientes de alta concentración de sal, bajo pH, bajos contenido de humedad y temperatura	Viljoen, 2001
<i>Yarrowia lipolytica</i> ,	Queso Gouda, Stilton	Produce compuestos volátiles sulfurosos	Crece en quesos con ambientes de alta concentración de sal, bajo pH, bajos contenido de humedad y temperatura	Viljoen, 2001; Kamura <i>et al</i> , 2004
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	En el queso Cheddar como contaminante	Produce compuestos sulfurosos	Contribuye positivamente a los procesos de fermentación y maduración de los productos lácteos.	Jakobsen y Narvhus, 1996; Welthagen <i>et al</i> , 1999

#### 4.7. Cultivos de microorganismos para elaborar quesos.

Los cultivos lácticos, conocidos también como fermentos, se utilizan en la elaboración de yogurt, y otros productos acidificados o fermentados como algunas variedades de queso. Los fermentos se añaden al producto y se dejan crecer en él bajo condiciones controladas. En el transcurso de la fermentación las bacterias producen sustancias que dan al producto fermentado sus propiedades características tales como acidez, pH, sabor, aroma y consistencia. La caída del pH, que se produce cuando las bacterias fermentan la lactosa y dan lugar a la producción de ácido láctico, tienen un efecto conservador sobre el producto, al mismo tiempo que mejoran su valor nutritivo y su digestibilidad (Pacheco y Bucio, 2010, Bylund, 2003).



Los diferentes productos lácteos acidificados tienen características distintas y utilizan fermentos distintos para su fabricación. Los cultivos se pueden clasificar de acuerdo con sus temperaturas óptimas de crecimiento: bacterias mesófilas, con temperaturas óptimas entre 20 y 30 °C, y bacterias termófilas, con temperaturas óptimas de crecimiento de 40 a 45 °C. También se pueden clasificar por el número de cepas que contiene; Simple cepa, múltiples cepas (Bylund, 2003). Las principales funciones de los cultivos microbianos iniciadores o fermentos en los productos lácteos se pueden resumir como se indica en la (Tabla 5).

**Tabla 5.** Funciones de los cultivos microbianos iniciadores.

<b>Funciones</b>	<b>Beneficios</b>
<b>Biopreservación</b>	Para el producto debido a una fermentación que resulta en una vida útil más larga y una mayor seguridad; la producción de bacteriocinas, también puede tener usos potenciales como conservantes de alimentos.
<b>Sensoriales</b>	Para mejorar las propiedades sensoriales percibidas del producto debido, por ejemplo, para la producción de ácidos orgánicos, compuestos carbonilo y la hidrólisis parcial de las proteínas y/o grasas.
<b>Reológicas</b>	Para mejorar las propiedades reológicas (es decir, la viscosidad y la firmeza) del producto, y en algunos casos fomentar la producción de gas (es decir, formación de los ojos en el queso) o color (moho blanco y azul o rojo frotis).
<b>Nutricionalmente</b>	Contribuir a las propiedades dietéticas funcionales de los alimentos al incorporar proteínas más digeribles, como ocurre con el uso de microfloras probióticas.

Las industrias lácteas compran fermentos de laboratorios especializados. Estos laboratorios ponen mucho esfuerzo en investigación y desarrollo para conseguir los cultivos especiales más adecuados para obtener cada producto. Las industrias lácteas pueden comprar cultivos comerciales según distintas presentaciones: liofilizados y congelados. Los liofilizados son concentrados de cultivos en forma de polvo para la propagación como cultivo industrial. Los congelados son también un concentrado para propagación (Bylund, 2003).

En las dos últimas décadas, las BAL han recibido mucha atención, particularmente los géneros utilizados como cultivos iniciadores, debido a su gran importancia comercial. Las investigaciones se enfocan en aislar nuevas cepas con el fin de estudiar sus potencialidades como cultivos iniciadores. Es un hecho que las cepas iniciadoras influyen notablemente en los cambios químicos, bioquímicos y sensoriales que ocurren durante la maduración de los quesos y el uso de diferentes bacterias iniciadoras produce diferencias significativas en la calidad de los quesos. Una fuente inagotable de cepas la constituye los productos artesanales, en especial los quesos (Hayaloglu *et al*, 2005).

La naturaleza de la fermentación de los productos lácteos es diferente de una región a otra dependiendo de la micro flora nativa local que se ve afectada por las condiciones ambientales en cada región geográfica, limitando el uso de cultivos iniciadores universales; una solución racional es la selección de cultivos iniciadores de micro flora nativa que puede ser utilizada exitosamente en la industria láctea local (Terzic-Vidojevic, 2014).

#### 4.7.1. Cultivos iniciadores.

Un cultivo iniciador puede ser definido como una preparación o material que contiene una gran variedad de microorganismos. Los cuales pueden adicionarse para acelerar un proceso de fermentación. Siendo adaptada a los sustratos, un iniciador típico facilita el control del proceso de la fermentación y la predicibilidad de sus productos. Adicionalmente, los cultivos iniciadores facilitan el control sobre la fase inicial del proceso de fermentación (Holfzapfel, 1997).

En base a la composición, los cultivos iniciadores pueden clasificarse en:

##### 1. Cultivos iniciadores simples.

Cada iniciador se compone de un cultivo puro de un solo tipo de bacterias.

##### 2. Cultivos iniciadores múltiples.

Se compone de una pequeña mezcla definida de cultivos puros, algunas veces están constituidos hasta por seis cepas de diferente tipo de bacterias o seis diferentes cepas de un tipo de bacterias.

### 3. Cultivos de mezclas de cepas.

Por ejemplo iniciadores naturales, consisten en una mezcla indefinida de cepas de diferentes tipos de bacterias, la composición de este tipo de iniciadores, está basado en un equilibrio entre varias bacterias iniciadoras y su cambio considerable durante el uso. En quesería, un iniciador es un cultivo de microorganismos cuyo crecimiento en la leche o cuajada produce con su actividad metabólica, la maduración del queso. La mayoría de los iniciadores en quesería son cultivos controlados de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* y *cremoris*. Las enzimas de los iniciadores bacterianos, vivos o muertos, provocan la degradación de los diversos componentes de la leche, permitiendo la producción de precursores de toda una serie de sustancias que son las responsables de la textura, el sabor y el aroma del queso (Scott, 1998).

#### 4.7.2. Bacterias ácido lácticas no iniciadoras (BAL-NI).

Muchas veces la fabricación de quesos artesanales por granjeros o microempresas familiares, lo realizan con las BAL que están presentes de manera natural en la leche; los quesos fabricados con leche sin pasteurizar y siguiendo los procedimientos tradicionales de manufactura pueden contener una diversa y rica microflora, de la cual dependerá la calidad de ellos, adicionalmente, la biodiversidad de las bacterias involucradas puede considerarse el factor fundamental para la conservación de las características típicas de los productos de quesería tradicionales (Demarigny *et al.*, 1997). Aunque las BAL-NI son aisladas a partir del queso, la mayoría de ellas son inactivadas por la pasteurización, su presencia en quesos fabricados con leche pasteurizada se puede deber a contaminación después de la pasteurización (Martley y Crow, 1993).

#### 4.8. Evaluación sensorial.

La Evaluación Sensorial es un procedimiento muy usado para medir los atributos sensoriales de los materiales relativamente reciente; nació durante la segunda guerra mundial, ante la necesidad de establecer las razones que hacían que las tropas rechazaran en gran volumen las raciones de campaña. El hecho aparecía insólito e inesperado: las dietas estaban perfectamente balanceadas y cumplían los requerimientos nutritivos de los consumidores; pero éstos las rechazaban; una herramienta muy valiosa para investigar estas causas ha sido la Evaluación Sensorial (Stone *et al.*, 2012).

El análisis sensorial es una ciencia multidisciplinaria en la que se utilizan panelistas humanos que utilizan los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído para medir las características sensoriales y la aceptabilidad de los productos alimenticios, y de muchos otros materiales. No existe ningún otro instrumento que pueda reproducir o reemplazar la respuesta humana; por lo tanto, la evaluación sensorial resulta un factor esencial en cualquier estudio sobre alimentos. El análisis sensorial es aplicable en muchos sectores, tales como desarrollo y mejoramiento de productos, control de calidad, estudios sobre almacenamiento y desarrollo de procesos (Watts *et al.*, 1992).

La evaluación sensorial es la disciplina científica que se enfoca en evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a los estímulos (características de los alimentos y materiales) percibidos a través de los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído (Stone *et al.*, 2004).

La calidad sensorial de un queso, es la expresión de muchos factores relacionados con sus condiciones de producción, la tecnología de elaboración de los quesos y la composición microbiológica y bioquímica de la leche son críticos, y que dependen del manejo animal, la alimentación, la genética y el estado filológico que incluso juegan un rol crucial, principalmente para productos donde los materiales crudos son modificados como los quesos de leche cruda (Coppa *et al.*, 2011).

##### 4.8.1. Tipos de pruebas sensoriales

Dentro de las pruebas analíticas, existen tres tipos principales de pruebas para realizar un análisis sensorial (Tabla 6). Las pruebas afectivas, las discriminativas y las

descriptivas; se elegirán unas u otras dependiendo del objetivo que se pretenda alcanzar en un determinado estudio (Gutiérrez, 2000).

#### 4.8.2. Pruebas afectivas

Las pruebas empleadas para evaluar la preferencia, aceptabilidad o grado en que gustan los productos alimentarios se conocen como “pruebas orientadas al consumidor” “pruebas hedónicas” (Deliza y Abreu, 2011).

#### 4.8.3. Pruebas discriminativas

Las pruebas empleadas para determinar las diferencias entre productos o para medir características sensoriales se conocen como “pruebas orientadas al producto”. Como ejemplo, se tienen las pruebas: triangular, dúo-trío, A-No A, Igual/Diferente, n-AFC, entre otras (Gutiérrez, 2000).

#### 4.8.2. Las pruebas descriptivas

Las pruebas descriptivas son aquellas en que los panelistas deben evaluar la intensidad de varias características de la muestra. En estas pruebas, los panelistas entrenados hacen una descripción sensorial total de la muestra, incluyendo apariencia, olor, sabor, textura y sabor residual. Hay muchos tipos de pruebas descriptivas dentro de las que se incluyen, el Perfil de Sabor y el Perfil de Textura (Stone *et al.*, 2012); y el Análisis Descriptivo Cuantitativo (Stone *et al.*, 1980).

**Tabla 6.** Ejemplos de tipos de pruebas sensoriales.

Tipo de prueba	Prueba	Ventajas	Desventajas	Referencia
Discriminativas	Triangular	Indican si existe diferencia perceptible entre dos tipos de productos.	No permiten identificar que tratamiento puede eventualmente utilizarse para elaborar quesos con leche pasteurizada	Deliza y Abreu, 2011
	Dúo o Trio.			
Descriptivas	Análisis cuantitativo descriptivo (QDA)	Es aplicable a todas las propiedades sensoriales de los alimentos. Permite obtener un perfil sensorial del producto	No permiten identificar preferencias entre tratamientos. No indica el nivel de agrado.	Lawless and Heymann, 2010
Afectivas	Pruebas orientadas al consumidor	Indican la preferencia, aceptabilidad o grado en que gustan los productos alimentarios	Requieren de un gran número de respuestas y los panelistas no son expertos.	Stone <i>et al.</i> , 2012.
	Pruebas orientadas al producto	Permiten determinar las diferencias entre productos o miden características sensoriales		

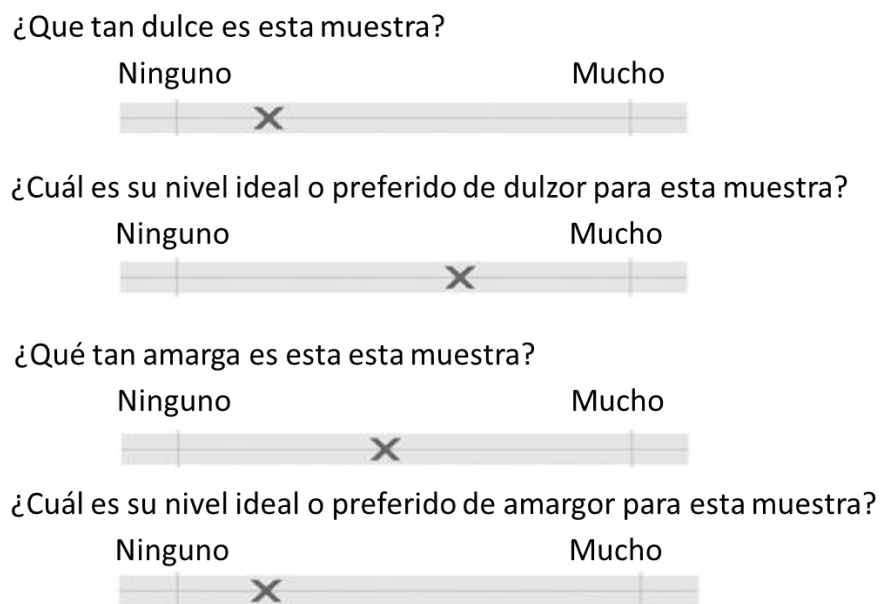
Un nuevo método es el IPM (Ideal Profile Method) que consiste en hacer una sola prueba para recopilar información afectiva y descriptiva de los consumidores. La idea parte de que de los consumidores depende el éxito de los productos en el mercado, por lo que se les pide directamente hacer ambas tareas. El consumidor entonces proporciona los perfiles sensoriales y las puntuaciones que gustan de los productos (Figura 4). Este procedimiento tiene la ventaja de que la información de la percepción y

las pruebas afectivas están directamente relacionados (Varela and Ares, 2014). El IPM es una metodología sensorial en la cual:

- Los consumidores valoran la intensidad del producto tanto en su percepción e ideal de manera alternativa, para una lista de atributos utilizando la misma escala.
- Los consumidores valoran los productos en el gusto general.

En este sentido, es una mezcla de análisis descriptivo cuantitativo (como QDA) y Escalamiento Just – About - Right (JAR) excepto que:

- En comparación con QDA, se obtienen los perfiles sensoriales de los productos de los consumidores;
- En comparación con los JAR, las puntuaciones ideales se describen explícitamente.



**Figura 4.** Ejemplo de aplicación del método IPM (Varela y Ares, 2014).

#### 4.9 Análisis de textura.

En alimentos la textura es generalmente definida como un conjunto de elementos que no involucran los sentidos del olfato y el sabor, que proporcionan las propiedades que podemos percibir como apretar, escuchar y tocar como contribuyentes de la textura colectiva de alimentos (Foegeding y Drake, 2007).

La textura de un producto alimenticio abarca "Todos los atributos reológicos y estructurales (geométricas y superficiales) del producto perceptible por medio de la mecánica táctil, y en su caso visual y receptores auditivos". Los atributos de textura de los alimentos juegan un papel importante en la atracción de los consumidores, tales como las decisiones de compra y el consumo final (Gunasekaran, 2002).

Las propiedades reológicas y mecánicas de los quesos, son los estímulos predominantes que afectan la percepción de textura durante los procesos de masticación y degradación que ocurren en la boca; otras características texturales especialmente aquellas que están relacionadas con la superficie y características estructurales como la cremosidad, esponjosidad y mantecosidad pueden jugar un rol definitivo al percibir la textura de diferentes tipos de quesos (Bayarri, 2012).

#### 4.9.1 Medición de textura

Las técnicas de medición de textura se pueden agrupar en subjetivas o instrumentales. Las mediciones subjetivas o evaluación sensorial se hacen por la formación de un panel de degustación. Los métodos instrumentales se pueden agrupar en tres categorías (Scott-Blair, 1958): empíricas, imitativas, y fundamentales. Ninguno de los métodos en cada una de las categorías anteriores pueden ser los más adecuados para la medición de textura de los alimentos. Bourne (1975) sugirió que una prueba ideal de textura medida puede incluir algún aspecto de métodos empíricos, imitativos, y fundamentales.

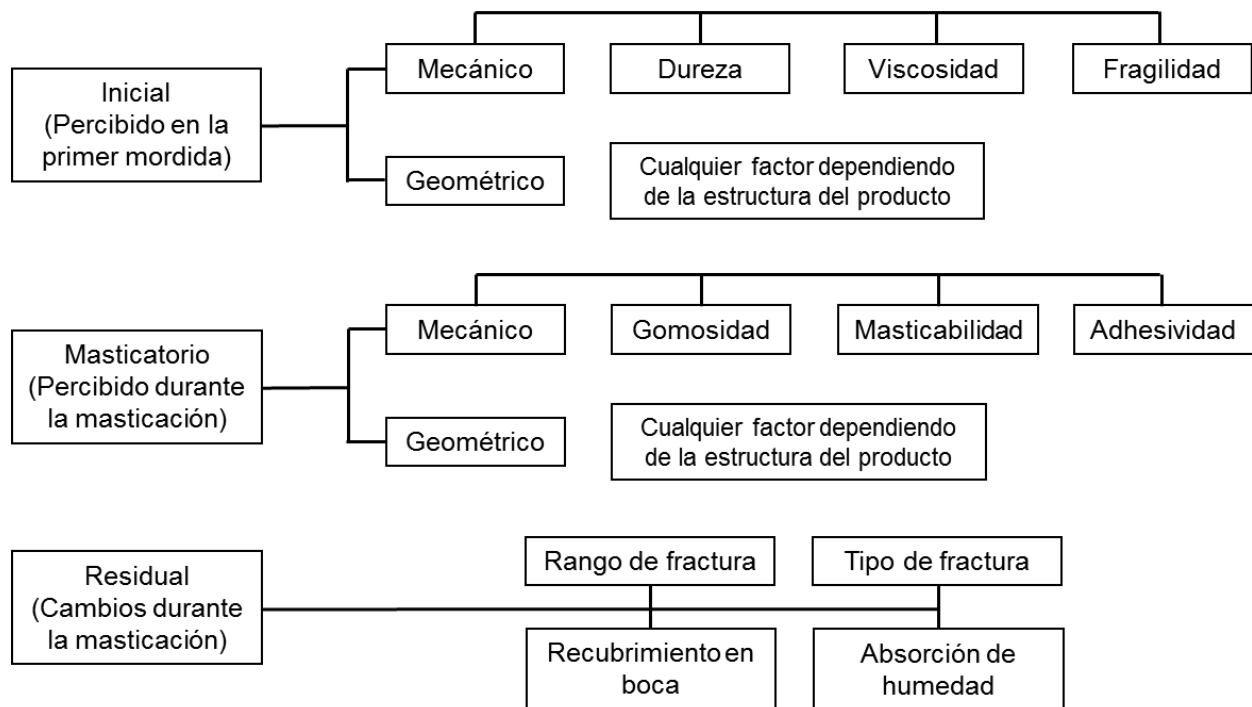
Las mediciones empíricas son aquellas pruebas que tienden a relacionar una variable medida con una propiedad del material (Rosenthal, 1999). Las pruebas de punción, penetración y compresión son buenos ejemplos de mediciones empíricas. Los métodos imitativos, incluyen sistemas de medición que se utilizan para hacer mediciones mecánicas. Intentan imitar mecánicamente la evaluación sensorial de los evaluadores humanos. De hecho, cuando se utiliza el ensayo instrumental imita la acción humana y con ello podrían desarrollarse, modelos más precisos de los atributos de textura de alimentos (Szczeniak, 1987). El análisis de perfil de textura (TPA) pertenece a este grupo. Algunas de las pruebas fundamentales que se utilizan popularmente para la evaluación de la textura incluyen I, pruebas de compresión uniaxial, flexión y torsión.



#### 4.9.2 Análisis del perfil de textura

El análisis del perfil de textura (TPA) fue desarrollado originalmente en el Centro Técnico de General Foods Corporación en la década de 1960 (Friedman *et al.*, 1963). La prueba original TPA ha realizado mediante el texturómetro de General Foods (GFT) que comprime la muestra de alimento en dos deformaciones sucesivas mediante el uso de un émbolo de punta plana. Para imitar la acción de molienda de la mandíbula, el émbolo viaja a velocidad constante, hasta llegar a una parada momentánea en ambos extremos de la trayectoria de desplazamiento (Friedman *et al.*, 1963).

Szczesniak (1963) clasifica las características texturales de los alimentos como: mecánica, geométrica, y otras. Las propiedades mecánicas se agruparon posteriormente en primarias (dureza, cohesión, la viscosidad, elasticidad y adhesividad) y secundarias (fragilidad, masticabilidad, y gomosidad). Las propiedades geométricas son las relacionadas con el tamaño y la forma y las demás propiedades son las relativas al contenido de humedad y contenido de grasa (por ejemplo, grasa y untuosidad) del producto. Esta clasificación pretende ser utilizado con ambas mediciones sensoriales e instrumentales de textura para ayudar a reducir la brecha entre estas. Brandt *et al.* (1963) desarrollaron un " procedimiento de evaluación de textura ", basada en la clasificación anterior, tal como se presenta en la (Figura 5).

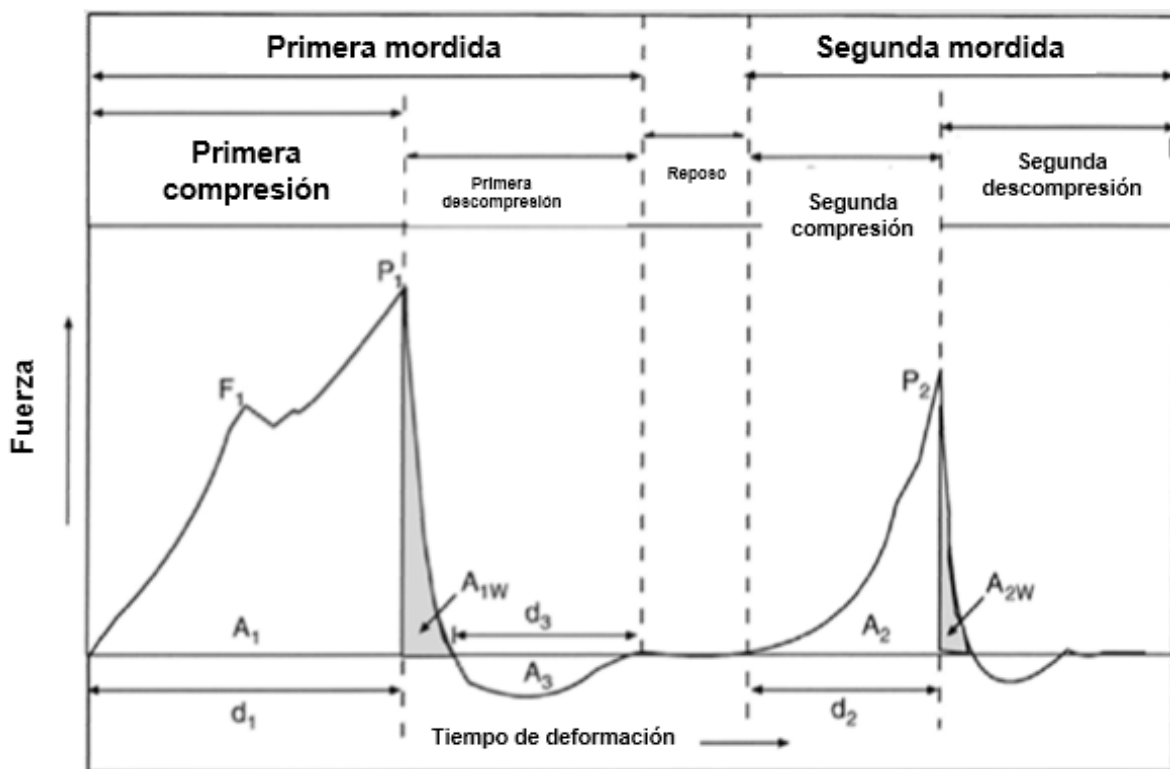


**Figura 5.** Procedimiento original para evaluar la textura de los alimentos Fuente: (Gunasekaran y Ak. 2003).

Bourne (1968) adaptó el TPA, realizado mediante el GFT, a las máquinas universales de ensayo disponibles comercialmente (UTM, Figura 6). Por lo tanto, la prueba de TPA actual es esencialmente un ensayo de compresión uniaxial.

Las principales diferencias entre la prueba de TPA y ensayo de compresión uniaxial son: (a) a diferencia de las pruebas de compresión, la prueba de TPA se lleva a cabo sometiendo una muestra cilíndrica a una de dos etapas de compresión. La primera etapa de compresión, conocido como el " primer bocado ", es seguido por una segunda etapa de compresión, el "segundo bocado". Este es similar a las dos primeras mordeduras tomadas durante la masticación de la comida. Las dos etapas de compresión pueden estar separados por un tiempo opcional de espera; y (b) la deformación utilizada en la prueba TPA es a menudo 70 % o más. Para imitar la acción de mascar más de cerca, Bourne (2002) sugirió incluso un 90 % de compresión. Los ensayos de compresión uniaxial se terminan en o antes del colapso macroscópico de la muestra. Aunque se puede producir una cantidad considerable de descomposición estructural durante los primeros dos bocados de la masticación Rosenthal (1999)

observó que en pruebas como la de dos mordeduras TPA, se experimentan más de cerca otros atributos sensoriales del momento de la deglución que no son evaluados. Una prueba de TPA típica realizada con un UTM genera un perfil fuerza-tiempo como se muestra en la figura 6. La escala de tiempo en el eje x se puede convertir en la velocidad de deformación. Muchos de los parámetros texturales que se determinaron a partir de la curva TPA son: dureza, cohesividad, adhesividad, gomosidad, elasticidad, y fracturabilidad. Estos términos se definen en la tabla 7, junto con las adecuadas dimensiones y unidades del Sistema Internacional (SI) para cada término. Estas definiciones son las mismas que las de Friedman *et al.* (1963), excepto como se calculan las zonas A1 y A2. Friedman *et al.* (1963) utilizaron las áreas bajo las curvas de esfuerzo- deformación, las dos porciones de compresión y de abstinencia de primero y segundo bocado. Las áreas A1W y A2W, durante la retirada de la primera y segunda mordedura, respectivamente, están sombreadas en la (Figura 6) y no son incluidas en los cálculos propuestos por Bourne (1968). Esto afecta a los cálculos de cohesión, masticabilidad y gomosidad.



**Figura 6.** Esquema de análisis de perfil de textura fuerza-tiempo (o deformación). Fuente: (Gunasekaran y Ak. 2003).

En la (Figura 6) se aprecia claramente el esquema de un típico análisis de perfil de textura fuerza-tiempo (o deformación) Curva con base en dos mordidas (A1 , A2 y A1W , A2W son áreas bajo las porciones de compresión y de abstinencia de la primera mordida y la curva de segunda mordida, respectivamente; A3, d3 es el área de la fuerza negativa durante la primera retirada y la distancia de recorrido de la cruceta correspondiente, respectivamente; P1, P2 y d1, d2 son los picos de la primera y segunda compresiones y el correspondiente recorrido de distancia de la cruceta, respectivamente; F1 es la primera ruptura importante en la primera curva de compresión).

Las propiedades reológicas y mecánicas de los quesos, son los estímulos predominantes que afectan la percepción de textura durante los procesos de masticación y degradación que ocurren en la boca; otras características texturales especialmente aquellas que están relacionadas con la superficie y características estructurales como la cremosidad, esponjosidad y mantecosidad pueden jugar un rol definitivo al percibir la textura de diferentes tipos de quesos (Bayarri, 2012). El análisis de perfil de textura (ATP) es una de las principales técnicas instrumentales para la medición de la textura (Fagan *et al*; 2007).

**Tabla 7.** Términos y definiciones de TPA.

<b>Términos TPA (SI unidades)</b>	<b>Definición</b>	<b>Definición de la simbología ver Figura 6</b>
<b>Dureza (N)</b>	Fuerza necesaria para conseguir en el alimento una deformación determinada	Fuerza correspondiente a P1
<b>Fracturabilidad (N)</b>	Fuerza que significa ruptura en la curva de la primer mordida (originalmente conocida como “fragilidad”)	Fuerza correspondiente a F1
<b>Elasticidad</b>	Velocidad a la que un alimento, deformado por una fuerza externa, recupera su condición inicial una vez que ha desaparecido la acción de dicha fuerza.	d2/d1
<b>Cohesividad</b>	Fortaleza que mantiene unidos los enlaces internos que existen entre las distintas partículas que integran un alimento	A2/A1
<b>Adhesividad</b>	Trabajo necesario para vencer las fuerzas atractivas entre las superficies de los materiales de un alimento puestos en contacto.	A3
<b>Gomosidad</b>	Energía necesaria para desintegrar un alimento semisólido hasta una situación que sea apta para su deglución.	Dureza* Cohesividad
<b>Masticabilidad</b>	Propiedad mecánica de la textura relacionada con la cohesividad, el tiempo necesario y el número de masticaciones requeridas para dejar un producto sólido listo para ser tragado. Los principales adjetivos correspondientes a diferentes niveles de masticabilidad son: tierno, masticable y correoso.	Dureza*Cohesividad *Gomosidad

Fuente: (Gunasekaran y Ak. 2003).

## 5 MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Aislamiento de BAL y levaduras por el método de diluciones.

Para el aislamiento y conteo de las cepas de BAL y levaduras del queso artesanal, elaborado por empresas regionales localizadas en el municipio de Rayón, Chiapas, se realizó un aislamiento con 10 g de queso y se homogenizó en 90 ml de agua peptonada buferada (BPW, Buferead peptone wáter, Fluka 77.187) estéril.

Posteriormente, se realizó una serie de siete diluciones decimales desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ , y una alícuota de cada dilución fue inoculada por duplicado, en placas con medio sólido Man rogosa sharpe (MRS, Fluka 69.966), Por la técnica de vaciado en placas. Las cajas fueron incubadas a 30 °C de 24 a 48 horas en condiciones anaeróbicas.

A continuación, se seleccionaron las colonias presuntivas de BAL, mismas que fueron caracterizadas a nivel morfológico, y purificadas mediante resiembras sucesivas por el método de estría cruzada en medio MRS sólido. Las resiembras fueron realizadas cada 48 horas, con la finalidad de lograr la purificación de las colonias características. A partir de la resiembra número cuatro, las colonias purificadas fueron resembradas en medio MRS en tubo inclinado (Cappuccino y Sherman, 2008). Finalmente, se formó una colección de 19 cepas de BAL.

El aislamiento de levaduras, se realizó por duplicado por la técnica de vaciado en placas, en medio de agar dextrosa y papa (PDA) (Bioxón, Ref. 211900, 39 g/L), acidificado con HCl 0.1 N, estéril (14 ml/litro ) (Buchl y Seiler, 2011). Las cajas fueron incubadas a 25 °C de 24 a 48 horas. Las colonias fueron purificadas mediante resiembras sucesivas por el método de estría cruzada en medio PDA. Las resiembras fueron realizadas cada 48 horas, con la finalidad de lograr la purificación de las colonias características. A partir de la resiembra número cuatro, las colonias fueron resembradas en medio PDA inclinado y se formó una colección de 25 cepas de levaduras.

## 5.2. Pureza y caracterización de cepas de BAL.

La pureza e identificación de las bacterias como pertenecientes al grupo de BAL, fue evaluada de acuerdo a Walstra *et al* (1999) por observación microscópica, ausencia de formación de esporas, tinción de Gram, reacción a catalasa con peróxido de hidrógeno al 3 %. La pureza de las levaduras fue evaluada por observación microscópica, teñidas con azul de lactofenol.

## 5.3. Caracterización bioquímica de las cepas de BAL y levaduras aisladas.

Se emplearon los sistemas comerciales de caracterización bioquímica API 50 CH (BioMerieux) y API 20 Aux (BioMerieux) para caracterización de las cepas de BAL y levaduras aisladas, respectivamente; ambos sistemas se emplearon según las instrucciones del fabricante.

Para evaluar la producción de CO<sub>2</sub>, las cepas de BAL se incubaron en medio líquido MRS con campana de Durham, a 30 °C por 48 h. Además, se realizó la prueba de hidrólisis de arginina, en medio líquido MRS modificado (sin extracto de carne y con arginina, 0.3 % m/v; citrato de sodio, 0.2 % y glucosa, 0.05 %) para detectar la producción de amonio. Después de cinco días de incubación, se agregaron cinco gotas del reactivo de Nessler para detectar la presencia de amonio (Sánchez *et al.*, 2000).

5.4. Identificación de las cepas de BAL y levaduras aisladas por análisis de la secuencia de genes ADNr y RAPD.

5.4.1. Extracción de ADN de las BAL y levaduras.

La extracción del ADN cromosómico se realizó por el método descrito por Ausubel *et al.* (1989). Las cepas fueron cultivadas en medio de cultivo líquido MRS. Los microorganismos se concentraron por centrifugación de 3 ml de un cultivo de cepas de BAL de 48 h de incubación a 30 °C en condiciones anaeróbicas. Las cepas de levaduras fueron cultivadas en medio de cultivo líquido YEPD (Extracto de levadura, 1%; dextrosa, 2% y peptona 2%). Los microorganismos se concentraron por centrifugación de 3 ml de un cultivo de 48 h de incubación a 28 °C y agitación constante a 200 rpm. En ambos casos las células fueron transferidas a un tubo Eppendorf de 1.7 ml. Se agregaron 200 µl de regulador de lisis (Tritón X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8 y EDTA 1 mM). Se añadieron 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), 0.3 g de perlas de vidrio (Ballotini 0.45-0.50 micrones de diámetro) y se agitó en vortex durante 6 minutos que comprendieron 8 ciclos de 30 segundos en agitación y 30 segundos en baño de hielo. Se adicionaron 200 µl de regulador TE (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) y se centrifugó durante 5 minutos. El DNA total se purificó a partir de dicho sobrenadante por precipitación con 2 volúmenes de etanol absoluto, enfriado a -20 °C, el precipitado se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y el etanol residual se dejó evaporar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 400 µl de regulador TE y se trató con 10 mg de RNAsa (Gibco BRL) a partir de una solución de 10 mg/ml en Tris-HCl 0.01M, pH 7.5 y NaCl 0.015 M. El DNA se precipitó con 10 µl de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol absoluto.

La concentración de DNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y considerando que 1 U  $A_{260}$  equivale a 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de doble cadena. La calidad del DNA se determinó por la relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  (Sambroock *et al.*, 1989).

#### 5.4.2. Amplificación del gen 16S ADNr de BAL por la técnica de PCR.

Un fragmento del gen 16S DNAr de cada cepa de BAL, fue amplificado por PCR, siguiendo el método descrito por Ramos *et al.*, (2009) y empleando los oligonucleótidos iniciadores 16S Sense (5'-TGCCTAATACATGCAAGTCG-3') y 16S Antisense (5'-ACCGCTACACATGGAGTTC-3').

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 10 ng de ADN molde, regulador de la Taq DNA polimerasa (1X) (Invitrogen),  $\text{MgCl}_2$  (2  $\mu\text{M}$ ), Taq DNA polimerasa (1U), cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (200  $\mu\text{M}$ ) y los iniciadores (16S SENSE y 16S ANTISENSE) (0.4  $\mu\text{M}$ ). El DNA fue amplificado con 35 ciclos usando las condiciones de amplificación siguientes: desnaturalización a 94 °C, 1 min; alineamiento a 54 °C, 1 min; polimerización a 72 °C, 1 min. Una desnaturalización inicial fue ejecutada a 94 °C durante 5 minutos y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

#### 5.4.3. Amplificación del gen 18S ADNr de levaduras por la técnica de PCR.

Un fragmento del gen 18S ADNr de cada cepa de levaduras, fue amplificado siguiendo el método descrito por Bautista *et al.* (2003), y los oligonucleótidos iniciadores LV1 (5'-CCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCT-3') y LV2 (5'-CACCTACGGAAACCTTGTTACGACT-3').

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 10 ng de ADN molde, regulador de la Taq DNA polimerasa (1X) (Invitrogen),  $\text{MgCl}_2$  (2  $\mu\text{M}$ ), Taq DNA polimerasa (1U), cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (200  $\mu\text{M}$ ), los iniciadores (LV1 y LV2) (0.4  $\mu\text{M}$ ). El ADN fue amplificado con 35 ciclos usando las condiciones de amplificación: desnaturalización a 95 °C, 1 min; alineamiento a 69 °C, 1 min; polimerización a 72 °C, 1 min. La desnaturalización inicial fue ejecutada a 95 °C durante 5 minutos y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.



#### 5.4.4. Electroforesis del ADN.

Los fragmentos de ADN amplificados fue sometido a electroforesis convencional en gel de agarosa, siguiendo el método descrito por Meyers *et al.* (1976). Para el caso de los fragmentos del gen 16S ADNr amplificados, se preparó un gel horizontal de agarosa al 2 % en regulador TAE 1X (Tris Base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). Para el caso de los fragmentos del gen 18S ADNr amplificados, se preparó un gel horizontal de agarosa al 1 % en regulador TAE 1X. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 80 V, durante 75 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en regulador TAE 1X, durante 15 min. Finalmente los geles fueron se expuestos a luz UV en un transiluminador UV/Vis (MiniBis, Bio Imaging Systems), para visualizar los fragmentos de ADN amplificados. El tamaño de los fragmentos de ADN amplificados, se calculó por comparación con marcadores de ADN de 100 pares de bases (pb) y 1 kilopares de bases (kb) de talla molecular (Invitrogen) y con la ayuda del software Gel quant Versión 2.7.

#### 5.4.5. Purificación de fragmentos de ADN amplificados.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron purificados empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction de QUIAGEN (QUIAGEN Group, HmbH, Germany), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

#### 5.4.6. Secuenciación del ADN purificado.

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. El fragmento del gen 18S ADNr amplificado a partir del ADN de las cepas de levaduras, fue enviado a secuenciar con los oligonucleótidos iniciadores LV1, LV2 (Bautista *et al.* 2003) y 750 Forward (García *et al.*, 2010). El fragmento del gen 16S ADNr amplificado a partir del ADN de las cepas de BAL, fue enviado a secuenciar con los oligonucleótidos iniciadores 16S SENSE y 16S ANTISENSE (Ramos *et al.*, 2009). Las secuencias de ADN obtenidas de los diferentes microorganismos (BAL y levaduras) fueron analizadas para descartar las posibles

secuencias quiméricas, así mismo, editadas y ensambladas con el software BioEdit Sequence Alignment Editor, versión 7.2.5. Posteriormente, las secuencias parciales obtenidas de los genes 16S ADNr de BAL y 18S ADNr de levaduras, fueron sometidas a una búsqueda de secuencias homólogas de bacterias y levaduras descritas y depositadas en la base de datos GenBank, por medio de la herramienta BLASTN versión 2.2.3, en la página de la NCBI (National Center for Biotechnology Information; Centro Nacional de Información Biotecnológica; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) del Instituto de Salud de Estados Unidos. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y la edición de los alineamientos se realizó con el programa CLUSTAL X versión 2.0.11 (Thompson *et al.*, 1997). El alineamiento gráfico mostró las regiones con un alto grado de identidad.

5.4.7. Relaciones de homología entre las secuencias de los genes 16S ADNr de BAL y 18S ADNr de levaduras de las cepas aisladas y secuencias homólogas previamente descritas.

Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y la edición de los alineamientos se realizó con el programa CLUSTAL X versión 2.0.11 (Thompson *et al.*, 1997). El alineamiento gráfico mostró las regiones con un alto grado de identidad. Se efectuaron cinco alineamientos múltiples consecutivos y el último alineamiento se usó para establecer un filograma con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando el método de agrupamiento de Neighbor-joining con el índice Poisson (P). Para valorar estadísticamente la significancia de las relaciones presentadas en el filograma se realizaron 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap”.

5.4.8. Análisis del Polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD).

El análisis del Polimorfismo del ADN amplificado al Azar (RAPD) es una técnica basada en la PCR, mismo que requiere un corto tiempo para su ejecución (comparado con otros métodos genéticos), proporciona buenos niveles de discriminación y es aplicable a un gran número de cepas. En este estudio, el análisis de RAPD fue realizado con

cada una de las cepas de BAL y levaduras aisladas. Los perfiles de RAPD fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Bautista-Muñoz *et al.* (2003), empleando los oligonucleótidos iniciadores OPE-18 (5'-GGA CTG CAG A-3') y OPA-18 (5'-AGC TGA CCG T-3') (Invitrogen) (Lockhart *et al.*, 1997).

La separación de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis convencional en geles de agarosa al 1 % en regulador TAE 1X, siguiendo el método descrito por Meyers *et al.* (1976) mencionado en la sección 5.4.4. El tamaño de los fragmentos se calculó por comparación con un marcador de talla molecular de DNA 1 kpb (Invitrogen) y con la ayuda del software Gel quant Versión 2.7. Posteriormente, las cepas fueron agrupadas por comparación de los patrones de RAPD obtenidos.

## 5.5. Evaluación de BAL y levaduras aisladas del queso crema artesanal

### 5.5.1. Inoculación de la leche pasteurizada con las cepas de BAL y levaduras aisladas

El queso crema manufacturado con las cepas de BAL y levaduras aisladas, fue elaborado en la quesería artesanal “La Cabaña”, ubicada en el municipio de Rayón, Estado de Chiapas, empleando leche de vaca producida en la región. Se realizó un análisis de calidad fisicoquímica a la leche cruda, utilizando el equipo Analizador de leche ultrasónico (Lactoscan SA50). Se realizó un conteo de células somáticas con el equipo Delaval Cell Counter DCC SE2250, se estandarizó la leche a 3 % de grasa y se pasteurizó a temperatura de 73 °C por 15 segundos, se bajó la temperatura a 37 °C y se inoculó con cultivos lácticos al 2 % (cepas de BAL) y cultivos de levaduras al 2 %.

Los cultivos lácticos y de levaduras al 2%, fueron preparados con base al volumen de leche empleada en la elaboración de los quesos con leche pasteurizada. Las cepas puras de BAL fueron inoculadas en medio líquido MRS e incubadas en condiciones anaeróbicas a 30 °C, durante 48 h. Las cepas puras de levaduras fueron inoculadas en medio líquido YPL, a 28 °C, en agitación constante a 200 r.p.m., durante 48 h. Posteriormente, la biomasa de todas las cepas BAL y levaduras, por separado, fueron lavadas con regulador de fosfatos al 5% y finalmente resuspendidas en una solución

nueva de regulador de fosfatos al 5%. Este inóculo fue agregado a la leche pasteurizada al 2%, siguiendo los tratamientos mencionados a continuación (Callon *et al.*, 2014).

Se estudiaron 5 tratamientos (T):

T1: Leche pasteurizada + inóculo de bacterias ácido lácticas (BAL) + inóculo de levaduras (LEV)

T2: Leche pasteurizada + inóculo de levaduras (LEV)

T3: Leche pasteurizada + inóculo de bacterias lácticas (BAL)

T4: Leche pasteurizada (testigo negativo) (BCO)

T5: Leche cruda (testigo positivo) (ARTESANAL)

Donde el inóculo de BAL consistió en una mezcla de 19 cepas y el inóculo de levaduras consistió en una mezcla de 25 cepas, mismas que fueron aisladas a partir del queso artesanal, elaborado con leche cruda de vaca en el municipio de Rayón, Chiapas. Las 19 cepas de BAL se cultivaron por separado en medio líquido MRS modificado con lactosa, incubado a 30 °C, en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. Las cepas de levaduras se cultivaron por separado en medio líquido Peptona de caseína, extracto de levadura y lactosa (YEPL), incubado a 28 °C, en agitación a 200 rpm durante 48 horas. Los tratamientos (BAL + LEV), LEV, BAL y BCO, consistieron en 20 litros de leche pasteurizada y el tratamiento ARTESANAL consistió en 20 litros de leche cruda. Por cada 10 L de leche, se agregó 1 ml de cuajo (fuerza 1:10000), el cual fue diluido 1:10 en agua destilada y se agregó 1.5 g de cloruro de calcio (CaCl). A continuación, se agregaron los cultivos de BAL al 2 % y de levaduras al 2 % en base al volumen de leche misma que se dejó en proceso de fermentación durante 18 horas. Posteriormente, a todos los tratamientos en condiciones asépticas, se realizó el corte del gel (cuajada) y el suero fue drenado por 4 horas aproximadamente. La cuajada semiseca fue colocada en bolsas de manta estériles para facilitar el desuerado. De esta forma, el suero fue eliminado hasta dejar aproximadamente 1/3. Se agregó NaCl (sal de mesa) en una concentración de 5% con respecto a la masa de la cuajada. A

continuación, la cuajada fue amasada durante 5 minutos, para que la sal se incorporara uniformemente. Se colocó 1.5 kg de cuajada en mantas y posteriormente en moldes de 15 x 15 cm aproximadamente, donde la cuajada fue moldeada y prensada durante 2 a 4 horas aproximadamente. Finalmente, los quesos ya formados en cubos de 15 x 15 cm, fueron retirados del prensado y de los moldes, empacados en bolsas de polietileno y almacenados en refrigeración a 4 °C hasta ser transportados en hieleras al taller de alimentos del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

## 5.6. Análisis fisicoquímico del queso crema artesanal.

### 5.6.1. Humedad.

La humedad del queso crema se determinó de acuerdo al método 926.08 del AOAC con secado, peso constante a presión atmosférica. Se utilizó una estufa modelo HDT - 28 Marca TECSA, con un rango de temperatura de 0 – 250 °C.

Para calcular el porcentaje se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_2 - P_1)}{M} \times 100$$

Dónde:

P2= Peso de la cápsula y la muestra húmeda en g

P1= Peso de la cápsula y la muestra seca en g

M = Peso de la muestra en g

NOTA: La determinación fue realizada por triplicado y la diferencia no debe ser superior al 5 % del promedio (A. O. A. C, 1990).

### 5.6.2. Contenido de sal (NaCl)

Para las determinaciones de NaCl en el queso crema, se utilizó el método 935.43 de la AOAC (2004) y aproximadamente 3 g de muestra descortezada y bien molida. La muestra se deposita en un matraz con 25 ml de  $\text{KNO}_3$  0.1 N para favorecer la reacción con los cloruros presentes. Después de hervir la mezcla con 10 ml de  $\text{HNO}_3$ , exento de halógenos y 50 ml de agua destilada por 10 min, se agregaron 15 ml de solución de permanganato de potasio al 5 %, en fracciones de 3 ml para obtener una solución amarilla transparente. Una vez enfriada y filtrada en un matraz aforado de 250 ml, la solución se lavó minuciosamente en agua destilada a 20 °C, se agregaron 25 ml  $\text{AgNO}_3$  a 0.05 M (o su equivalente) y se valoró el exceso de la solución de  $\text{AgNO}_3$  0.1N en alícuotas de 100 ml con una solución de KCNS 0.1 N. Como indicador, se adicionaron 2 ml de solución saturada de sulfato de amonio y hierro III, hasta obtener un precipitado café oscuro a rojizo.

### 5.6.3. Acidez

La determinación de acidez, se realizó de acuerdo al método 920.124 del AOAC, el cual consiste en añadir agua destilada a 40 °C a 10 g de queso crema finamente molido, contenido en un frasco volumétrico para aforar a un volumen de 100 ml.

En general la titulación se realizó de la manera siguiente. Se llenó una bureta con una solución de NaOH 0.1 N valorada y se registró la lectura de la cantidad de solución en la bureta. La muestra en solución se depositó en un matraz Erlenmeyer y se le adicionaron 5 gotas (una por una) de fenolftaleína al 1 %, para realizar la titulación con agitación lenta. Cuando se dio el vire de la solución a color rosa se suspendió la adición de NaOH y se continuó agitando por 15 segundos para estabilizar la reacción. En caso contrario, se adicionó una gota extra de NaOH para terminar la titulación. Se tomó la lectura del volumen dispensado en la bureta y se estimó la cantidad NaOH usado para neutralizar la acidez de la muestra. Con estos valores se estimó la acidez de cada muestra.

#### 5.6.4. Determinación de pH

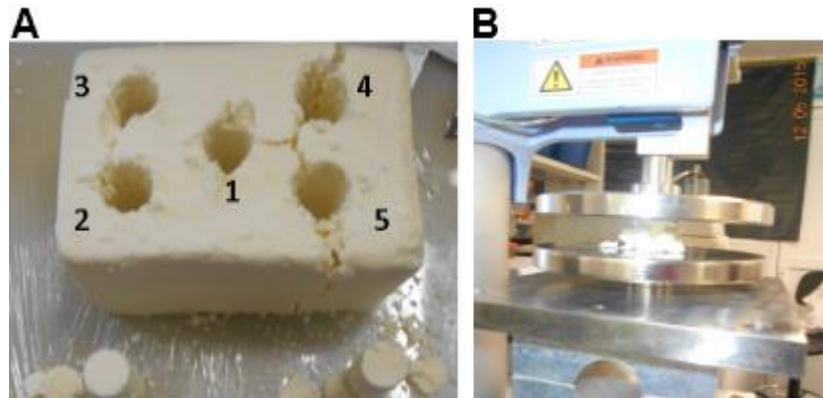
Se realizó con un potenciómetro con electrodo de vidrio (Marca Hanna, modelo 993100). Previo a la determinación, 3 g de muestra de queso crema se mezclaron con agua destilada (v. g. 1/3 de su peso) para obtener una pasta suave en la cual se insertó el electrodo para tomar la lectura. Cabe señalar que la lectura de pH realizada con una mezcla así tratada es ligeramente más elevada debido al efecto de dilución producido por el agua incorporada.

#### 5.6.5 Actividad de agua (Aw)

Se realizó con un dispositivo Aw sprint, marca Novasina, modelo TH - 500. Consta de una celda, la cual tiene un sensor por medio del cual mide la humedad relativa del queso, funciona entre 0 °C a 50 °C. Se coloca una muestra del producto obtenido en la celda, y se efectúa la lectura a 25 °C.

#### 5. 7. Textura del queso crema

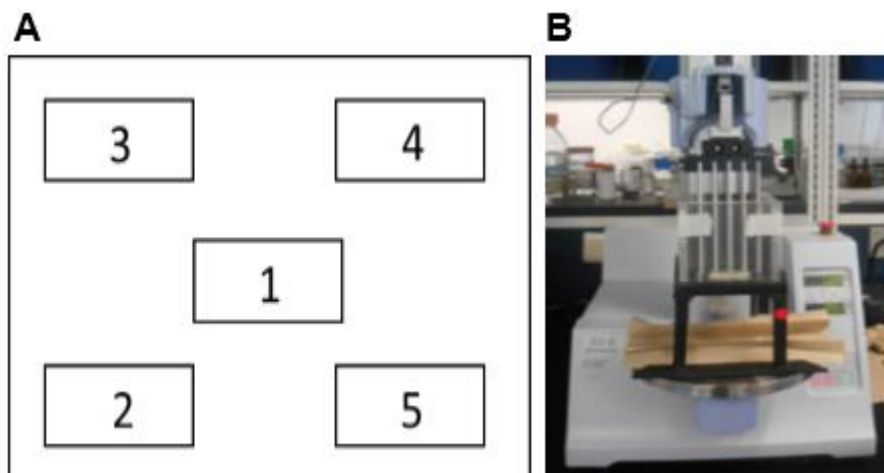
La determinación del perfil de textura (TPA) se realizó tomando muestras de queso crema en forma de cilindros de geometría uniforme (Diámetro 18 mm, altura 60 mm), utilizando un sacabocados accesorio del texturómetro (Texture Analyzer, marca Zhimadzu modelo EZ-S). Este equipo está diseñado para determinar la fuerza de compresión y tensión (Figura 7). Tiene un sensor de fuerza de 500 N. El análisis se realizó con el programa TRAPEZIUM Versión 1.04 SP Rheometer. Se hicieron 5 determinaciones por tratamiento y las muestras fueron tomadas como se indica en la figura 7, en el sentido de las manecillas del reloj.



**Figura 7.** Determinación del perfil de textura, empleando el Texturómetro (Texture Analyzer, marca Zhimadzu modelo EZ-S). (A) Toma de muestra y (B) Texturómetro.

### 5. 8 Esfuerzo cortante.

La determinación del esfuerzo cortante se realizó con el texturómetro antes mencionado, tomando muestras de queso crema en forma de bloques de geometría uniforme (Longitud 25 mm, Ancho 20 mm, espesor 5 mm). Se tomó una lectura por bloque el cual se extrajo de 5 secciones del queso muestra, en el sentido de las manecillas del reloj (Figura 8).



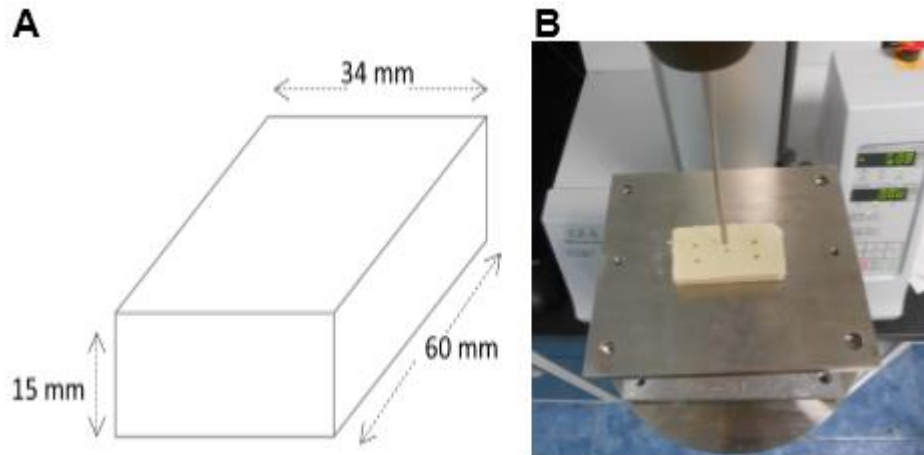
**Figura 8.** Determinación del esfuerzo cortante, empleando el Texturómetro (Texture Analyzer, marca Zhimadzu modelo EZ-S). (A) Toma de muestra y (B) Texturómetro.

### 5.9 Resistencia a la penetración

La determinación de resistencia a la penetración se realizó con el texturómetro antes mencionado, tomando muestras de queso crema en forma de bloques de geometría



uniforme (Longitud 60 mm, Ancho 34 mm, espesor 15 mm). Las lecturas se tomaron en 5 puntos del bloque en el sentido de las manecillas del reloj, los bloques se tomaron de la parte central de cada queso (Figura 9).



**Figura 9** Determinación de la resistencia a la penetración, empleando el Texturómetro (Texture Analyzer, marca Zhimadzu modelo EZ-S). (A) Toma de muestra y (B) Texturómetro.

### 5.10 Color

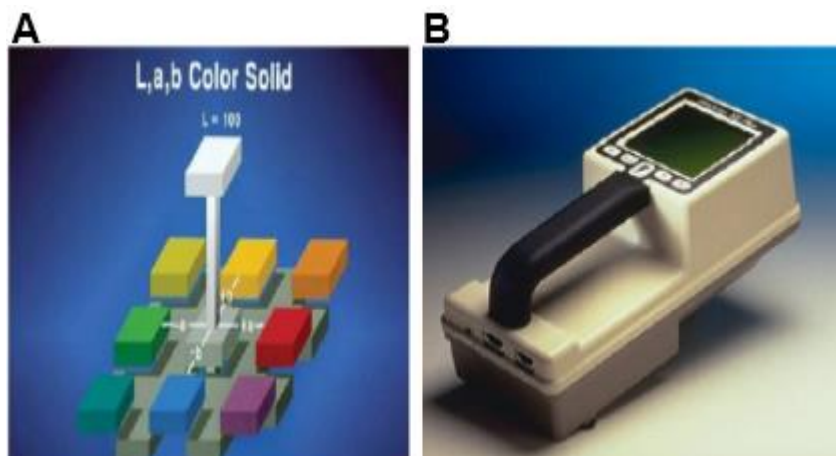
La determinación de color del queso crema se realizó con un colorímetro de reflexión, marca Hunter Lab, Modelo Miniscan (USA) (Figura 10). El colorímetro se calibró con una placa blanca de porcelana proporcionada por el proveedor y sus valores fueron (L= 93.64, a= -0.73 y b= 0.29). Con éste se midió el color del queso crema. El equipo se colocó sobre la superficie y se realizó el escaneo de color en los tratamientos. Los parámetros que caracterizan los colores son a, b y L. El eje L o luminosidad (designa brillantez) va de del 0 que corresponde al negro, al 100 que correspondiente al blanco. Los otros dos ejes de coordenadas: a, representa variación del rojo (valores positivos) al verde (valores negativos) y b, representa variación del amarillo (valores positivos) y el azul (valores negativos) (Hunter Lab, 2001).

Una vez obtenidos los valores de L, a y b utilizando la escala Hunter, se obtuvo el valor de  $\Delta E$  utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Dónde:  $\Delta E$ = Diferencia total del color, entre el color de la muestra y el de referencia.

$\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  = Diferencias absolutas de los valores correspondientes de L, a y b de los valores determinados en la muestra, menos los valores de los quesos control (ARTESANAL). Se reportaron los valores de L, a, b y  $\Delta E$ .



**Figura 10.** Determinación de color empleando el colorímetro de reflexión, marca Hunter Lab, Modelo Miniscan (USA). (A) Escala cromática L, a y b del colorímetro; (B) Colorímetro Hunter Lab.

### 5.11. Evaluación sensorial.

Se realizó el análisis sensorial para comparar las características del queso hecho con leche pasteurizada y cultivos mixtos de bacterias ácido lácticas y levaduras, con el queso artesanal de Rayón Chiapas. Se evaluaron cuatro muestras de quesos manufacturados con leche pasteurizada e inoculados con cultivos lácticos [T1 (BAL+LEV), T2 (LEV) y T3 (BAL)] y T4 (BCO), este último, no se inoculó con cultivos, contra el queso artesanal elaborado con leche sin pasteurizar (Tratamiento ARTESANAL) (Tabla 8).

Las muestras fueron evaluadas usando el método del perfil ideal (IPM) con la participación de 140 consumidores del municipio de Cárdenas, Tabasco, México, donde cada consumidor evaluó dos muestras de los cinco tratamientos siguiendo un diseño experimental por bloques balanceados incompletos plan 11.5 (Cochran y Cox, 1954): T=5 tratamientos, K=2 muestras por consumidor, r = 4 repeticiones de cada tratamiento por bloque, b=10 bloques,  $\lambda=1$ , E=0.62 y Tipo V. El diseño se repitió 14 veces para asegurar un total de 56 evaluaciones por muestra.

Los atributos sensoriales se determinaron empleando la técnica de Grupos de Enfoque (Kemp *et al.*, 2009) y con la ayuda de un grupo de 10 personas que participaron degustando muestras de cinco gramos de queso de los cinco tratamientos a cada uno. Los participantes percibieron los atributos de las muestras en el orden: apariencia, textura, aroma, y sabor. Posteriormente a cada participante se le pidió que registrara en un formato, los atributos que fue encontrando en sus respectivas muestras. Finalmente, se hizo un consenso entre los 10 participantes para concluir sobre los atributos encontrados; de tal manera que los atributos que se usaron para esta evaluación sensorial fueron: atributos de apariencia (tono crema), atributos de textura (dureza al tacto, dureza en boca y elasticidad), atributos de aroma (aroma y aroma a establo) y atributos de sabor (salado, amargo y ácido).

Previo a la prueba con consumidores, las muestras fueron estabilizadas durante 1 hora a 25 °C. Las mismas, fueron presentadas sobre un plato, cortadas en forma de cubos de 2 x 2 x 2 cm, con una masa de aproximadamente 6.5 g (Tabla 9), debidamente codificadas con una letra mayúscula elegida al azar.

**Tabla 8.** Aleatorización de los tratamientos

<b>Código / Tratamientos</b>	
<b>A</b>	T4 (BCO)
<b>B</b>	T5 (ARTESANAL)
<b>C</b>	T3 (BAL)
<b>D</b>	T1 (BAL+LEV)
<b>E</b>	T2 (LEV)

**Tabla 9.** Configuración de la prueba.

Repeticiones	Lecturas	N° muestra/trat	Peso de la muestra (g)	Masa total de la muestra por tratamiento (g)
4	14	56	6.5	364.0

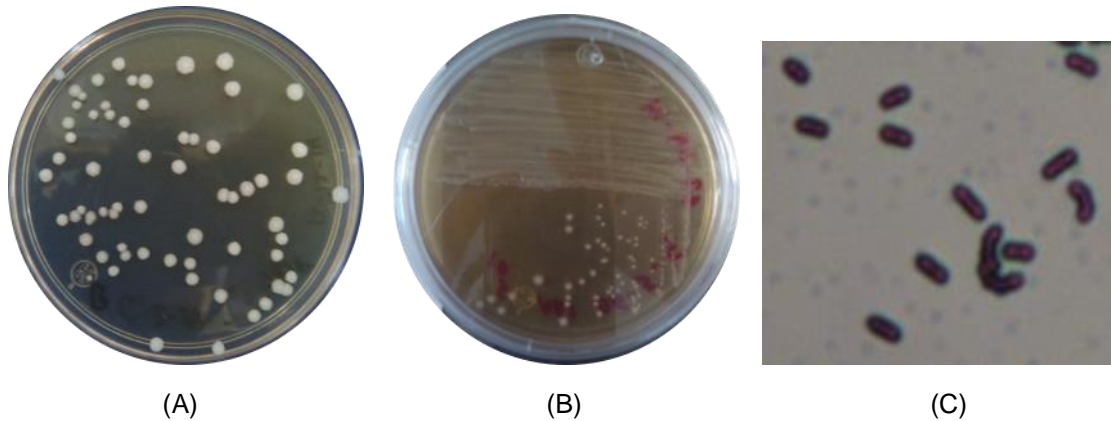
Se aplicó un cuestionario a 140 consumidores elegidos al azar, con preguntas de tipo demográfico y en seguida valorar las muestras de queso que le fueron proporcionadas tanto en sus intensidades percibidas como en su propio nivel preferido o ideal para una lista de 9 atributos en una escala de 10 cm no estructurada. También se les pidió indicar si las muestras fueron aceptables, su intención de compra y su intención de compra si el queso hubiera sido fabricado con leche cruda, esto en una escala binomial (si/no).

El análisis estadístico para la prueba sensorial, se realizó con el diseño de bloques incompletos balanceados, usando software R versión 1.0.1 (2000).

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento y purificación de las BAL y levaduras a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas.

Los números de *Lactobacillus* variaron entre 5.6 y 5.87 log ufc g<sup>-1</sup> en el queso crema artesanal elaborado en la región de Rayón en el estado de Chiapas (Tabla 10). Se formó un banco de 19 cepas de BAL, las cuales presentaron las características del género *Lactobacillus* en relación a su morfología de bacilos, tinción de Gram positivos, capacidad de crecer en ausencia de O<sub>2</sub>, reacción catalasa negativas, ausencia de esporas y producción predominante de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos simples (Figura 11). Sus características bioquímicas se presentan en la (Tabla 11).

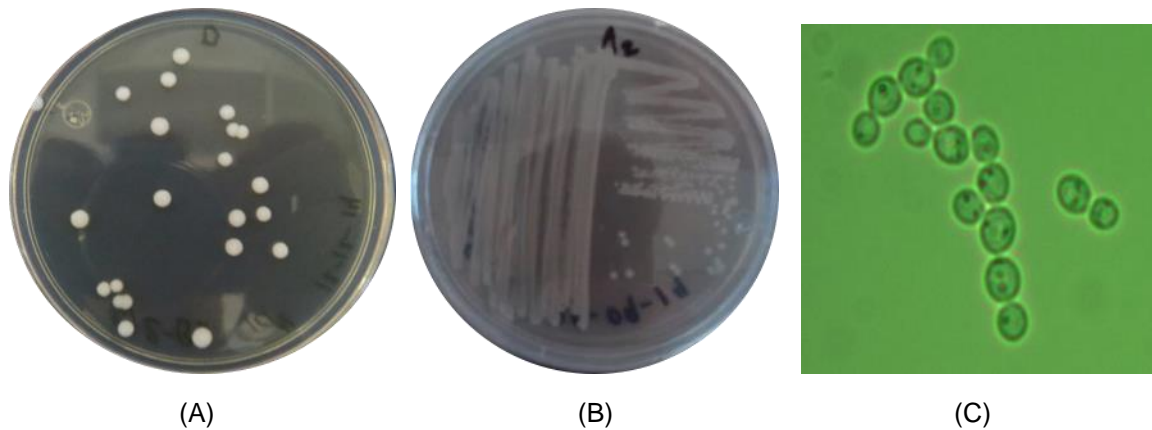


**Figura 11.** Aislamiento y purificación de cepas de BAL a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas. (A) Aislamiento, (B) Purificación y (C) Morfología microscópica de bacilos de la cepa JCABB13, Aumentada a 1000x.

**Tabla 10.** Recuento de BAL y levaduras del queso artesanal de Rayón, Chiapas.

MUESTRA	FECHA DE ELABORACION	(log UFC g <sup>-1</sup> )	
		BAL	Levaduras
1	02/08/2014	5.61	5.76
2	06/08/2014	5.77	5.63
3	12/08/2014	5.60	5.53
4	17/08/2014	5.87	5.61

En el caso de las levaduras, el número varió entre 5.53 y 5.76 log ufc g<sup>-1</sup> en el queso artesanal elaborado en la región de Rayón en el estado de Chiapas. La NOM 243 SSA 2010 indica que los límites máximos permitidos para mohos y levaduras en quesos madurados no debe rebasar los 2.7 log ufc/g, salvo que para su maduración requieran de hongos estos pueden estar fuera de este límite (DOF, 2010). Se formó un banco de 25 cepas de levaduras cuyas características fueron colonias de color crema opaco, la observación al microscopio mostró células globulares en gemación, muy similares a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 12). Su perfil de fermentación de carbohidratos se presenta en la tabla 16.



**Figura 12.** . Aislamiento y purificación de cepas de levaduras, a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas. (A) Aislamiento, (B) Purificación y (C) Morfología microscópica de células levaduriformes de la cepa Q12-A2, aumentado a 1000x.

Estos resultados son similares a los reportados por Montel (2014) quién encontró presencia de 13 géneros de levaduras en quesos tradicionales europeos con recuentos de 6 – 8 log ufc/cm<sup>2</sup>.

## 6.2. Características bioquímicas de las BAL.

El perfil de fermentación de carbohidratos (Tabla 11) muestra básicamente la fermentación de varios carbohidratos por las cepas de BAL entre otras características que resultaron del proceso de caracterización bioquímica de la BAL.

**Tabla 11.** Características bioquímicas de las cepas de BAL aisladas del queso crema artesanal de Rayón, Chiapas.

COMPUESTO	<i>L. fermentum</i> JCABB1	<i>L. pseudomesenteroides</i> JCABB2	<i>L. pseudomesenteroides</i> JCABB3	<i>L. pseudomesenteroides</i> JCABB4	<i>L. pseudomesenteroides</i> JCABB5	<i>L. pseudomesenteroides</i> JCABB6	<i>L. pseudomesenteroides</i> JCABB7	<i>L. pseudomesenteroides</i> JCABB8	<i>L. fermentum</i> JCABB9	<i>L. plantarum</i> JCABB10	<i>L. plantarum</i> JCABB11	<i>L. plantarum</i> JCABB12	<i>L. plantarum</i> JCABB13	<i>L. plantarum</i> JCABB14	<i>L. plantarum</i> JCABB15	<i>L. plantarum</i> JCABB16	<i>L. plantarum</i> JCABB17	<i>L. helveticus</i> JCABB18	<i>L. helveticus</i> JCABB19
	CO <sub>2</sub> from glucose	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH <sub>3</sub> from arginina	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10°C	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
15°C	±	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
42°C	+	-	-	-	±	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
45°C	+	-	-	±	±	-	-	-	+	+	-	-	±	-	±	±	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Ribosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-Xilosa	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
D-Galactosa	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Metil-αD-Glucopiranosida	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N-AcetilGlucosamina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Esculina	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Salicina	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Maltosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Lactosa	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
Trehalosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Rafinosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gentiobiosa	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-Turanosa	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gluconatopótasio	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
2- Cetogluconato potásico	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5- Cetogluconato potásico	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuente de la cepa	Q1	Q2							Q3							Q4			
Recuento UFC/g	4.03x10 <sup>5</sup>	5.87x10 <sup>5</sup>							4.01x10 <sup>5</sup>							7.33x10 <sup>5</sup>			

*Lactobacillus fermentum* (JCABB1 y JCABB9), *Lactobacillus pseudomesenteroides* (JCABB2, JCABB3, JCABB4, JCABB5, JCABB6, JCABB7 y JCABB8), *Lactobacillus plantarum* (JCABB10, JCABB11, JCABB12, JCABB13, JCABB14, JCABB15, JCABB16 y JCABB17), *Lactobacillus helveticus* (JCABB18 y JCABB19). Q1 (Muestra de queso colectado el 02/08/14), Q2 (Muestra de queso colectado el 06/08/14), Q3 (Muestra de queso colectado el 12/08/14), Q4 (Muestra de queso colectado el 17/08/14). (+) Reacción positiva, (-) Reacción negativa, (±) Reacción débil. Todas las cepas fermentaron D-Glucosa y D-Fructosa, ninguna fermentó L-Arabinosa. Las cepas fueron identificadas a nivel de género y especie, con base en la secuencia del gen 16S ADNr.

Las características fisiológicas de la cepa *L. fermentum* de este estudio son similares a las características observadas en otros *L. fermentum* presentados en la literatura, particularmente en la producción de CO<sub>2</sub> y en los carbohidratos fermentados siguientes: galactosa, glucosa, fructosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa; pero se diferencia en que no fermenta ribosa y maltosa, que generalmente son fermentados por esta especie (Hammes y Vogel 1995, Hammes y Hertel 2006 y Ludwig *et al.*; 2011). Sin embargo, Ramos *et al.* (2009), encontraron que la maltosa no fue fermentada por *L. fermentum* del queso crema de Tabasco.

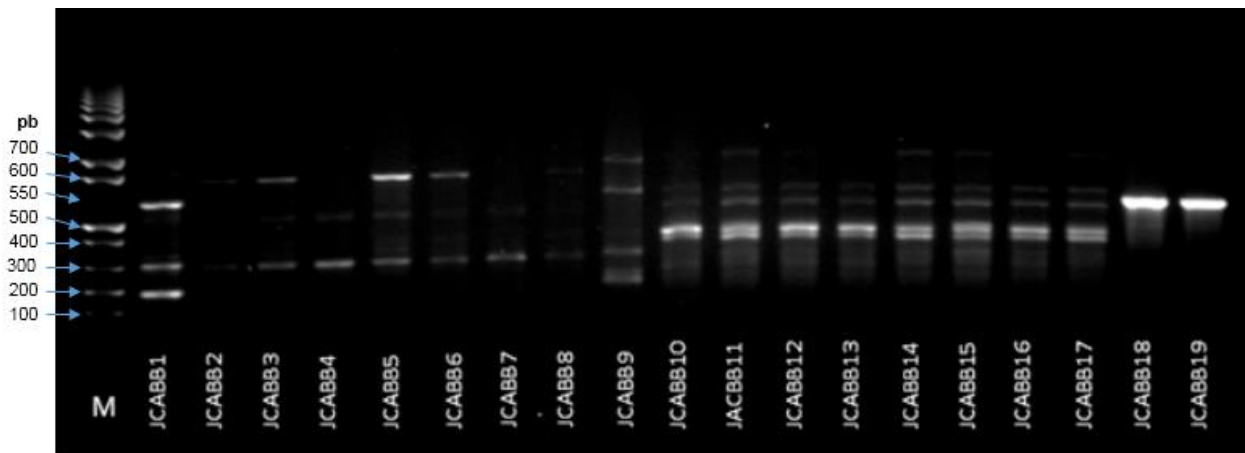
Algunas de las especies filogenéticamente cercanas a *L. fermentum* que fermentan la ribosa, son *L. gastricus* y *L. vaginalis*; pero en el análisis de similitud de nucleótidos BLAST, estas especies, no aparecen genéticamente relacionadas, y en otras características fisiológicas como el perfil de fermentación de carbohidratos también difieren (Roos *et al.*, 2005).

Las características fisiológicas y del perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas JCABB18 y JCABB19 son similares a *L. helveticus* (Hammes & Vogel, 1995, Hammes, W. P., & Hertel, C. 2006 y Ludwig *et al.*; 2011), sin embargo, difiere en que la cepa de este estudio creció a 15 °C pero a 45 °C no hubo crecimiento.

### 6.3 Análisis de RAPD de las cepas de BAL.

El patrón de bandas del RAPD, de las 19 cepas de BAL aisladas, con el Oligo-2 (OPA-18) muestra cuatro patrones de bandas: patrón 1 (JCABB1, JCABB9), patrón 2 (JCABB2, JCABB3, JCABB4, JCABB5, JCABB6, JCABB7, JCABB8), patrón 3 (JCABB10, JCABB11, JCABB12, JCABB13, JCABB14, JCABB15, JCABB16, JCABB17) y patrón 4 (JCABB18, JCABB19) (Figura 12).





**Figura. 13.** Patrones de RAPD para cepas de especies de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* con el oligonucleótido iniciador OPA-18. Carril 1, marcador de talla molecular, carriles; 2 – 20, *Lactobacillus fermentum* (JCABB1 y JCABB9), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (JCABB2, JCABB3, JCABB4, JCABB5, JCABB6, JCABB7 y JCABB8), *Lactobacillus plantarum* (JCABB10, JCABB11, JCABB12, JCABB13), *Lactobacillus helveticus* (JCABB18 y JCABB19). Las cepas fueron identificadas a nivel de género y especie, con base en la secuencia del gen 16S ADNr.

#### 6.4 Identificación de las cepas de BAL por análisis de la secuencia del gen ADNr

Mediante pruebas bioquímicas y moleculares efectuadas a 19 cepas de BAL del queso artesanal de Rayón, Chiapas, se obtuvieron las identidades que se indican en la tabla 12. Las cepas que corresponden a *Lactobacillus fermentum* y *L. plantarum* coinciden con dos de tres cepas reportadas por Ramos *et al.* (2009), quienes aislaron *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. pentosus* en el queso crema tropical usando los mismos iniciadores. *L. plantarum* también fue reportada por Morales *et al.* (2011) quienes la aislaron en el queso doble crema artesanal elaborado en Chiapas.

Las especies de BAL aisladas del queso artesanal de Rayón, Chiapas, son especies comunes entre las BAL y es importante señalar que al igual que en este estudio, han sido reportadas como especies dominantes en quesos manufacturados con leche que procede de diferentes continentes y tipos de animales (vaca, oveja, cabra, yak) (Liu *et al.*, 2014), de diferentes regiones geográficas con diferentes climas (desde la región de los Himalayas hasta la región desértica de Egipto). Así mismo, algunos quesos tienen características similares al queso artesanal de Rayón, Chiapas, por sus características de pH, humedad, acidez, como el queso Feta que es relativamente ácido debido a que su pH se encuentra en un intervalo de 4.42 a 5.05, así como en otros quesos en los

que se han aislado especies de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* entre otras especies destacando a *Lactobacillus plantarum* como agente importante en los procesos de maduración (Rantsiou *et al.*, 2008), este último ha sido aislado de otros quesos ácidos como el queso Cottage Chutpi elaborado en la India; de quesos de Egipto como el Domiati y el Gbnah Beeda y se ha encontrado como especie predominante en leche cruda de vaca hasta en un 60 % de las especies de *Lactobacillus* presentes (Liu *et al.*, 2014). Se ha encontrado a *L. fermentum* en el queso Ras elaborado en Egipto, está incluido en los cultivos iniciadores naturales para la elaboración del queso Italiano como el Parmigiano, Reggiano de Italia y en diversos quesos Italianos y quesos Suizos; también ha sido reportado como especie dominante de *Lactobacillus* entre otras especies en la leche Garis la cual es una leche tradicionalmente fermentada de alta acidez que se elabora en Sudan; también ha sido encontrado en diversos productos chinos como el Kurut elaborado con leche fermentada de yak y en otras leches fermentadas de vaca, oveja y de cabra, y en quesos Italianos elaborados con leche cruda como el Parmigiano Reggiano, en quesos elaborados en China con leche de cabra (Liu *et al.*, 2014). Se ha encontrado a *L. Helveticus* en el queso Qula, el cual es un queso duro de color amarillo o blanco elaborado con leche de yak en la meseta tibetana de China (Liu *et al.*, 2014).

Las secuencias nucleotídicas de los fragmentos del gen 16S DNAr amplificadas para cada una de las cepas de (BAL) se pueden apreciar en el (Anexo 1).

Se obtuvieron los parientes a nivel de especie dentro de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* más próximos, el número de bases diferentes en relación al total de bases comparadas y su respectivo porcentaje de similitud en los pares de bases para las cepas de BAL aisladas del queso artesanal de Rayón, Chiapas (Tabla 12).

**Tabla 12.** Porcentaje de identidad de las secuencias del gen 16S ADNr de las cepas de BAL aisladas con las secuencias de referencias de los parientes más próximos.

Cepa	Numero de acceso GenBank	Parientes más próximos dentro de los géneros de BAL	Bases idénticas/total de bases comparadas	Porcentaje máximo de identidad
JCABB1	KT999396	<i>L. fermentum</i>	618/618	100
JCABB2	KU054310	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	567/572	99
JCABB3	KU054311	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	628/633	99
JCABB4	KU054312	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	584/589	99
JCABB5	KU054313	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	590/595	99
JCABB6	KU054314	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	620/625	99
JCABB7	KU054315	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	590/595	99
JCABB8	KU054316	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	625/631	99
JCABB9	KT999397	<i>L. fermentum</i>	653/653	100
JCABB10	KU054317	<i>L. plantarum</i>	648/648	100
JCABB11	KU054318	<i>L. plantarum</i>	650/650	100
JCABB12	KU054319	<i>L. plantarum</i>	649/649	100
JCABB13	KU054320	<i>L. plantarum</i>	621/621	100
JCABB14	KU054321	<i>L. plantarum</i>	642/642	100
JCABB15	KU054322	<i>L. plantarum</i>	642/642	100
JCABB16	KU054323	<i>L. plantarum</i>	646/646	100
JCABB17	KU054324	<i>L. plantarum</i>	647/647	100
JCABB18	KU054325	<i>L. helveticus</i>	635/639	99
JCABB19	KU054326	<i>L. helveticus</i>	647/651	99

*Leu:* *Leuconostoc*, *L. Lactobacillus*

Los géneros con mayor similitud con las cepas aisladas del queso artesanal de Rayón, Chiapas son *L. plantarum* con 8 cepas y *Leu. Pseudomesenteroides* con 7 cepas, seguidos por *L. fermentum* y *L. helveticus* cuya similitud es menor al relacionarse cada género con 2 cepas (Figura 14).

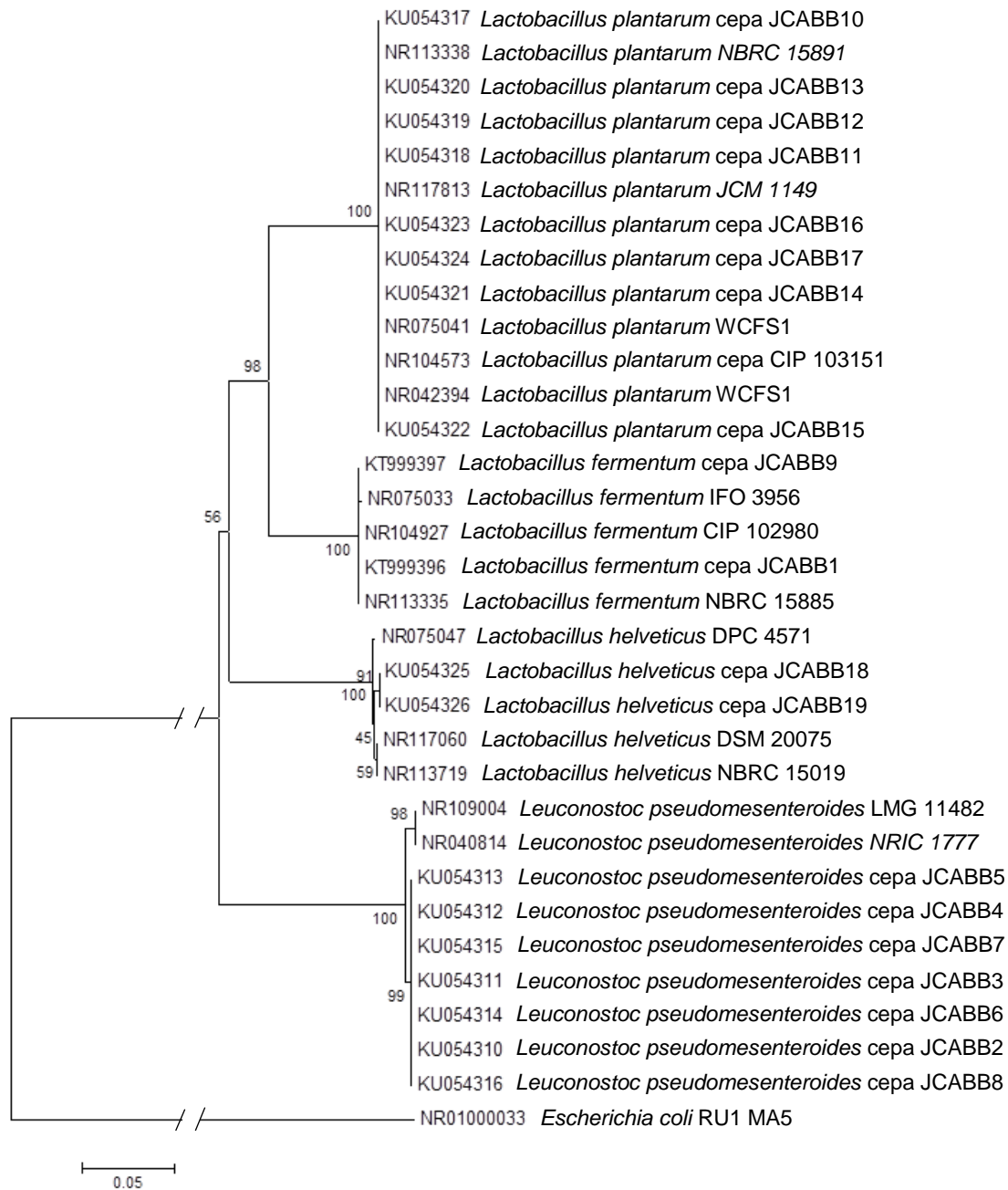
Aunque la identificación de muchas BAL se puede hacer con pruebas morfológicas, metabólicas y fisiológicas (Axelson, 1993), es necesario el uso de técnicas moleculares, basadas en la secuenciación del 16S DNAr, con la finalidad de lograr una caracterización e identidad de las cepas de BAL con mayor seguridad (Holzapfel *et al.*, 2001).

Sin embargo, se sabe que la identidad de la secuencia del 16S DNAr no es suficiente para garantizar la identificación de las especies (Fox *et al.*, 2003). A veces es necesario también incluir la caracterización de otras secciones del DNA ribosomal, como son la región entre el 16S y el 23S (Singh *et al.*, 2009), el 23S o el 5S, esto debido al alto nivel de similitud de nucleótidos del 16S, que no permiten distinguir entre algunas cepas muy parecidas como es *L. plantarum* y *L. pentosus* (Bringel *et al.*, 1996).

6.4.1 Relaciones de homología entre las secuencias codificantes de genes 16S DNAr de cepas de BAL aisladas a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas y otras y otras BAL previamente descritas

Estudios basados en la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 16S ADNr descrito por Ramos *et al.* (2009) muestran las relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 16S ADNr amplificado a partir del ADNr de las 19 cepas con las secuencias nucleotídicas de genes 16S ADNr de BAL reportadas en el GenBank de la NCBI (Figura 14) y cuyo porcentaje de identidad compartido fluctúa entre el 98 al 100 %, como se indicó en la tabla 12.

El filograma (Figura 14), muestra las relaciones de similitud entre las secuencias nucleotídicas de los fragmentos del gen 16S DNAr de las cepas de BAL aisladas. (JCABB1, JCABB2, JCABB3, JCABB4, JCABB5, JCABB6, JCABB7, JCABB8, JCABB9, JCABB10, JCABB11, JCABB12, JCABB13, JCABB14, JCABB15, JCABB16, JCABB17, JCABB18 y JCABB19) y las secuencias de especies relacionadas del género *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. helveticus* y *L. plantarum*) y las secuencias del género *Leuconostoc* (*Leu. pseudomesenteroides*) reportadas en el GenBank de la NCBI.



**Figura 14.** Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 16S DNAr de las cepas de BAL aisladas a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas y las secuencias nucleotídicas de los genes 16S ADNr de otras BAL relacionadas. La comparación filogenética se basó en el análisis de las secuencias nucleotídicas con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P) y el método de agrupamientos de Neighbour-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.

6.5 Características bioquímicas de las cepas de levadura.

**Tabla 13.** Características bioquímicas de las cepas de levadura aisladas del queso artesanal de Rayón, Chiapas.

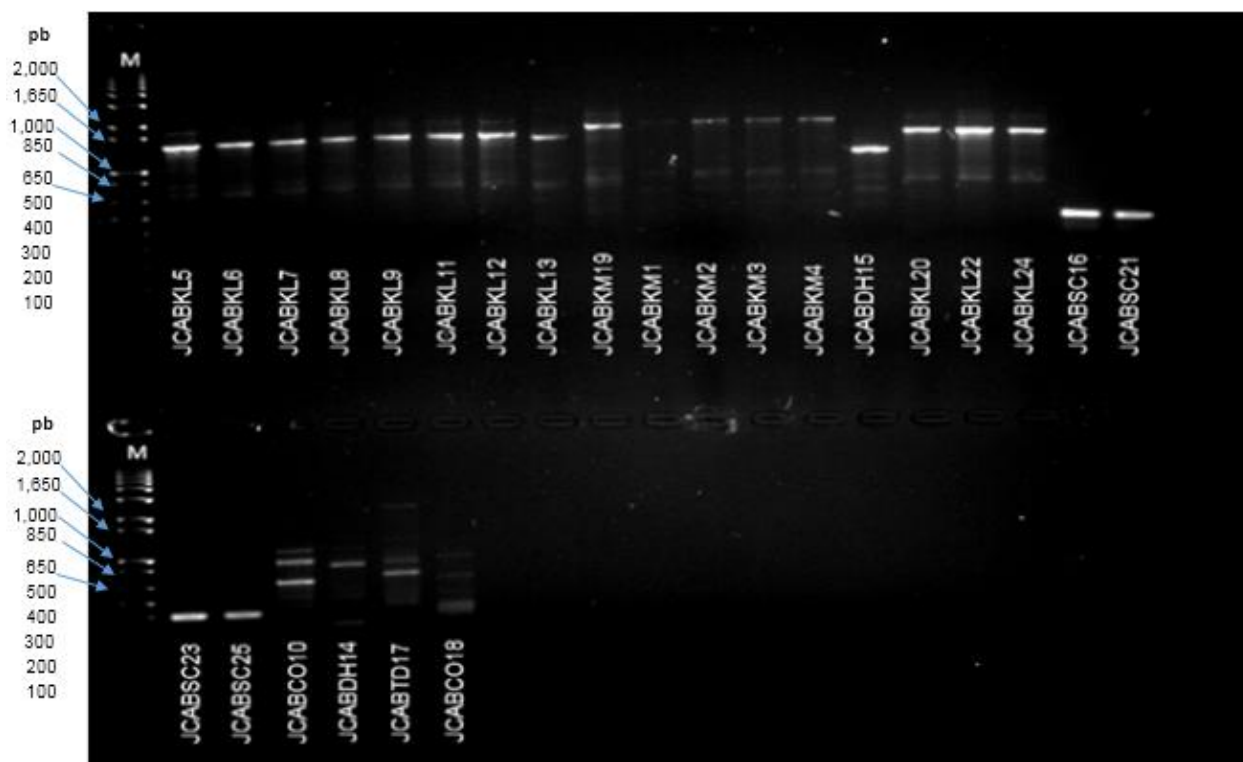
COMPUESTO	<i>Kluyveromyces marxianus</i> JCABKM1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> JCABKM2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> JCABKM3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> JCABKM4	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL5	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL6	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL7	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL8	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL9	<i>Candida orthopsilosis</i> JCABCO10	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL11	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL12	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL13	<i>Debaryomyces hansenii</i> JCABDH14	<i>Debaryomyces hansenii</i> JCABDH15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCABSC16	<i>Torulaspota delbrueckii</i> JCABTD17	<i>Candida orthopsilosis</i> JCABCO18	<i>Kluyveromyces marxianus</i> JCABKM19	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCABSC21	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCABSC23	<i>Kluyveromyces lactis</i> JCABKL24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCABSC25
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
2-ceto-Gluconato cálcico	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
D-Xylosa	+	+	+	±	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Xylitol	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
D-Galactosa	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Inositol	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
D-Sorbitol	-	±	±	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
Metil-αD-Glucopiranosida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
N-Acetil-Glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
D-Celobiosa	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
D-Lactosa (origen bovino)	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
D-Maltosa	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	
D-Sacarosa	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
D-Trehalosa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
D-Melezitosa	+	+	+	+	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	
D-Rafinosa	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	
Fuente de la cepa	Q1				Q2				Q3				Q4												
Recuento UFC/g	5.77x10 <sup>5</sup>				4.24x10 <sup>5</sup>				3.39x10 <sup>5</sup>				4.03x10 <sup>5</sup>												

*Kluyveromyces marxianus* (JCABKM1, JCABKM2, JCABKM3, JCABKM4 y JCABKM19), *Kluyveromyces lactis* (JCABKL5, JCABKL6, JCABKL7, JCABKL8, JCABKL9, JCABKL11, JCABKL12, JCABKL13, JCABKL22 y JCABKL24), *Debaryomyces hansenii* (JCABDH14, JCABDH15), *Candida orthopsilosis* (JCABCO10, JCABCO18), *Torulaspota delbrueckii* (JCABTD17), *Saccharomyces cerevisiae*

(JCABSC16, JCABSC21 y JCABSC23). Q1 (Muestra de queso colectado el 02/08/14), Q2 (Muestra de queso colectado el 06/08/14), Q3 (Muestra de queso colectado el 12/08/14), Q4 (Muestra de queso colectado el 17/08/14). (+) Reacción positiva, (-) Reacción negativa, (±) Reacción débil. Las cepas fueron identificadas a nivel de género y especie con base en la secuencia del gen 18S ADNr.

### 6.6 Análisis de RAPD de las cepas de levadura.

El patrón de bandas del RAPD, de las 25 cepas de levadura aisladas, con el Oligo-2 (OPA-18) (Figura 15) muestra seis patrones de bandas: patrón 1 (JCABKM1, JCABKM2, JCABKM3, JCABKM4, JCABKM19), patrón 2 (JCABKL5, JCABKL6, JCABKL7, JCABKL8, JCABKL9, JCABKL11, JCABKL12, JCABKL13, JCABKL20, JCABKL22, JCABKL24), patrón 3 (JCABCO 10, JCABCO18), patrón 4 ( JCABDH 14, JCABDH 15), patrón 5 (JCABSC 16, JCABSC 16, JCABSC 21, JCABSC 23, JCABSC 25) y patrón 6 (JCABTD 17)



**Figura 15.** Patrones de RAPD para cepas de especies de levadura con el oligonucleótido iniciador OPA-18. Carril 1, marcador de talla molecular, carriles; 2 – 20, *Kluyveromyces lactis* (JCABKL5, JCABKL6, JCABKL7, JCABKL8, JCABKL9, JCABKL11, JCABKL12, JCABKL13, JCABKL22 y JCABKL24), *Kluyveromyces marxianus* (JCABKM1, JCABKM2, JCABKM3, JCABKM4 y JCABKM19), *Debaryomyces hansenii* (JCABDH14, JCABDH15), *Saccharomyces cerevisiae* (JCABSC16, JCABSC21 y JCABSC23), *Torulasporea delbrueckii* (JCABTD17), *Candida orthopsilosis* (JCABCO10, JCABCO18). Las cepas fueron identificadas a nivel de género y especie, con base en la secuencia del gen 18S ADNr.

## 6.7. Identificación de las cepas de levadura por análisis de la secuencia del gen ADNr

Mediante pruebas bioquímicas y moleculares efectuadas a las 25 cepas de levadura del queso artesanal de Rayón, Chiapas, se obtuvieron las identidades que se indican en la tabla 13. Las especies de levaduras que se encontraron en este estudio han sido reportadas en diferentes tipos de quesos elaborados con leche proveniente de diversas especies animales, algunos con características similares al queso crema, elaborados en diversos lugares, con diferentes climas. *Kluyveromyces marxianus* ha sido encontrada como especie predominante en el queso Pecorino di Farinola elaborado con leche cruda de borrega sin la adición de cultivos naturales comerciales (Tofalo *et al.*, 2014). Se ha reportado junto a *Debaryomyces hansenii* como especies frecuentemente aisladas de la cuajada acida de quesos como el Quark, Gervais, queso Cottage y el queso crema (Buchl y Seiler, 2011). *Kluyveromyces lactis* se ha aislado del queso feta como especie abundante (Rantsiou *et al.*, 2011). *Candida orthopsilosis* se ha encontrado en queso brine, en cremas, en ambientes lácteos como el piso, las paredes y el aire, en equipos donde se procesa leche o en ubres infectadas por mastitis, en mezcla de frutas para suplementar alimentos como el yogurt o quark. Se ha encontrado en leches contaminadas con mastitis y en diversos yogurts. Se ha reportado que puede causar riesgos a la salud cuando actúan como patógenos facultativos en alimentos sanos y en alimentos contaminados (Buch y Seiler, 2011). *Debaryomyces hansenii* es la especie comúnmente más encontrada en quesos, y así como otras levaduras que son aisladas en altas cantidades de diferentes tipos de quesos, donde su presencia se atribuye por su tolerancia a bajos pH, reducida actividad de agua ( $a_w$ ) y altas concentraciones de sal, así mismo se caracteriza por la habilidad de crecer en ambientes de maduración con bajas temperaturas de almacenamiento. Adicionalmente la han reportado como una especie ampliamente dispersa en el ambiente quesero, aparece como contaminante natural de la leche cruda, el aire, el agua, en salmueras, de los implementos lácteos y en las superficies de los equipos (Cardoso *et al.*, 2015). *Torulasporea delbrueckii* se ha detectado en el proceso de maduración del queso Minas el cual es un queso con pH de 5.0, elaborado con leche cruda de vaca, también se ha aislado del queso Gouda después de 32 días



de maduración, como una especie importante de la comunidad de levaduras en el queso feta danés, también fue reportada en el queso Fiore Sardo después de un mes de maduración, ha sido aislada de cultivos iniciadores naturales, en la cuajada y después de 5 días de maduración del queso Canastra de Minas Brazil. Se ha reportado como especie predominante en el queso blanco avinagrado artesanal elaborado en Serbia (Cardoso *et al.*, 2015), fue reportada como especie predominante asociada con *Debaryomyces hansenii* en el queso blanco fresco en escabeche de consistencia blanda que se elabora en la región de las montañas de Serbia y en la tierras bajas de Croacia (Golić *et al.*, 2013), fue identificada como una de las principales especies aisladas del queso Feta griego junto con otras especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, *Pichia membranifaciens*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida sake* y *Kluyveromyces lactis* (Rantsiou *et al.*, 2008).

Las secuencias nucleotídicas de los fragmentos del gen 18S DNAr amplificadas para cada una de las cepas de LEV se presentan en el anexo 2.

Se obtuvieron los parientes más próximos a nivel de especie dentro de los géneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces* y *Torulaspota* así mismo, el número de bases diferentes en relación al total de bases comparadas y su respectivo porcentaje de similitud en los pares de bases para cada una de las 21 cepas de BAL (Tabla 14).

**Tabla 14.** Porcentaje de identidad de las secuencias del gen 18S ADNr de las cepas de levadura aisladas con las secuencias de referencias de los parientes más próximos.

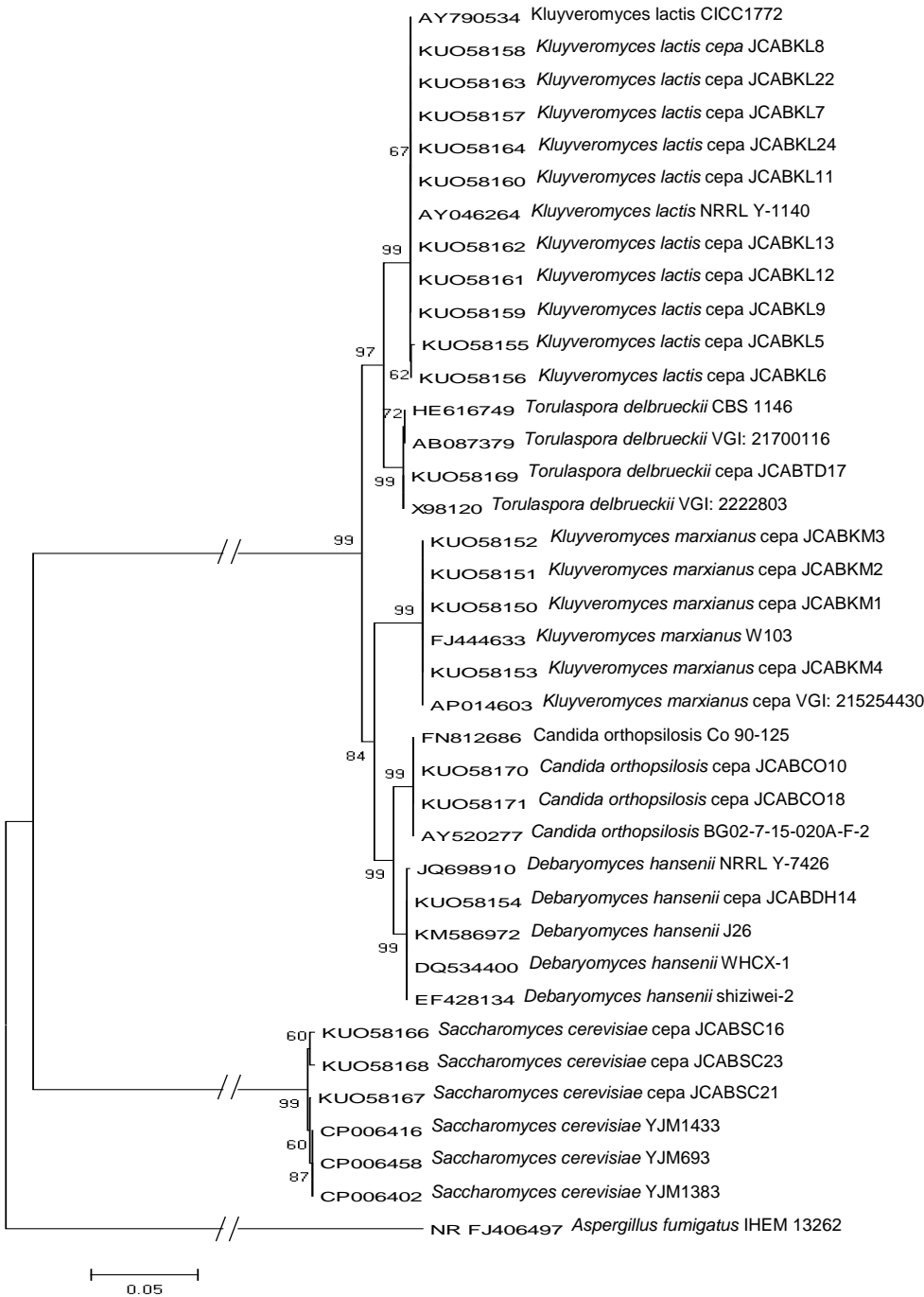
Cepa	Número de acceso GenBank	Parientes más próximos dentro de los géneros de levadura	Bases idénticas / Total de bases comparadas	Porcentaje máximo de identidad
JCABKM1	KUO58150	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1658/1658	100
JCABKM2	KUO58151	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1659/1659	100
JCABKM3	KUO58152	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1658/1658	100
JCABKM4	KUO58153	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1659/1659	100
JCABKL5	KUO58155	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1625/1625	100
JCABKL6	KUO58156	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1631/1632	99
JCABKL7	KUO58157	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1618/1618	100
JCABKL8	KUO58158	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1632/1632	100
JCABKL9	KUO58159	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1649/1649	100
JCABCO10	KUO58170	<i>Candida orthopsilosis</i>	1643/1643	100
JCABKL11	KUO58170	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1637/1637	100
JCABKL12	KUO58170	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1636/1636	100
JCABKL13	KUO58170	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1636/1636	100
JCABDH14	KUO58154	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1656/1656	100
JCABDH15	ND	ND	-	-
JCABSC16	KUO58166	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1645/1650	99
JCABTD17	KUO58169	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1666/1666	100
JCABCO18	KUO58171	<i>Candida orthopsilosis</i>	1641/1641	100
JCABKM19	ND	ND	-	-
JCABKL20	ND	ND	-	-
JCABSC21	KUO58167	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1648/1652	99
JCABKL22	KUO58163	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1646/1646	100
JCABSC23	KUO58168	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1651/1652	99
JCABKL24	KUO58164	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1655/1655	100
JCABSC25	ND	ND	-	-

ND: No Disponible

6.7.1. Relaciones de homología entre las secuencias codificantes de genes 18S DNAr de cepas de levadura aisladas a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas y otras y otras levaduras previamente descritas.

Estudios basados en la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 18S ADNr descrito por Bautista *et al.* (2003), muestran las relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 18S ADNr amplificado a partir del ADNr de las 25 cepas con las secuencias nucleotídicas de genes 18S ADNr de levaduras reportadas en el GenBank de la NCBI (Figura 16) y cuyo porcentaje de identidad compartido fluctúa entre el 99 al 100 %, como se indicó en la tabla 14.

El filograma (Figura 16), muestra las relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 18S DNAr de las cepas de levadura aisladas (JCABKM1, JCABKM2, JCABKM3, JCABKM4, JCABKL5, JCABKL6, JCABKL7, JCABKL8, JCABKL9, JCABKL11, JCABKL12, JCABKL13, JCABKL22 y JCABKL24, JCABDH14, JCABTD17, JCABCO10, JCABCO18, JCABSC16, JCABSC21 y JCABSC23) y las secuencias de especies relacionadas de los géneros *Candida orthopsilopsis*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, reportadas en el GenBank de la NCBI.



**Figura 16.** Relaciones de homología de las secuencias nucleotídicas del gen 18S DNAr de las cepas de levaduras aisladas a partir del queso artesanal de Rayón, Chiapas y las secuencias nucleotídicas de los genes 18S ADNr de otras levaduras relacionadas. La comparación filogenética se basó en el análisis de las secuencias nucleotídicas con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia usando el índice de Poisson (P) y el método de agrupamientos de Neighbour-joining. La barra indica la distancia genética expresada como el número de cambios por cada 100 nucleótidos. El número de cada nodo indica el valor de bootstrap mostrado en porcentaje.

### 6.8 Análisis de la calidad de la leche bronca.

En el análisis de la calidad de la leche se encontró que los parámetros que determinan la calidad fisicoquímica de la leche bronca se encuentran dentro de un rango aceptable (Tabla 14), y son similares con los parámetros reportados por Villegas *et al.* (2011) en un estudio sobre la caracterización del queso crema de Chiapas.

**Tabla 15.** Análisis fisicoquímicos y de calidad sanitaria de la leche bronca.

<b>Parámetros</b>	<b>Valor</b>
<b>Grasa, %</b>	3.31±0.23
<b>Densidad</b>	1.03±0.15
<b>Lactosa, %</b>	4.59±0.02
<b>SNG, %</b>	8.36±0.03
<b>Proteína, %</b>	3.27±0.01
<b>Agua, %</b>	0
<b>T °C</b>	32.6±1.02
<b>P Congelación.</b>	0.53±0.0
<b>Sales, %</b>	0.69±0.0
<b>Células somáticas / <math>\mu</math>Litro</b>	140.2±0.84

### 6.9 Evaluación fisicoquímica de los quesos.

Se evaluaron siete variables y fueron diferentes entre los tratamientos (Tabla 15), los valores más altos entre los parámetros fueron para los tratamientos ARTESANAL en (materia seca y actividad de agua  $a_w$ ), BAL+LEV en acidez, LEV en (humedad, cenizas y sal) y BCO en pH. Los valores más bajos entre los parámetros evaluados fueron para los tratamientos ARTESANAL en (humedad y cenizas), BAL en (pH,  $a_w$  y sal), LEV en (materia seca y  $a_w$ ), BAL+LEV en actividad de agua ( $a_w$ ) y BCO en (% de acidez y  $a_w$ ).

**Tabla 16** Composición química promedio del queso en los 5 tratamientos.

TRATAMIENTOS	% HUM	% MS	% CEN	% SAL	% AC	pH	aw
<b>BAL + LEV</b>	59.06±0.68	40.94±0.68	6.95±0.28	2.56±0.56	1.19±0.1	4.07±0.05	0.93±0.01
<b>LEV</b>	59.49±0.24	40.51±0.24	7.09±0.21	2.89±0.15	0.76±0.03	4.26±0.04	0.93±0.01
<b>BAL</b>	58.71±0.84	41.29±0.84	6.45±0.29	1.66±0.07	0.91±0.05	4.00±0.1	0.93±0.01
<b>BCO</b>	58.38±0.27	41.62±0.27	6.05±0.18	2.01±0.57	0.61±0.02	6.30±0.03	0.93±0.01
<b>ARTESANAL</b>	53.68±0.19	46.32±0.19	5.55±0.26	2.20±0.09	0.88±0.08	4.07±0.03	0.94±0.00

HUM: Humedad, MS: Materia Seca, CEN: Cenizas, AC: Acidez. Media ± desviación estándar.

El valor más bajo de pH, para BAL es similar al reportado por Villegas *et al.* (2011) en un estudio sobre la caracterización del queso crema de Chiapas, para la misma región de donde procede la muestra evaluada.

Los valores de actividad de agua (aw) menores 0.96 son inhibitorios de la mayoría de bacterias patógenas, excepto *Staphylococcus aureus* que crece a una actividad de agua (aw) tan bajos como 0.86 (Jay, 2000). Algunas cepas de *Salmonella* tienen su límite de actividad de agua (aw) mínimo de 0.94 (Lianou y Koutsoumanis, 2011).

Pinho *et al.* (2004) mencionan que a mayor contenido de humedad, mayor contenido de aw en el queso y por lo tanto es más susceptible al ataque por microorganismos sin contar con las condiciones de almacenamiento adecuadas.

#### 6.10. Características de color de los quesos para los 5 tratamientos.

El color de los quesos (Tabla 16) fue diferente entre los tratamientos. Para la diferencia total del color ( $\Delta E$ ) se encontró que el tratamiento LEV es el más cercano al tratamiento ARTESANAL. Con respecto a los componentes de color se encontró que para el componente (b) por su valor positivo corresponde al color amarillo, donde el tratamiento LEV es el más cercano al tratamiento ARTESANAL.

Los valores de luminosidad encontrados en este estudio son similares a los reportados por Villegas *et al.* (2011) en un estudio de caracterización del queso crema de Chiapas. El color de los quesos es importante para la aceptación del producto por el consumidor,

ya que existen diferentes tipos de quesos, hay zonas en México que prefieren quesos blancos o quesos amarillos (Villegas, 2003).

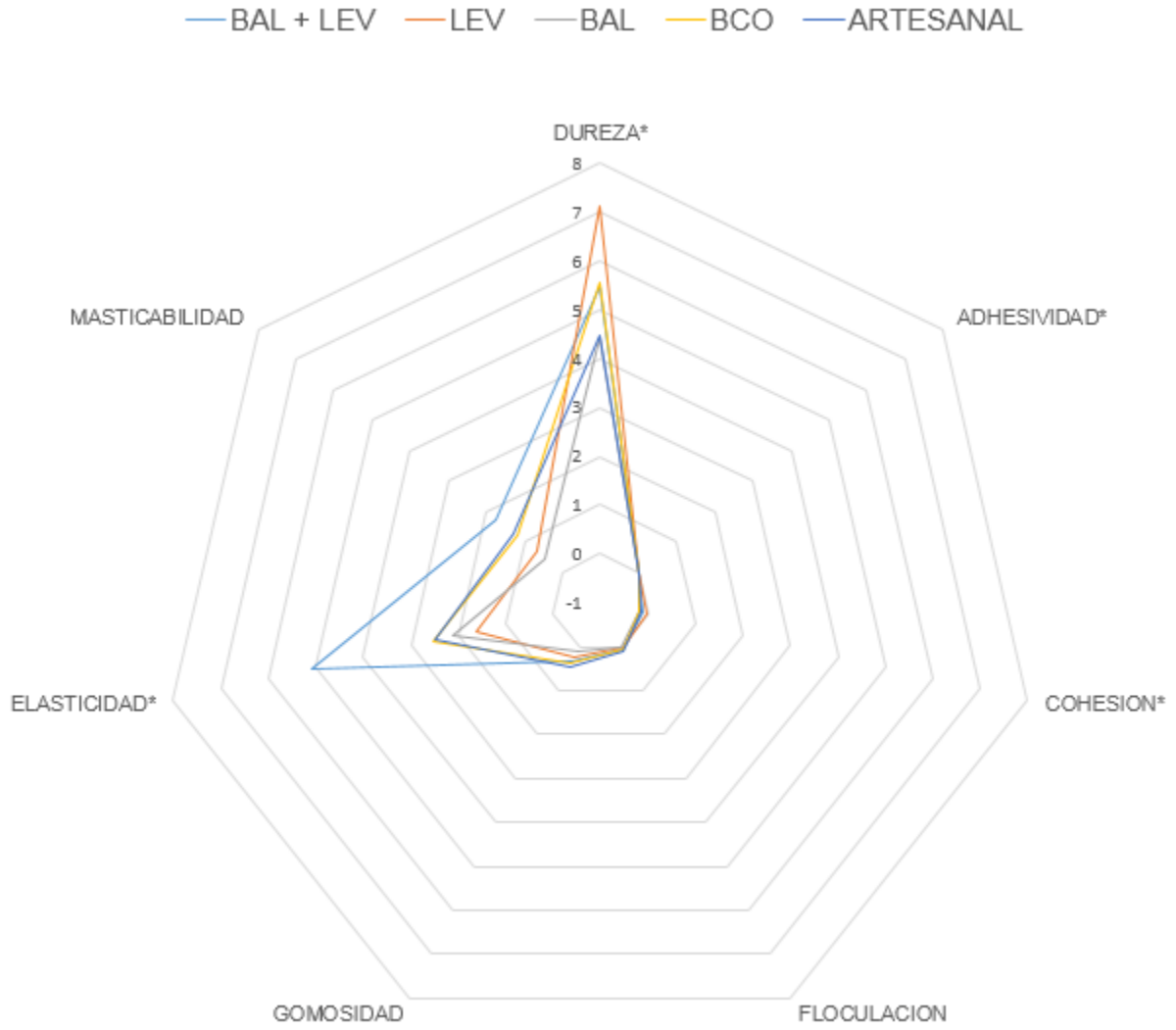
**Tabla 17.** Parámetros de color del queso artesanal de Rayón, Chiapas y de queso elaborado con leche pasteurizada.

TRATAMIENTOS	L	a	b	$\Delta E$
BAL + LEV	92.85 ± 1.29	-1.34 ± 1.17	15.39 ± 1.10	2.99 ± 0.76
LEV	92.61 ± 0.28	-1.41 ± 1.15	17.15 ± 2.26	1.26 ± 1.39
BAL	92.58 ± 0.8	-1.67 ± 1.10	15.39 ± 0.38	3.03 ± 0.52
BCO	92.77 ± 0.45	-1.56 ± 1.07	16.00 ± 0.59	2.41 ± 0.64
ARTESANAL	92.65 ± 0.47	-1.10 ± 1.11	18.37 ± 0.84	0.00 ± 0.0

L= Luminosidad, a, b, (parámetros de color Hunter Lab).  $\Delta E$ = Diferencia total del color, entre el color de la muestra y el de referencia. Media ± desviación estándar.

#### 6.11 Perfil de textura.

De los seis componentes del perfil de textura, dureza, elasticidad, adhesividad y cohesividad fueron diferentes entre los tratamientos (Figura 17). En dureza los tratamientos (BAL + LEV) y BAL fueron los más cercanos al tratamiento ARTESANAL. En elasticidad los tratamientos BAL y BCO fueron los más cercanos al tratamiento ARTESANAL y le sigue el tratamiento LEV. En adhesividad el tratamiento (BAL + LEV) fue el más cercano al tratamiento ARTESANAL y le siguió el tratamiento LEV. En el parámetro cohesión los tratamientos (BAL + LEV) y BAL son los más cercanos al tratamiento ARTESANAL y le sigue el tratamiento BCO. Los parámetros de dureza, cohesión y adhesividad difieren con un estudio similar realizado por Villegas *et al.* (2011) en el que evalúan al queso crema de Chiapas. En los atributos cohesión y adhesividad no se puede apreciar la variación de manera gráfica debido a que los valores oscilan de  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-4}$  (valores adimensionales).



**Figura 17.** Perfil textural del queso crema elaborado con leche pasteurizada y microorganismos autóctonos del queso artesanal de Rayón, Chiapas. T1: (BAL + LEV), T2: (LEV), T3: (BAL), T4: (BCO), T5: (ARTESANAL).



### 6.12. Esfuerzo cortante y resistencia a la penetración

Los parámetros de esfuerzo cortante y resistencia a la penetración (Tabla 18) fueron diferentes entre los tratamientos. Para el esfuerzo cortante los tratamientos LEV, BCO y (BAL + LEV) fueron los más cercanos al tratamiento ARTESANAL. En el caso de la resistencia a la penetración los tratamientos (BAL + LEV) y LEV fueron los más cercanos al tratamientos ARTESANAL. Es decir que los tratamientos que tuvieron una consistencia suave muy parecida al queso artesanal fueron los tratamientos (BAL + LEV) y LEV.

**Tabla 18.** Determinación de esfuerzo cortante y resistencia a la penetración.

<b>Tratamientos</b>	<b>Esfuerzo cortante (N)</b>	<b>Resistencia a la penetración (N)</b>
<b>(BAL + LEV)</b>	5.06 ± 0.18	0.92 ± 0.19
<b>LEV</b>	7.35 ± 0.83	0.90 ± 0.16
<b>BAL</b>	9.54 ± 2.56	1.04 ± 0.38
<b>BCO</b>	6.03 ± 1.52	1.00 ± 0.30
<b>ARTESANAL</b>	7.43 ± 0.94	0.99 ± 0.24

N: Newton. Media ± Desviación estándar

### 6.13. Evaluación sensorial.

Las personas que contestaron la encuesta fueron consumidores jóvenes que se ubican en un intervalo de edad, de 16 a 44 años. Para la variable sexo se encontró que la población masculina tuvo mayor participación. Más del 60 % de la población encuestada no consume quesos elaborados con leche cruda. El queso crema resultó ser el más consumido, le siguen los quesos fresco y de hebra (Tabla 17).

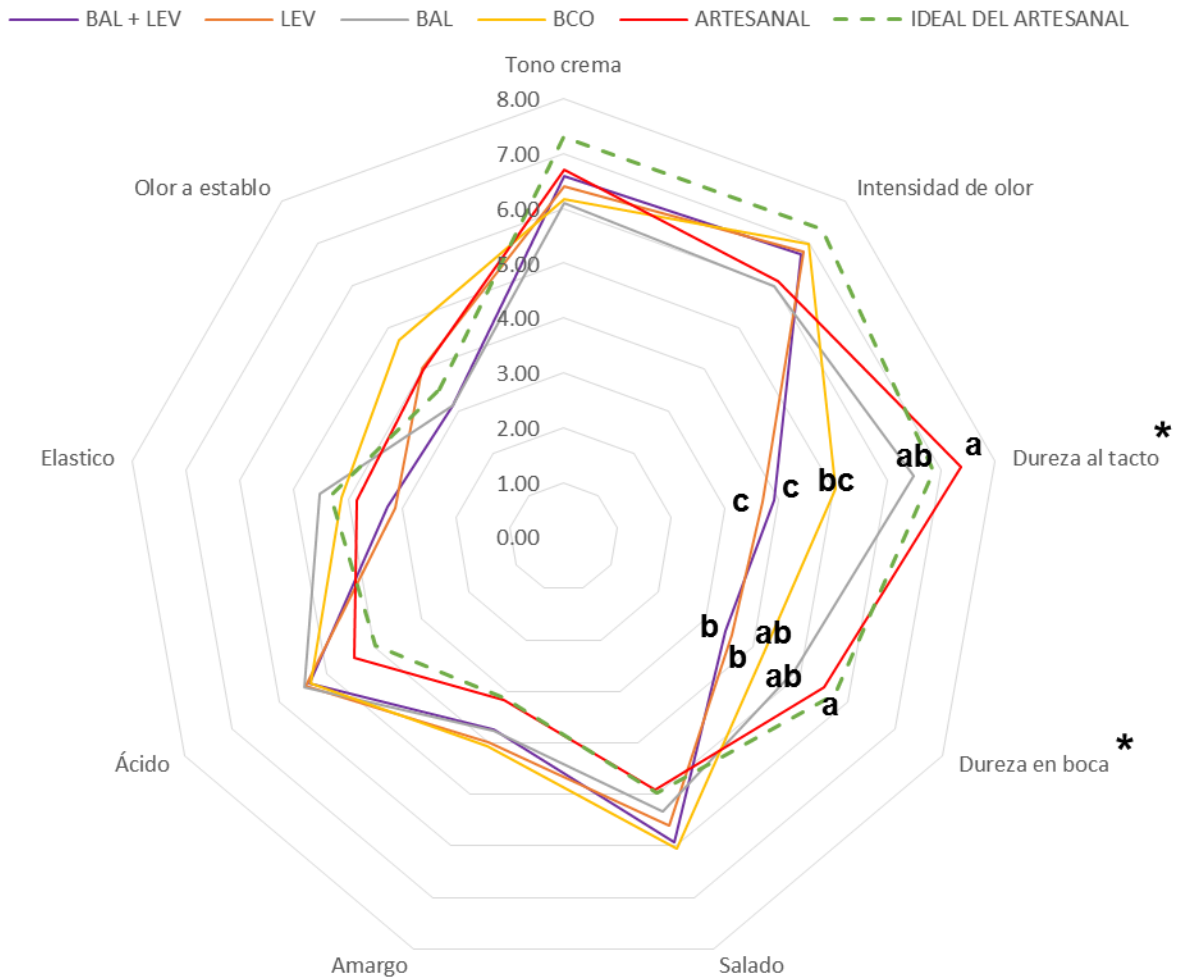
**Tabla 19.** Resultados demográficos y preferencias de consumo de queso de la población encuestada.

Edad (años)	%	Sexo (%)	¿Consume quesos elaborados con leche cruda? (%)	Tipo de queso consumido (%)
16 - 20	35	Fem. 41	Si 39	Crema 40
21 - 27	26	Masc. 59	No 61	Crema y poro 2
28 - 44	19			Fresco 31
45 - 54	12			Hebra 22
> 55	8			Panela 2
				Poro 2
				Indiferente 1

Se estudiaron nueve atributos sensoriales utilizando el método del perfil ideal (IPM). En el análisis se integró como un nuevo elemento al IDEAL indicado por los consumidores. Este IDEAL se obtuvo de los promedios de cada atributo ideal evaluado en el estudio de consumo. El análisis del IDEAL indicó ser consistente en el estudio, eso es, en general los consumidores indicaron valores ideales similares en los atributos del queso crema de Chiapas. Este IDEAL fue utilizado para hacer las comparaciones con los demás tratamientos con la herramienta de componentes principales. Con el análisis de varianza de los atributos por separado no se encontraron diferencias significativas entre los quesos evaluados excepto en los atributos dureza al tacto y dureza en boca (Figura 18). De los cinco tratamientos el ARTESANAL fue el más cercano al IDEAL en los atributos “dureza en boca” y “dureza al tacto”.

El IPM permite saber la dirección del gusto y la aceptabilidad del consumidor con respecto a los atributos evaluados en cada uno de los tratamientos, en contraste con los métodos donde se requiere panel de evaluadores entrenados que solamente indican descripción e intensidades de atributos y de los métodos donde indican diferencias y magnitud de las diferencias entre atributos, que por la naturaleza de esos

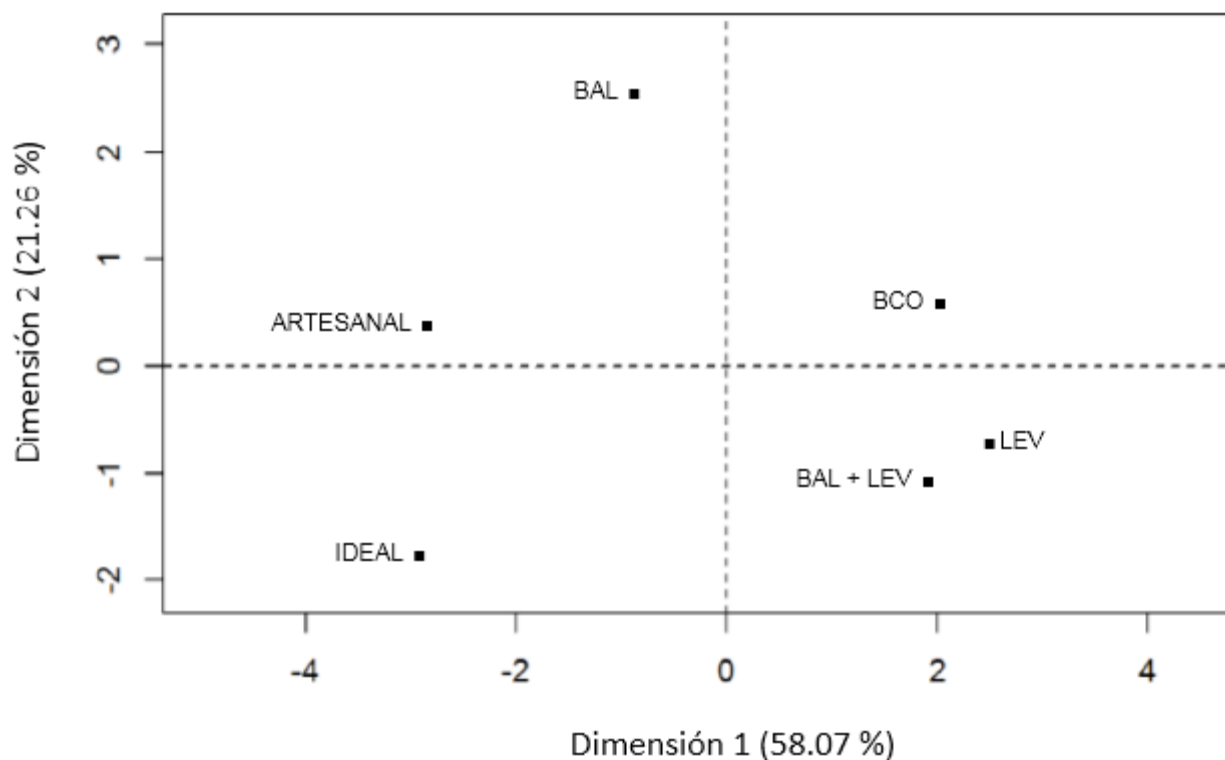
métodos no se puede obtener información sobre el nivel ideal de los atributos que prefieren los consumidores.



**Figura 18.** Evaluación sensorial de atributos en queso elaborado con leche pasteurizada y microorganismos autóctonos del queso artesanal de Rayón, Chiapas.

Con respecto a la similitud entre los tratamientos de acuerdo a la percepción de los consumidores y compararlos con su IDEAL, se encontró que los tratamientos BAL y ARTESANAL fueron los más cercanos al IDEAL tomando en cuenta todos los atributos de manera simultánea. Adicionalmente, los tratamientos ARTESANAL y BAL fueron más parecidos entre ellos y ambos más parecidos al ideal en términos de las intensidades de los atributos evaluados para este tipo de queso, mientras que el resto

de los tratamientos (BAL+LEV), LEV y BCO se observaron más alejados del ideal (Figura 19).



**Figura 19.** Mapa de factores individuales (PCA)

Con respecto a los atributos sensoriales (Figura 20) se encontró una alta correlación entre dureza al tacto y dureza en boca, es decir en los tratamientos evaluados la dureza en boca es consistente tanto en la dimensión bucal como en el plano de la mano. Sin embargo; el atributo elástico se apreció muy cercano a estos dos atributos de dureza, posiblemente con esto se puede inferir que la combinación de estos tres atributos son determinantes para que el consumidor perciba la textura del queso. Con respecto a los atributos de sabor ácido y sabor amargo se observó claramente en la una correlación muy cercana (Figura 20). El atributo de olor a establo se observó menos correlacionado con los dos primeros. El atributo de tono crema tuvo una correlación negativa con los atributos de sabor. El atributo de intensidad de olor también mostró una correlación negativa con los atributos de dureza. Es muy probable que los atributos de salado, amargo y ácido son la combinación de sabores que pueden

estar interaccionando en el paladar del consumidor para emitir su aceptación o rechazo en torno a las muestras de queso evaluadas.

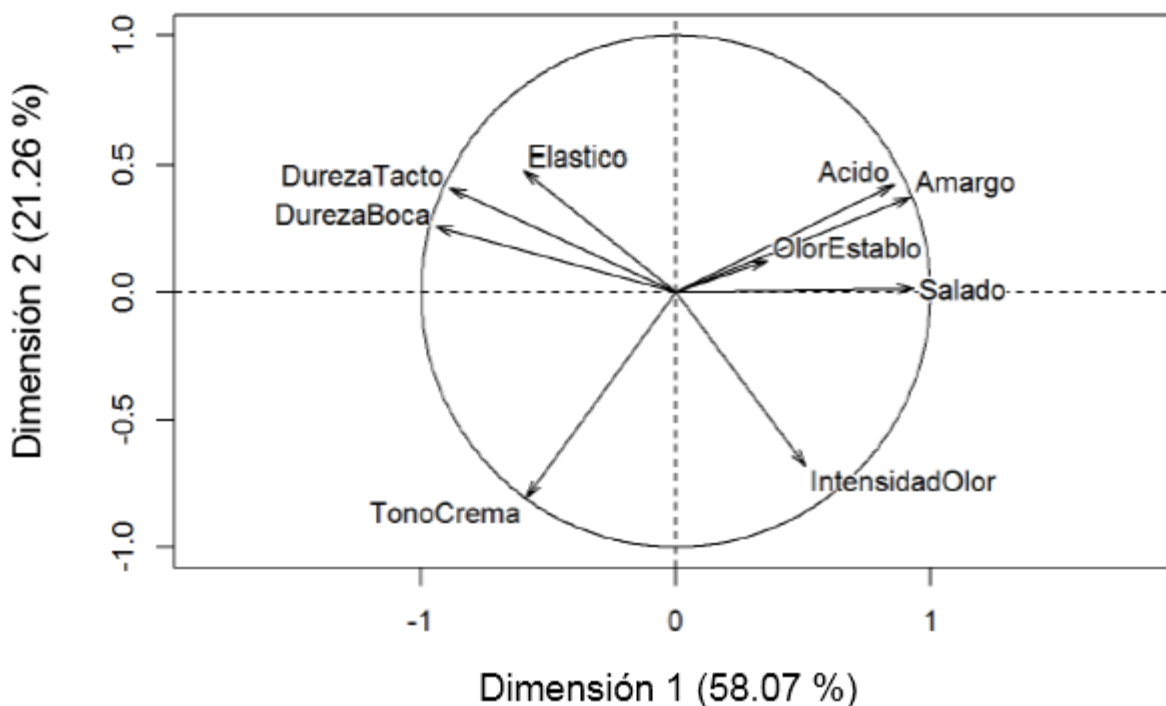


Figura 20. Mapa de factores variables (PCA)

El efecto sobre el perfil sensorial depende de la especie ya que *Kluyveromyces spp*, *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* entre otras, han sido reportadas por Buchl y Seiler, (2011) que a pesar de estar presentes en quesos con recuentos bajos, son causantes de efectos sobre el perfil sensorial de diversos tipos de quesos.

Los límites inferiores de recuento de levaduras que se detectan como defectos sobre el perfil sensorial son  $10^4$  -  $10^5$  que generan notas tales como “ligeramente viejo, a rancio, amargo” y  $10^5$  -  $10^6$  ufc/ml, respectivamente (Buchl y Seiler, 2011), lo cual coincide con los recuentos de levaduras de  $10^5$  encontrados en este trabajo.

**Tabla 20.** Análisis de regresión logística, para predecir la aceptación general y por tratamiento del queso de Chiapas\*.

Parámetros	General		BAL + LEV		LEV		BAL		BCO		ARTESANAL	
	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )
Tono crema	0.222	0.0226	736.69	0.975	0.1837	0.4679	0.484	0.1595	0.5257	0.0303	-0.1834	0.5910
Intensidad de olor	0.0065	0.9369	943.88	0.975	-0.2647	0.2367	0.1118	0.7833	-0.1771	0.3268	0.3265	0.2480
Dureza al tacto	0.0236	0.7937	1419.37	0.975	0.3738	0.3925	-0.5432	0.0982	-0.1342	0.4380	0.2023	0.5730
Dureza en boca	0.1136	0.2868	297.37	0.976	-0.1772	0.7263	0.2842	0.4198	0.1518	0.5045	-0.0526	0.8450
Salado	0.0109	0.9083	-391.49	0.975	0.6917	0.0403	-0.4303	0.1532	0.1389	0.4054	-0.3838	0.2940
Amargo	-0.3056	0.0011	-406.03	0.975	-0.5338	0.0457	-0.6736	0.1129	-0.2409	0.1736	-0.6054	0.1710
Ácido	-0.1428	0.1112	-974.95	0.975	-0.3732	0.1709	0.3018	0.3909	-0.3629	0.1259	0.7754	0.1930
Elástico	-0.0551	0.5256	-102.61	0.976	0.1747	0.6018	-0.4737	0.1682	0.0039	0.9849	0.0593	0.8620

\*Las estimaciones se hicieron basándose en el análisis de regresión logística (LRA), utilizando un modelo completo con ocho atributos sensoriales. Se utilizó el análisis de las estimaciones de máxima verosimilitud para obtener estimaciones de los parámetros. Las estimaciones de los parámetros se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad Pr (>|z|) fue inferior a 0.05. T-1(BAL+LEV), T-2(LEV), T-3(BAL), T-4(BCO), T-5(ARTESANAL).

El análisis por regresión logística indicó que los parámetros tono crema y amargo impactan significativamente en la decisión del consumidor al momento de aceptar el producto (muestra de queso) es decir que los consumidores encuestados prefirieron el queso con mayor intensidad del tono crema y con respecto al sabor amargo lo prefieren con menor intensidad. Con respecto a los tratamientos, en LEV los parámetros que impactan de manera significativa en la decisión del consumidor para aceptar ese queso son los sabores salado y amargo, lo cual puede entenderse claramente que los prefieren menos salado y menos amargo. En el tratamiento BCO el parámetro tono crema es el que impactó de manera significativa en la decisión del consumidor para aceptarlo. En los tratamientos (BAL + LEV), BAL y BCO no se observaron parámetros que impactaron de manera significativa por lo que se puede inferir que gozaron de buena aceptación. En los atributos salado, amargo y ácido, el ideal (Tabla 21) indicaron

que el consumidor los prefiere con menor intensidad. El sabor del queso es el principal factor de selección por parte de los consumidores (Cavanagh *et al.*, 2014).

En el análisis general (Tabla 22) se encontró que para la intención de compra los parámetros “dureza en boca” y “sabor amargo” impactaron significativamente en la decisión de compra de los consumidores que participaron en el estudio de consumo. De manera general se puede inferir que los consumidores estarían dispuestos a comprar estos quesos con mayor “dureza en boca” y con menos “sabor amargo”. En el análisis por tratamientos se encontró que en el tratamiento (BAL+LEV) los parámetros que impactaron significativamente en la decisión de compra de los consumidores son “Intensidad de olor” y “sabor ácido”. Se puede apreciar claramente que los consumidores estarían dispuestos a comprar este queso pero con menor intensidad en ambos parámetros. En los tratamientos LEV y BCO el parámetro que impacta de manera significativa en la intención de compra en ambos tratamientos es el “sabor amargo”, adicionalmente el parámetro “tono crema” impacta significativamente en el tratamiento BCO. En el resto de los tratamientos BAL y ARTESANAL no se observan parámetros que impacten significativamente en la intención de compra por parte de los consumidores, por lo que puede inferirse que estarían dispuestos a comprarlo dado que sus calificaciones de preferencia fueron las más altas y son más parecidos al IDEAL.

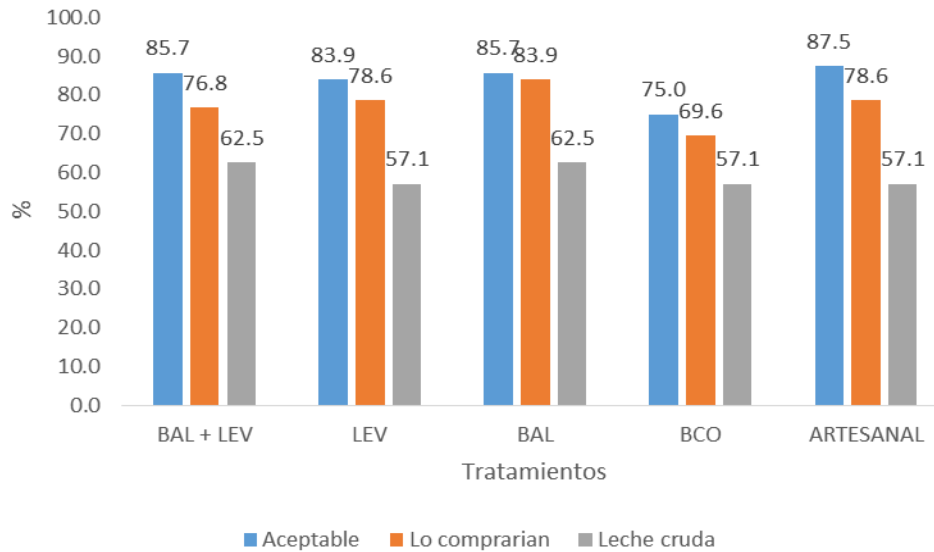
**Tabla 21.** Análisis de regresión logística (LRA) en general y por tratamientos para predecir la intención de compra\*.

Parámetros	General		BAL +LEV		LEV		BAL		BCO		ARTESANAL	
	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )	Estimado	Pr(> z )
Tono crema	0.0849	0.3118	0.4608	0.1842	0.0137	0.9523	0.537	0.1289	0.4509	0.0419	-0.4251	0.0895
Intensidad de olor	0.0685	0.3515	0.6628	0.0317	0.0717	0.6949	-4372	0.2082	-0.1653	0.3684	0.178	0.3509
Dureza al tacto	-0.0385	0.6268	0.6016	0.2187	0.0188	0.9584	-0.43	0.1192	-0.1066	0.5534	0.2788	0.2612
Dureza en boca	0.2364	0.0164	-0.4151	0.4474	0.1446	0.7372	0.2934	0.3332	0.4857	0.0598	0.1621	0.4097
Salado	-0.0556	0.5039	-0.3334	0.2327	0.4696	0.1015	-0.4156	0.1266	0.1282	0.4563	-0.1569	0.5498
Amargo	-0.3043	0.0003	-0.3737	0.1634	-0.5664	0.0182	-0.066	0.8245	-0.4179	0.0305	-0.1755	0.5163
Ácido	-0.0829	0.304	-0.5001	0.0549	-0.2341	0.3244	0.045	0.8733	-0.2764	0.2024	-0.1125	0.6976
Elástico	-0.0182	0.8149	-0.0318	0.9231	0.3160	0.2830	-0.2591	0.3214	-0.1427	0.5022	0.1733	0.4896

\*Las estimaciones se hicieron basándose en el análisis de regresión logística (LRA), utilizando un modelo completo con 8 atributos sensoriales. Se utilizó el análisis de las estimaciones de máxima verosimilitud para obtener estimaciones de los parámetros. Las estimaciones de los parámetros se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad Pr (>|z|) fue inferior a 0.05. T-1(BAL+LEV), T-2(LEV), T-3(BAL), T-4(BCO), T-5(ARTESANAL).

Con respecto a la intención de compra del queso no se observan diferencias significativas entre los 5 tratamientos, por lo que se puede inferir que si los productos estuvieran disponibles en el mercado, los consumidores estarían más dispuestos a comprar el queso del tratamiento BAL. Sin embargo si los consumidores supieran que los quesos fueron elaborados con leche cruda, bajaría la disposición de comprarlo hasta en 30% aproximadamente, lo cual se puede apreciar en la (Figura 21). Sin embargo observa que aun a pesar de que el consumidor supiera que fue elaborado con leche cruda el 70% de estos lo comprarían.





**Lo comprarían:** Compraría este producto si estuviera disponible en el mercado  
**Leche cruda:** Compraría este producto si supiera que fue elaborado con leche cruda

**Figura 21.** Estimaciones de la intención de compra

Al evaluar la intención de compra empleando la prueba de MCNEMAR (Tabla 22), se encontró que a nivel general considerando todos los tratamientos, los consumidores si estarían dispuestos a comprar los quesos que probaron durante la prueba de consumo si estos supieran que fue hecho con leche cruda; a nivel de tratamientos BAL fue el más aceptado y el tratamiento LEV el menos aceptado.

**Tabla 22.** Evaluación de la intención de compra con la prueba de MCNEMAR.

	General		BAL + LEV		LEV		BAL		BCO		ARTESANAL	
Compraría	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si
<b>No</b>	50	13	8	5	9	3	7	1	15	3	11	1
<b>Si</b>	54	153	13	30	15	29	13	34	10	29	13	31

## 7 CONCLUSIONES.

- Se aislaron 19 cepas de bacterias lácticas en el queso artesanal, que corresponden a las especies de *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. helveticus* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*.
- Se aislaron 25 cepas de levaduras del queso artesanal, que corresponden a las especies de *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida orthopsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulasporea delbrueckii*.
- La utilización de BAL y levaduras autóctonas del queso artesanal de Rayón, Chiapas, para elaborar quesos con leche pasteurizada, permite obtener quesos con características fisicoquímicas y sensoriales similares al queso artesanal.
- Al utilizar esas bacterias para elaborar quesos se obtuvieron perfiles parecidos al artesanal y con la ventaja de estar elaborados con leche pasteurizada además de ser bien aceptados por los consumidores. El ideal imaginario fue consistente entre los consumidores.
- Los tratamientos experimentales no presentaron diferencias significativas de intensidad de sabor y olor en relación con el queso artesanal. No hubo diferencias para estos atributos. Una razón puede ser que fueron muy parecidos los tratamientos experimentales con el artesanal o que los consumidores no fueron suficientemente sensibles para detectar diferencias en esos atributos.
- En el caso de la textura si hubo diferencias en los atributos de dureza en boca y dureza al tacto, el ARTESANAL es el que más se pareció al IDEAL, le siguieron los tratamientos BAL y BCO. La fabricación de quesos con leche pasteurizada es viable y puede ser una alternativa para los consumidores que no tienen preferencia por los quesos fabricados con leche cruda.

## 8 RECOMENDACIONES.

- Se sugiere realizar una selección de cepas de BAL y levaduras con base en sus características tecnológicas.
- Se sugiere realizar un estudio de los compuestos de sabor del queso elaborado con leche pasteurizada inoculada con BAL y levaduras seleccionadas y compararlas con el sabor de queso artesanal.
- Se sugiere a los productores de queso crema artesanal de la región sureste de México, optar por el uso de cultivos de BAL y levaduras en sus procesos tecnológicos para mejorar la calidad microbiológica en la elaboración del queso crema artesanal. Actualmente en el Colegio de Postgraduados Campus Tabasco se están desarrollando tecnologías que utilizan cultivos lácticos y levaduras para la elaboración de quesos con leche pasteurizada.

## 9 BIBLIOGRAFIA.

- Alvarado Rivas C., Chacón Rueda Z., Otoniel Rojas J., Guerrero Cárdenas B. y López Corcuera G. 2007. Aislamiento, Identificación y Caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal su uso como cultivo iniciador. FCV-LUZ. 17 (3), 301 – 308.
- Arana, I. 2012. Physical Properties of Foods: Novel Measurement Techniques and Applications CRC. Press.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. More, J G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. 1989. Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience.
- Ayad, E. H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J. T.M., Smit, G. 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. International Dairy Journal. 9(10) 725-735.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S.Salminen, A von Wright and A. Ouwenhand. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc. New York pp. 1-67.
- Bautista, C., Boldo, X. M., Villa, T. L. y Hernández, R. C. 2003. Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation

- between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. *Journal of clinical microbiology*. 41(1), 414 – 420.
- Bayarri, S., Marti, M., Carbonell, I., & Costell, E. 2012. Identifying drivers of liking for commercial spreadable cheeses with different fat content. *Journal of Sensory Studies*, 27(1), 1-11.
- Benkerroum, N., Tamime, A. Y. 2004. Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*. 21(4) 399-413.
- Bourne, M. 2002. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. 2nd ed. San Diego: Academic Press.
- Brandt, M.A., Skinner, E. Z. and Coleman. J. A. 1963. Texture profile method. *Journal of Food Science* 4:404–409.
- Buchl, N. R. y Seiler H. 2011. Yeasts in Milk and Dairy Products. Elsevier Ltd. 4(2002) 2761–2769. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Volume 1–4)*: H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.); Academic Press, Amsterdam, 2003, ccclxvi+2799 pp., ISBN 0-12-227235-8.
- Bylund, G. 2003. *Manual de industrias lácteas*. Mundi Prensa Libros SA.
- Capece, A., & Romano, P. 2009. “Pecorino di Filiano” cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. *International journal of food microbiology*, 132(2), 180-184.
- Cardoso, V. M., Borelli, B. M., Lara, C. A., Soares, M. A., Pataro, C., Bodevan, E. C., & Rosa, C. A. 2015. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International*, 69, 331-340.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. 2008. *Microbiology: a laboratory manual*. Addison Wesley Longman. Inc. Vol. 9. P.p. 465.
- Cavanagh, D., Kilcawley, K. N., O'Sullivan, M. G., Fitzgerald, G. F., McAuliffe, O. 2014. Assessment of wild non-dairy lactococcal strains for Flavour. *Food Research International* 62 (2014) 432–440.
- Callon, C., Retureau, E., Dididenne, R., Montel, M. C. 2014. Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 174 (2014) 98–109.
- Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A. y Espinoza, A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos. *Patrimonio que debe rescatarse*. Mundi Prensa. p, 186.
- D.O.F. 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. ([www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/243ssa](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/243ssa)).
- D'Amico, D. J., Groves, E., Donnelly, C. W. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production*. 71 (8) 1580-1589.

- Demarigny, Y., Beuvier, E., Buchin, S., Pochet, S., Grappin, R. 1997. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses: II. Biochemical and sensory characteristics. *Le Lait*. 67(1) 151-167.
- Deliza, R., and M.B. Abreu. 2011. Sensory perception. *In: Sensory analysis of foods of animal origin*. Nollet, L.M., and F. Toldrá (eds). Taylor and Francis Group, LLC. pp: 62-82.
- Drake, M. A. 1999. Relationship between instrumental and sensory measurements of cheese texture. *Journal of Texture Studies* 30(4):451–476.
- Ekc, A. 2000. What Is A Cheese. *Cheese making: From Science to Quality Assurance*. Lavoisier Publishing. Pp 661-662.
- El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J. M. 2010. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *European Food Research and Technology*, 230(4), 635-643.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M., Cosentino, S. 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 95(1) 51-59.
- Fagan, C. C., Everard, C., O'Donnell, C. P., Downey, G., Sheehan, E. M., Delahunty, C. M., & O'Callaghan, D. J. 2007. Evaluating mid-infrared spectroscopy as a new technique for predicting sensory texture attributes of processed cheese. *Journal of dairy science*, 90(3), 1122-1132.
- Fleet, G. H., Mian, M. A. 1987. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 4(2) 145-155.
- Freitas, C., Malcata, F. X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*. 83(3) 584-602.
- Friedman, H.H., J.E. Whitney, and A.S. Szczesniak. 1963. The texturometer: a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food Science* 28:390–396.
- Fox, P. F., J. Law, L. H. McSweeney and J. Wallace. 1983. Biochemistry of cheese ripening. P: 389-438. *In cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. General Aspects. P.F. Fox (ed.) Chapman and Hall, London.
- Foegeding, E. A., & Drake, M. A. 2007. Invited review: Sensory and mechanical properties of cheese texture. *Journal of dairy science*, 90(4), 1611-1624.
- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., & Topisirović, L. 2013. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International journal of food microbiology*, 166(2), 294-300.
- Gunasekaran, M. S., Ak, M. 2003. *Cheese rheology and texture*. CRC Press LLC.
- Gutiérrez, J. B. 2000. *Ciencia Bromatológica: Principios Generales de Los Alimentos*. Ed. Díaz de Santos. pág 596.

- Hammes, W. P., & Vogel, R. F. 1995. The genus lactobacillus. In *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 19-54). Springer US.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. 2006. The genera lactobacillus and carnobacterium. *Prokaryotes*, a handbook of biology of bacteria vol 4, 320-403.
- Hayaloglu, AA., Guven, M., Fox, PF., McSweeney, PLH. 2005. Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish white-brined cheese during ripening. *Journal of dairy science*. 88 (10) 3460-3474.
- Holzapfel, W. H., P. Haberer, R. Geisen, J. Bjorkroth and U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*; 73:365S-373S.
- Holzapfel, W. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food control*, 8(5), 241-258.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. *Modern Food Microbiology*. Springer US PP. 149-173.
- Jakobsen, M., Narvhus, J. 1996. Yeast and their Possible Beneficial and Negative Effects on the Quality of Dairy Products. *International Dairy Journal*. 6 (1996) 755 - 768.
- Kashket, E. R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*. 46(3) 233-244.
- Kemp, S. E., Hollowood, T., Hort, J. 2009. *Sensory evaluation a practical handbook*. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. P.p. 185.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., Shimazaki, K. 2004. Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications. *Journal of Dairy Science* 87 (12) 4050–4056.
- Lawless, H.T., and H. Heymann. 2010. *Sensory evaluation of food, principles and practices*. Springer Science and Business Media, LLC.
- Lianou, A., Koutsoumanis, K. P. 2011. Stochastic approach for integrating strain variability in modeling *Salmonella enterica* growth as a function of pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 254-261.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. 2014. *Lactic Acid Bacteria*. Springer Netherlands (pp. 103-203).
- Lockhart, S, R, J., Sophie P., Claude S., Jack D. P., Pfaller M. A., Sol D. R. 1997. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. *Microbiology*. 143(12) 3733-3746.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. 2011. Lactobacillales ord. nov." *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3 (2009): 464.
- Martley, F.G., Crow, V. L. 1993. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal*. 3(4) 461-483.
- Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y., Méndez, A. I. R., & Hernández-Sánchez, H. 2013. In Vitro Evaluation of the Probiotic Potential of Halotolerant Lactobacilli Isolated from a Ripened Tropical Mexican Cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(4), 239-251.

- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology*, 177, 136-154.
- Morales, F., Morales, J. I., Hernández, C. H., & Hernández-Sánchez, H. 2011. Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(6), 889-905.
- Pinho O., Mendes E., Alves M. M. y Ferreira I. 2004. Chemical, physical and sensorial characteristics of "Terrincho" ewe cheese. *Journal of Dairy science*. 87(2):249 - 257.
- Prillinger, H., Molnar, O., Eliskases-Lechner, F., Lopandic, K. 1999. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75 (1999.) 267–283.
- Ramos I. B., Bucio G. A., Bautista M. C., Aranda I. E., Izquierdo R. F., 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y Ciencia*. 25(2):159-171.
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., & Cocolin, L. 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International journal of food microbiology*, 126(1), 36-42.
- Roberts, T, A. Cordler Gram, L. 2005. Microorganisms In Food 6. Ed. By Roberts T. A., Cordier J. L., Gram L., Tompkin R. B., Pitt J. I., Gorris L. G. M. Y Swanson K. M. J.
- Romero, C. P.A., Leyva, R. G., Cruz, C. J. G., Santos, M. A. 2009. Evaluación de la calidad sanitaria de queso crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8 (1) 111-119.
- Rosenthal, A.J. 1999. *Food Texture Measurement and Perception*. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, Inc.
- Roos, S., Engstrand, L., & Jonsson, H. 2005. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 77-82.
- Sambrook, J., Russell D, W. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 3. Cold spring harbor laboratory press.
- Scott, R. R., Robinson, R., K. W., R, A., 1998. *Cheesemaking practice*. Springer Science & Business Media.
- Scott, R. 1981. *Cheese making practice*. Appl. Sci. Publish. LTD. London.
- Scott, B. G. 1958. Rheology in food research. *Advances in Food Research* 8:1–56.
- Szczesniak, A.S. 1963. Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science*. 28:385–389.
- Settanni, L., Gaglio, R., Guarcello, R., Francesca N., Carpino, S., Sannino, C., Todaro, M. 2013. Selected lactic acid bacteria as a hurdle to the microbial spoilage of cheese: Application on a traditional raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal* 32 (2013) 126-132.

- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, K. J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species. *Food Science and Technology* 42 (2009) 448–457.
- Szczesniak, A. S. 1987. The Meaning of textural Characteristics. *Crispness Journal of Texture Studies* 19. 51-59.
- Szczesniak, A. S. 1963. Classification of textural characteristics. *J. Food Sci*, 28(4), 385-389.
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*. 36(1) 1- 29.
- Stone, H., Bleibaum, R., & Thomas, H. A. 2012. *Sensory evaluation practices*. Academic press.
- Stone, H., Sidel, J. L. y Bloomquist, J. 1980. Quantitative descriptive analysis. *Cereal Foods World*, 25(10):642.
- Stone, H., Sidel, J. L. 2004. *Sensory evaluation practices – 3rd ed.* Elsevier Academic Press. USA.
- Stone, H. Sidel, J. L. 2004. *Sensory evaluation practices – 3rd ed.* Elsevier Academic Press. USA.
- Taboada, N., Nieuwenhove, C. V., Alzogaray, S. L., Medina, R. 2015. Influence of autochthonous cultures on fatty acid composition, esterase activity and sensory profile of Argentinean goat cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis* 40 (2015) 86–94.
- Tofalo, R., Fasoli, G., Schirone, M., Perpetuini, G., Pepe, A., Corsetti, A., & Suzzi, G. 2014. The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. *International journal of food microbiology*, 187, 41-49.
- Pacheco, F. P., & Galindo, A. B. 2010. Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1205-1216.
- Varela, P., Ares, G. 2014. *Comparison of Novel Methodologies for Sensory Characterization. Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling*, CRC Press.
- Villegas de G. A. y Cervantes Escoto. F. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*.19 (38): 146-164.
- Villegas de G.A. 2003. *Los Quesos Mexicanos 2ª Edición*. CIESTAAM, UACH. México.
- Viljoen, B. C. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*. 69(1) 37-44.
- Terzic-Vidojevic, A., Mihajlovic, S., Uzelac, G., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., TOPISIROVIC, L. & KOJIC, M. 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food microbiology*, 39, 27-38.



- Walstra, P., Geurts, T., Noomem, A. J., A van B. MAJS. 1999. Principles of milk-properties and processes. In "Dairy technology". New York: Basel Marcel Dekker, Inc.
- Welthagen, J. J., Viljoen, B. C. 1999. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. Food Microbiology. 16(1999) 63-73.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., & Van Boekel, M. A. J. S. 2001. *Dairy technology: Principles of milk properties and processes*, 14-15.
- Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E., Elías, L. G. 1992. *Metodos Sensoriales Basicos Para la Evaluación de alimentos*. Ottawa, Ont., CIID.

## 10 ANEXOS.

### Anexo 1. Secuencias nucleotídicas de bacterias ácido lácticas (BAL).

<b>Cepa</b>	<b>Secuencia</b>
<p>JCABB1 (<i>L. fermentum</i>)</p>	<p>TTATCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAG            ACTTAGAAAACCGCCTGCACTCTCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCT            TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTC            TGGTTAAATACCGTCAACGTATGAACAGTTACTCTCATACTGTTCTTTA            ACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTC            CATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG            AGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGG            CTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACAAGCTAATGCAC            CGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAAGCGTTGTTT            ATGCGAACAAACGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTGTCCC            CCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTG            GCGACAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCTTCAATCAATTGGGCCAACGCG            T</p>
<p>JCABB2 (<i>Leu. pseudomesenteroides</i>)</p>	<p>GCTTGACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAAC            CTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGAATGA            AACTTAGTGTGCGATGATACGAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGA            GATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC            AATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC            ACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGG            CGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCCG            TAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTT            GACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGG            TAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG            CAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATG            GCATTGAAAACCTGG</p>

*JCABB3*

(*Leu. pseudomesenteroides*)

ATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGC  
GAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACAT  
TTGGAAACAGATGCTAATACCGAATGAAACTTAGTGTCGCATGATACGAAGT  
TAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAG  
TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGA  
CTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGC  
TGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCG  
CGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAC  
AGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGAC  
GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATC  
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGT  
GCAGTAGAGGTAAGTGGAACCTC

*JCABB4*

(*Leu. pseudomesenteroides*)

GTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGG  
GGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGAATGAAACTTAGTGTCGCATG  
ATACGAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGC  
ATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGA  
GTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTA  
CGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAG  
CAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATG  
GGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAG  
AAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCG  
AGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAG  
TCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTT  
AACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAAC

*JCABB5* (*Leu.*

*pseudomesenteroides*)

AGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTG  
GGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGAATGAAACTTAGTGTCGCAT  
GATACGAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTG  
CATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCG  
AGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCT  
ACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGA  
GCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTAT  
GGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCA  
GAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCC  
GAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTA  
GTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGT  
TAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACCTCCATG

*JCABB6* (*Leu.*

*pseudomesenteroides*)

TCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGG  
GTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGAA  
CAGATGCTAATACCGAATGAAACTTAGTGTCGCATGATACGAAGTTAAAAG  
CGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGG  
GGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCG  
GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTA  
GGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGT  
GATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGA  
ATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAA  
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTT  
ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
GGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAG  
AGGTAAGTGGAAC

*JCABB7* (Leu.  
pseudomesenteroides)

TTTCAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAG  
GCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATGAACTTAGTGTC  
GCATGATACGAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGC  
GGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATA  
GCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAA  
CTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTG  
ATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTG  
TTGTATGGGAAGAAGCAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCA  
TACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAT  
GTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTT  
GATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAA  
ACTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACT

*JCABB8* (Leu.  
pseudomesenteroides)

GCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCG  
AACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTT  
GGAAACAGATGCTAATACCGAATGAACTTAGTGTCGCATGATACGAAGTTA  
AAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTT  
GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGAC  
TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCCTACGGGAGGCT  
GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGC  
GTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACA  
GCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACG  
GCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCC  
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTAACTAGAGTG  
CAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCTG

*JCABB9* (L. fermentum)

GAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTC  
GCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAG  
CGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTT  
GCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCT  
GCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAAACGGCCTACCAAGGCGATGATGC  
ATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCC  
ATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGC  
CTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCT  
CTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACCTGTTTACATACGTTGACGGTA  
TTTAACCAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGG  
TTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGGAGAAGTGCATCGG  
AAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATG

*JCABB10* (L. plantarum)

GCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATT  
TGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGC  
GGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCG  
CATGGTCCGAGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG  
CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT  
AGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTG  
ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGT  
TGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTT  
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC  
TGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCTG

*JCABB11* (L. plantarum)

CAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT  
GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCG  
GGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGC  
ATGGTCCGAGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGC  
GGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTA  
GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGA  
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTT  
GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT  
GGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATG

*JCABB12* (L. plantarum)

CAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT  
GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCG  
GGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGC  
ATGGTCCGAGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGC  
GGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTA  
GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGA  
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTT  
GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT  
GGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCAT

*JCABB13* (L. plantarum)

GTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGA  
GTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAACAG  
ATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTAAAAGATG  
GCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGG  
GGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATC  
GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG  
TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTG  
AGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT  
ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCT  
TCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAA  
GAGGACAGTGGAAT

*JCABB14* (*L. plantarum*)

CAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT  
GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCG  
GGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGC  
ATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGC  
GGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTA  
GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGA  
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGT  
GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT  
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAC

*JCABB15* (*L. plantarum*)

AATCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGA  
GTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGG  
GGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCAT  
GGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGG  
CGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGC  
CGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGAT  
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGT  
GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT  
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTC

*JCABB16* (*L. plantarum*)

AAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTG  
AGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGG  
GGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCA  
TGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCG  
GCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAG  
CCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGAT  
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGT  
GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT  
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCTG

*JCABB17* (*L. plantarum*)

GCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATT  
TGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGC  
GGGGATAACACCTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCG  
CATGGTCCGAGTTTCAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG  
CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT  
AGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTG  
ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGT  
TGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTT  
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC  
TGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTC

*JCABB18* (*L. helveticus*)

AGTCGAGCGAGCAGAACCAGCAGATTTACTTCGGTAATGATGCTAGGGACG  
CGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCATAGTCTGG  
GATACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAAGCAGATCGCATG  
ATCAGCTTATAAAAAGACGGCGTAAGCTGTGCTATGGGATGGCCCCGCGGT  
GCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCC  
GAGTTGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT  
TGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTGACGGTAATCAAC  
CAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAA  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACT  
GTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA

*JCABB19* (*L. helveticus*)

AATGCAAGTCGAGCGAGCAGAACCAGCAGATTTACTTCGGTAATGATGCTA  
GGGACGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCAT  
AGTCTGGGATACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAAGCAGA  
TCGCATGATCAGCTTATAAAAAGACGGCGTAAGCTGTGCTATGGGATGGCC  
CCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATG  
CATAGCCGAGTTGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
CAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGT  
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTC  
TGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTGACGGTAA  
TCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGA  
AGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGA  
AACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG

## Anexo 2. Secuencias nucleotídicas de levaduras (LEV)

**Cepa**  
JCABKM1  
(*Kluyveromyces marxianus*)

### **Secuencia**

AAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATT  
TGATAGTACCTTTACTACTTGGTATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC  
TAAAAACCCCGACTGTTTGGAAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAATCAATGCTC  
TTCTGAGCTCTTTGATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGACTTCGTGTCG  
GCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGC  
CTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGA  
GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC  
CAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTGG  
GTCTTGTAAATTGGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAG  
GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTA  
AAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGCTTGGTCAGCCGGTC  
CGCTTTTTTTCGCTGTAAGTGGTCTGACCGAGCCTTTCTTCTGGCTAGCCGTC  
TCTCGGGGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAG  
CAGGCCTTTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTC  
TATTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGCA  
TCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTG  
CGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATC  
GAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGAT  
CGGGTGGTGTTTTTATATACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTT  
GGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAA  
GGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAA  
CTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATT  
TTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTA  
ATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGCGATTAGCTTTTGTCT  
GATTTTGACACTTCTTAGAGGGACTATCGATTTCAAGTCGATGGAAGTTTGGAG  
CAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACAC  
TGACGGAGCCAGCGAGTAATAACCTTGGCCGAGAGGTTCTGGTAATCTTGTA  
AACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAAT  
TCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTATTGCTCCTTCAACGAGGAAT  
ACACCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATCAG  
CTTAGAGTAGAGGGCAACTTCCACTCGGGGCAGAGAAGCTAGT

JCABKM2  
(*Kluyveromyces marxianus*)

TAAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATT  
TTGATAGTACCTTTACTACTTGGTATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATG  
CTAAAAACCCCGACTGTTTGGAAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAATCAATGCT  
CTTCTGAGCTCTTTGATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGACTTCGTGTC  
GGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG  
CCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCGGGAGAGGG  
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAC  
CCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTGG  
GGTCTTGTAAATTGGAATGAGTACAATGTAATACCTTAACGAGGAACAATTGGA  
GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATT  
AAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGCTTGGTCAGCCGGT  
CCGCTTTTTTTCGCTGTAAGTGGTCTGACCGAGCCTTTCTTCTGGCTAACCTGT  
CTCTCGGGGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAA  
GCAGGCCTTTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTT  
CTATTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGC  
ATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACT  
GCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGAT  
CGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGA  
TCGGGTGGTGTTTTTATATACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTT  
GGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAA  
GGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAA  
CTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATT  
TTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTA  
ATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGCGATTAGCTTTTGTCT

GATTTTGACACTTCTTAGAGGGACTATCGATTTCAAGTCGATGGAAGTTTGAGG  
CAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCCTACAC  
TGACGGAGCCAGCGAGTAATAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGA  
AACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAAT  
TCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTACGTCCTGCCCTTTGTAC  
ACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATCAG  
CTTAGAGTAGAGGGCAACTTCCACTCGGGGCAGAGAAGCTAGT

JCABKM3  
(*Kluyveromyces  
marxianus*)

AAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATT  
TGATAGTACCTTTACTACTTGGTATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC  
TAAAAACCCCGACTGTTTGGAAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAATCAATGCTC  
TTCTGAGCTCTTTGATGATTATAATAACTTTTGAATCGCATGACTTCGTGTGC  
GCGATGGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGC  
CTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA  
GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC  
CAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTGG  
GTCTTGTAAATGGAATGAGTACAATGTAATAACCTTAACGAGGAACAATTGGAG  
GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTA  
AAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGCTTGGTCAGCCGGTC  
CGTTTTTTGCGTGTACTGGTCTGACCGAGCCTTTCTTCTTGCTAACCTGTCT  
TCTCGGGGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAG  
CAGGCCTTTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTC  
TATTTGTTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCA  
TCAGTATTC AATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTG  
CGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATC  
GAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGAT  
CGGGTGGTGTTTTTATATACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTT  
GGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAA  
GGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAA  
CTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATT  
TTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTA  
ATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGCGATTAGCTTTTGTCT  
GATTTTGACACTTCTTAGAGGGACTATCGATTTCAAGTCGATGGAAGTTTGAGG  
CAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTTCTGGGGCCGACGCGCCTACAC  
TGACGGAGCCAGCGAGTAATAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGA  
AACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAAT  
TCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTACGTCCTGCCCTTTGTAC  
ACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATCAG  
CTTAGAGTAGAGGGCAACTTCCACTCGGGGCAGAGAAGCTAGT

JCABKM4  
(*Kluyveromyces  
marxianus*)

TAAGCAATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTAT  
TTGATAGTACCTTTACTACTTGGTATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATG  
CTAAAAACCCCGACTGTTTGGAAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAATCAATGCT  
CTTCTGAGCTCTTTGATGATTATAATAACTTTTGAATCGCATGACTTCGTGTCT  
GGCGATGGTTCAATCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG  
CCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG  
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAC  
CCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTGG  
GGTCTTGTAAATGGAATGAGTACAATGTAATAACCTTAACGAGGAACAATTGGA  
GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATT  
AAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGCTTGGTCAGCCGGT  
CCGCTTTTTTGCCTGTACTGGTCTGACCGAGCCTTTCTTCTGGCTAACCTGT  
CTCTCGGGGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAA  
GCAGGCCTTTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTT  
CTATTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGC  
ATCAGTATTC AATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACT  
GCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT  
CGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGA  
TCGGGTGGTGTTTTTTATATACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTT  
GGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAA  
GGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAA  
CTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATT



TTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTA  
ATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGCATTAGCTTTTGTCT  
GATTTTGACACTTCTTAGAGGGACTATCGATTTCAAGTCGATGGAAGTTTGAGG  
CAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACAC  
TGACGGAGCCAGCGAGTAATAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGA  
AACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAAT  
TCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTATTACGTCCCTGCCCTTTGTAC  
ACACCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATCAG  
CTTAGAGTAGAGGGCAACTTCCACTCGGGGCAGAGAAGCTAGT

JCABKL5  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

TCATTAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGATATCTGTGG  
TAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATCTCGACCCTTTGGAAGAGATGTATT  
ATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTTGATGATTCATAATAACTTTTCG  
AATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT  
TTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAG  
GGTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGG  
CAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATA  
ACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAAATTGGAATGAGTACAATGTAATAAC  
TTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCGCGGTAATTC  
AGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGGTGCAGTTAAAGCTCGTAGTTGAATTT  
GGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATGTGCGCGCACTGGTTTTCAACCGGATC  
TTTCATTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGTGGGTGCAGGCGAACCAGGACTTTTA  
CTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCGAAAGCTCGAATATATTAGCATG  
GAATAATGGAATAGGACGTTTGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAA  
TGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTC  
TTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGACGTTTTTCATT  
AATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA  
ACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTTTTCTTATGACCCACTCG  
GCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTGGGGGGGAGTATGGTTCGCAA  
GGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGCAGCCTGC  
GGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGA  
TTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT  
TTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACT  
CTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGGCGTTGACTCTTCTTAGAGGACTATC  
GGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGAAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA  
CGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTACAACCTTG  
GCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCAT  
TGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTG  
CGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGCTAGTACCGATTGA  
ATGGCTTAGTAGGCCTCAGGATTTGCTTAGAGAAGGGGGCAACTCCATCTCA  
GAGCGAAGAAT

JCABKL6  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGG  
ATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATCTCGACCCTTTGGAAG  
AGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTTGATGATTCATAAT  
AACTTTTGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCC  
CTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGG  
GGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGTACCACATCCA  
AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGAC  
AATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAAATTGGAATGAGTACAATG  
TAAATACCTTAAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATTCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA  
GTTGAACTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATGTGCGCGCACTGGTTTT  
AACCGGATCTTTCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGTGGGTGCAGGCGAACCA  
GGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCGAAAGCTCGAATAT  
ATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGGA  
CCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGA  
GGTGAATTTCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGG  
ACGTTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCG  
TCGTAGTCTTAAACATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTTTTCTTA  
TGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTGGGGGGAGT  
ATGGTTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGT

GCAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACA  
CAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGA  
TGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGA  
GACCTTAACCTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGCCGGTTGACTCTTCTTAGA  
GGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGGCAATAACAGGTCTGTGAT  
GCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGT  
ACAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGG  
ATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTC  
ATCAGCTTGCCTTATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTAGT  
ACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTAGAGAAGGGGGCAAC  
TCCATCTCAGAGCGAAGAA

JCABKL7  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

GCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGATATCTGT  
GGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATCTCGACCCTTTGGAAGAGATGTAT  
TTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTTGATGATTCATAATAACTTTTC  
GAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC  
TTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTTCAACGGTAACGGGGGAATAA  
GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAG  
GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTACAATAAAA  
TAACGATACAGGGCAAATTCGGGCTTGTAAATTGGAATGACAATGTAATA  
CCTTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATT  
CCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAA  
CTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATGTCCGCGCACTGGTTTTCAACCGG  
ATCTTTCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGTGGGTGCAGGCGAACCCAGGACTT  
TACTTTGAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCGAAAAGCTCGAATATATTAGCA  
TGGATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGT  
AATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTGAGGTTGAAAT  
TCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAAGCATTTCGAAGGACGTTTTCA  
TTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCT  
TAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTTTTCTTATGACCCACT  
CGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCA  
AGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTG  
CGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGG  
ATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGTTGATGATGACCCGTT  
CTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACTTAA  
CCTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGGCGGTTGACTCTTCTTAGAGGGACTAT  
CGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG  
ACGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTACAACCTT  
GGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCA  
TTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTG  
CGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTAGTACCGATTGA  
ATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTAGAGAAGGGGGCAACTCCATCTCA  
GAG

JCABKL8  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

TGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATG  
GATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAATCTCGACCCTTTGGAA  
GAGATGATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTTGATGATTCATA  
ATACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTG  
CCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAAC  
GGGGAAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACAT  
CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGT  
GACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCCGGTCTTGTAAATTGGAATGAGTACA  
ATGTAATACCTTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATTCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTC  
GTAGTTGAACCTTTGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATGTCCGCGCACTGGTT  
TTCAACCGGATCTTTCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGTGGGTGCGACTGGAA  
CCAGGACTTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGCGCAAAGCTCGAA  
TATATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTA  
GGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTC  
AGAGGTGAAATCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAAGCATTGCCA  
AGGACGTTTTCTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATA  
CCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTTTTCT

TTATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG  
AGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGG  
AGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAG  
ACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGT  
GCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGTTAATTGCGATAACGAA  
CGAGACCTTAACCTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGCCGGTTGACTCTTCTT  
AGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGT  
GATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGACGGAGCCAGCG  
AGTACAACCTTGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCTGTGCTG  
GGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAA  
GTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGCT  
AGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTAGAGAAGGGGGC  
AACTCCATCTCAGAGCGAAGA

JCABKL9  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

TTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAG  
TTCCTTTACTACATGGATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAT  
CTCGACCCTTTGGAAGAGATGATTTTATTAGATAAAAAATCAATGCTTTCGGACT  
CCTTGATGATTCATAATAACTTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGT  
TCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGCCTACCATG  
GTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGACCTGAG  
AAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTA  
ATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCATTCCGGTCTTGTGTA  
ATTGGAATGAGTACAATGTAATACCTTAAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTC  
TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTG  
CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTAT  
GTCGCGCACTGGTTTTCAACCGGATCTTTCCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTG  
TGGGTGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCA  
GGCGAAAGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTA  
TTTTGTTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGGCATC  
AGTATTC AATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCG  
AAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGA  
AGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCG  
GGTGGTGTTTTTCTTATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTG  
GGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGAAAG  
GGCACCACGAGGAGTGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACT  
CACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTTT  
GTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAAT  
TGGGATAACGAACGAGACCTTAACTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGCCG  
GTTGACTCTTCTTAGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCAA  
TAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGA  
CGGAGCCAGCAGTACAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACT  
CCGTCTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACAGGAAATTCCT  
AGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTACGTTCCCTGCCCTTTGTACACAC  
CGCCCGTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTA  
GAGAAGGGGGCAACTCCATCTCAGAGCGAAGAAT

JCABCO10  
(*Candida  
orthopsilopsis*)

AGCAATTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTG  
ATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAA  
AATCCCGACTGTTTGAAGGGATGATTTTATTAGATAAAAAATCAATGCCTTCG  
GGCTCTTTGATGATTCATAATAACTTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGA  
TGGTTCAATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTAC  
CATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
GAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATC  
CCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTCCGGTCT  
TGTAATTGGAATGAGTACAATGTAATACCTTAAACGAGGAACAATTGGAGGGCA  
AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCTAATTTCCAGCTCCAAAAGCGTATATTAAGATT  
GTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCATC  
TTTTTTGATGCGTACTGGACCCAGCCGAGCCTTTCCTTCTGGCTAGCCTTTTGG  
CGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTTTGCT  
CGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTATGGTTCTATTTTGTGGT  
TTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGTATCAGTATTCAGT  
TGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTACTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATT

ACCAAGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCA  
GATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGTTGTTGTT  
CTTTTATTGACGCAATCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGG  
GGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC  
AGGAGTGGAGCCTGCCGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTC  
CAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGT  
GGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAAC  
GAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGCTGCTAGCATTGCTGGTATAGTCAC  
TTCTTAGAGGGACTATCGATTTCAAGTCGATGGAAGTTTGGAGCAATAACAGGT  
CTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACGGAGCC  
AGCGAGTATAAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGAAATCTTGTAACCTCCGTCG  
TGCTGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG  
CGAAGTCATCAGCTTGCCTTATTACGTCCTGCCCTTTGATACACACGCCCC  
GTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGTTTLAGAGAAG  
GGGGCAACTCCATCTTGAACCGAGAAGCT

JCABKL11  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

TGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATG  
GATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAATCTCGACCCTTTGGAA  
GAGATGATTTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTTGATGATTCATA  
ATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTTCAAATTTCTG  
CCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTTCAACGGGTAAC  
GGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACAT  
CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGT  
GACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACA  
ATGTAATACCTTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTC  
GTAGTTGAACCTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATGTCCGCGACTGGTT  
TTCAACCGGATCTTTCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGTGGGTGCAGGCGAA  
CCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCGAAAGCTCGAA  
TATATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTGGTTTCTA  
GGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGCATCAGTATTCAATTGTC  
AGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGGCCA  
AGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATA  
CCGTCTGATGCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATGCCGGTGGTGTGTTTTCT  
TTATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG  
AGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGG  
AGTGGAGCCTGCCGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAG  
ACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGT  
GCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAA  
CGAGACCTTAACCTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGCCGGTTGACTCTTCTT  
AGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGGCAATAACAGGTCTGT  
GATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGACGAGGCCAGCGG  
AGTACAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTAACCTCCGTCGTGCTG  
GGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAA  
GTCATCAGCTTGCCTTATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCCGT  
AGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTCAGGATTTGCTTAGAGAAGGGGGC  
AACTCCATCTCAGAGCGAAGAATCTG

JCABKL12  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

TACAGTAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTCC  
TTTACTACATGGATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAATCTCG  
ACCCTTTGGAAGAGATGATTTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTT  
GATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTTCT  
TCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTT  
CAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC  
GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAATTC  
AGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTCGGGTCTTGTAATT  
GGAATGAGTACAATGTAATACTTAAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTG  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTGC  
AGTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATG  
TCGCGCACTGGTTTTCAACCGGATCTTTCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGT  
GGGTGCAGGCGAACCGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAG  
GCGAAAGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTAT

TTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCA  
GTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGA  
AAGCATTTGCCAAGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAA  
GATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGG  
GTGGTGTTTTTCTTATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGG  
GTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG  
GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTC  
ACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTG  
TGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATT  
GCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGCCGG  
TTGACTCTTCTTAGAGGGACTATCGGTTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCAAT  
AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACTACTGAC  
GGAGCCAGCGAGTACAACCTTGCCGAGAGGTCTGGTAACTTTGTAAGAACTC  
CGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTA  
GTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACC  
GCCCCTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTAG  
AGAAGGGGGCAACTCCATCTCAGA

JCABKL13  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

TACAGTGAACCTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTCC  
TTTACTACATGGATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAATCTCG  
ACCCTTTGAAGAGATGATTTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGACTCCTT  
GATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTTCA  
TCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTT  
CAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC  
GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAATTC  
AGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCATTCGGGTCTTGTAATT  
GGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTCTG  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTGC  
AGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATG  
TCGCGCACTGGTTTTCAACCGGATCTTTCCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGT  
GGGTGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAG  
GCGAAAGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTAT  
TTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCA  
GTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGA  
AAGCATTTGCCAAGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAA  
GATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGG  
GTGGTGTTTTTCTTATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGG  
GTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG  
GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTC  
ACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTG  
TGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATT  
GCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGGGTTGCTGCGACTTGCCGG  
TTGACTCTTCTTAGAGGGACTATCGGTTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCAAT  
AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACTACTGAC  
GGAGCCAGCGAGTACAACCTTGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACTC  
CGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTA  
GTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACC  
GCCCCTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTAG  
AGAAGGGGGCAACTCCATCTCAGA

JCABDH14  
(*Debaryomyces  
hansenii*)

TACAGTGAACCTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACC  
TTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCC  
ACTGTTTGAAGGGATGATTTTATTAGATAAAAAATCAATGCTTTTCGGAGCTCT  
TTGATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTC  
ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTT  
TCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA  
CGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCCGACA  
CGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCTTTCCGGTCTTGTAAT  
TGGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTG  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCA  
GTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCTTGGTTGGCCGGTCCGCCTTTTTGG  
CGAGTACTGGACCAACCGAGCCTTTCCTTCTGGCTAACCTTTCGCCCTTGTG

GTGTTTGGCGAACCCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGG  
CCTTTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTATGGTTCTATT  
TTGTTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCA  
GTATTCAGTTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTACTGAAAGCTAACTACTGCG  
AAAGCATTGGCCAAGGACGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGA  
AGATGATCAGATAACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCG  
GGTGTGTTCTTTTTTTGACGCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTG  
GGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG  
GGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACT  
CACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTT  
GTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAAT  
TGCATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGTCTGCTAGCTTTTGTCTGG  
TATAGTCACTTCTTAGAGGGACTATCGATTTCAAGTCGATGAAAGTTTGAGGCA  
ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTG  
ACGGAGCCAACGAGTATTAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGAAATCTTGTGAAA  
CTCCGTCTGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTC  
CTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTATTGCTCCCTGCCCTTTGTACAC  
ACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGTT  
TAAAGAAGGGGGCAACTCCATCTTGAACCGAAAAGCTGGTC

JCABSC16  
(*Saccharomyces  
cerevisiae*)

TTCTCCGCTCTGAGATGGAGTTGCCCCCTTCTCTAAGCAGATCCTGAGGCCTCA  
CTAAGCCATTCAATCGGTACTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGA  
CGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGAATTCCTCGTTGAAGAG  
CAATAATTACAATGCTCTATCCCCAGCACGACGGAGTTTACAAGATTACCAAG  
ACCTCTCGGCCAAGGTTAGACTCGCTGGCTCCGTCAAGTGTAGCGCGCTGCG  
GCCGAGAACGTCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAATCTCCATCG  
GCTTGAACCGATAGTCCCTCTAAGAAGTGGACAACCAGCAAATGCTAGCAACC  
ACTATTTAGTAGGTTAAGGTCTCGTTCTGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACT  
CCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCACAAAATCAAGAAAGAGCTC  
TCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCCGTGTTGAGT  
CAAATTAAGCCGAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAA  
GTTTCAGCCTTGCAGCCATACTCCCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCGT  
AAGGTGCCGAGTGGGTCAATTAATAAACCACCCGATCCCTAGTCGGCATAG  
TTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCATCTTTCGATCCCCTAACTTTCGTT  
CTTGATTAATGAAAACGTCTTGGCAAATGCTTTTCGACAGTAGTTAGTCTTCAATA  
AATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTGAATACTGATGCCCCCGACCGTCCCTA  
TTAATCATTACGATGGTCTTAGAAAACCAACAAAATAGAACCAACGTCCTATTCT  
ATTATCCATGCTAATATATTGAGCAATACGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTT  
TCAAAGTAAAAGTCCCGTTTCGCCAAGAGCCACAAGGACTCAAGGTTAGCCAG  
AAGGAAAGGCCCGTTGGAAATCCAGTGCACGAAAAATCGGACCGGTCAACC  
GGGTCCAAAGTTCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAACCTTAAATATACGCTAT  
TGGAGCTGGAATTACCGCGCTGCTGGCACCAGACTTGCCTTCAATTTGTTCC  
TCGTTAAGGTATTTACATTGTAATCCTCAATTACAAGACCCGAATGGGCCCT  
GTATCGTTATATATTGTCACTACCTCCCTGAATTAGGATTGGGTAATTTGCGCGC  
CTGCTGCCTTCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATC  
GAACCCTTATTCCCCGTTACCCGTTGAAACCATGGTAGGCCACTATCCTACCAT  
CGAAAGTTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAACCATCGCCAGCACAAAGGCCATG  
CGATTGAAAAGTTATTATGAATCATCAAAGAGTCCGAAGACATTGATTTTTTAT  
CTAATAAATACATCTCTTCCAAAGGGTCGAGATTTTAAAGCATGTATTAGCTCTAG  
AATTACCACAGTTATACCATGTAGTAAAGGAACTATCAAATAAACGATAACTGAT  
TTAATGAGCCATTTCGAGTTTCACTGTATAAA

JCATD17  
(*Torulasporea  
delbrueckii*)

TGTCTAAGTATAAGCAATTTATACAGTGAACCTGCGAATGGCTCATTAAATCAGT  
TATCGTTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGTATAACTGTGGTAATTTCTAGAG  
CTAATACATGCTTAAAACTCTGACCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAA  
ATCAATGTCTTCGGACTCTTGTGATGATTGATAATAACTTTTTGCAATGCATGGCC  
TTGTGCTGGCGATGGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGG  
ATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCG  
GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGGCGCGC  
AAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGC  
CCATTCCGGTCTTGTAAATTTGAATGAGTACAATGTAATACCTTAAACGAGGAAC  
AATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCACGACCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC

GTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGCCTGGTT  
GGCCGTCCGATTTTTTCGTGTAAGTTTCCAACCGGGCCTTTCCTTCTGGCT  
AACCTTGGGTCCCTTGTGGCCCTTGGCGAACCAAGGACTTTTACTTTGAAAAAATT  
AGAGTGTTCAAAGCAGGCGTATTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAAT  
AGGACGTTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGG  
ACGGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATTG  
AAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTTATTAATCAAGAACG  
AAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTA  
TGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTTTTTTACTGACCCACTCGGCACCTTACG  
AGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTT  
AAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCTGCGGCTTAATTTGA  
CTCAACACGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGA  
GAGCTCTTTCTTGTATTTTGTGGTGGTGCATGGCCGTTTATGTTGGTGA  
GTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGT  
GGTGCTAGCATTGCTGGTTATCCACTTCTTAGAGGGACTATCGGTTTCAAGCC  
GATGGAAGTTTGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCC  
GCACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTCTAACCTTGGCCGAGAGGTC  
TGGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGC  
TCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGGCTTGTATTAGT  
CCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTAGTACCGATTGACTGGCTTAGTG  
AGGCCTCAGGATCTGCTTAGAGAAGGGGGCAACTCCATCTCAGAGCGGAGAAT

JCABCO18  
(*Candida  
orthopsilopsis*)

TTATACAGTGAAGTGCATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGT  
ACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAAATCC  
CGACTGTTTGAAGGGATGATTTATTAGATAAAAAATCAATGCCTTCGGGCTC  
TTTGATGATTCATAATAACTTTTGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTT  
ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGT  
TCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA  
CGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCCGACA  
CGGGGAGGTAGTGACAATAATAACGATACAGGGCCCTTTCCGGTCTTGTAAAT  
TGGAAATGAGTACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTG  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAAAAGCGTATATTAAGTTGTTGCA  
GTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCATCTTTTTTG  
ATGCGTACTGGACCCAGCCGACCTTTCTTCTGGCTAGCCTTTTGGCGGAGAGT  
AGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCGCTTTGCTCGAATAT  
ATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTATGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGG  
ACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGTATCAGTATTCAGTTGTCAGA  
GGTGAAATTTGGATTTACTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTACCAAGG  
ACGTTTTTCAATTAACAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCG  
TCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGTTGTTGTTCTTTTATT  
GACGCAATCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTA  
TGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCAGGAGAGTG  
GAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCAGGTCCAGACAC  
AATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGTATTTTGTGGTGGTGGTGCAT  
GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAG  
ACCTTAACCTACTAAATAGTGTGCTAGCATTTGCTGGTATAGTCACTTCTTAGA  
GGGACTATCGATTTCAAGTCGATGGAAGTTTGGGCAATAACAGGTCTGTGATG  
CCCTTAGACGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTA  
TAAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGAAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGG  
ATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTC  
ATCAGCTTGCCTTATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACT  
ACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGGTTTAGAGAAGGGGGCAAC  
TCCATCTTGAACCGAGAAGCTAGT

JCABSC21  
(*Saccharomyces  
cerevisiae*)

TGTATGACAAGTTTGTCCAATTCTCCGCTCTGAGATGGAGTTGCCCCCTTCTCT  
AAGCAGATCCTGAGGCCTACTAAGCCATTCAATCGGTACTAGCGACGGGCGG  
TGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACT  
AGGAATTCCTCGTTGAAGAGCAATAATTACAATGCTCTATCCCCAGCACGACGG  
AGTTTACAAAGATTACCAAGACCTCTCGGCCAAGGTTAGACTCGCTGGCTCCG  
TCAGTGTAGCGCGCGTGCAGGCCAGAACGTCCTAAGGGCATTACAGACCTGTTA  
TTGCCTCAAACCTTCCATCGGCTTGAACCGATAGTCCCTCTAAGAAGTGGATAA  
CCAGCAAATGCTAGCACCACTATTTAGTAGGTTAAGGTCTCGTTTCTGATCGCA

ATTAAGCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCA  
CAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGT  
GAGTTTCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACTCCTTGTGGTGC  
CCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGGCACCATACTCCCCCAGAACC  
CAAAGACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGAGTGGGTCAATAAAAAAAACACCAC  
CCGATCCCTAGTCGGCATAGTTTTATGGTTAAGACTACGACCGATCTGATCATC  
TTCGATCCCCTAACTTTCTGTTCTTGATTAATGAAAACGTCCTTGGCAAATGCTTT  
CGCAGTAGTTAGTCTTCAATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTGAATACT  
GATGCCCCCGACCGTCCCTATTAATCATTACGATGGTCTAGAAAACCAAAAA  
TAGAACCAAACGTCCTATTCTATTATTCCATGCTAATATATTCGAGCAATACGCC  
TGCTTTGAACACTCTAATTTTTTTCAAAGTAAAAGTCCTGGGTTCGCCAAGAGCC  
ACAAGGACTCAAGGTTAGCCAGAAGGAAAGGCCCGTTGGAAATCCAGTACAC  
GAAAAAATCGGACCGCCAACCGGCCAAAGTTCAAGTTTAACTGATCTGATCAAC  
TGCAACAACCTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCAC  
CAGACTTGCCTCCAATTGTTCTCGTTAAGGTATTTACATTGTACTCATTCCAA  
TTACAAGACCCGAATGGGCCCTGTATCGTTATTTATTGTCACACTACCTCCCTGAAT  
TAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCTTGGATGTGGTAGCCGTTTC  
TCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCCTTATCCCCGTTACCCGTTGAAACCAT  
GGTAGGCCACTATCCTACCATCGAAAGTTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAACC  
ATCGCCAGCACAAAGGCCATGCGATTGCGAAAAAGTTATTATGAATCATCAAAGAT  
CCGAAGACATTGATTTTTATCTAATAAATACATCTCTTCCAAAGGGTTCGAGATT  
TTAAGCATGTATTAGCTCTAGAATTACCACAGTTATACCATGTAGTAAAGGAACT  
ATCAATAAACGATAACTGATTTAATGAGCCATTGCGAGTTTCACTGTATAAATT  
GCTTATACTAGACA

JCABKL22  
(*Kluyveromyces  
lactis*)

TACAGTGAACACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTGATAGTTCC  
TTACTACATGGATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAAATCTCG  
ACCCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCCGACTCCTT  
GATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGGTTTCA  
TCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTT  
CAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC  
GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAATTC  
AGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCACTCGGGTCTTGTAATT  
GGAATGAGTACAATGTAATACTTAAACGATAACGAGGAACAACACTGGAGGCAATCTG  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGGTTGTTGTC  
AGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTATG  
TCGCGCACTGGTTTTCAACCGGATCTTCTCTGGCTAACCTGTACTCCTTGT  
GGGTGCAGGCGAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAG  
GCGAAAGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTAT  
TTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGGCATCA  
GTATTCAATTGTGAGAGGTGAAATTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGA  
AAGCATTTGCCAAGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAA  
GATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGG  
GTGGTGTTTTTCTTATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGG  
GTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG  
GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAAATTTGACTCAACACGGGGAAACTC  
ACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTG  
TGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATT  
GCGATAACGAACGAGACCTTAACTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGCCGG  
TTGACTCTTCTTAGAGGGACTATCGGTTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGAGCAAT  
AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCTACTACTGAC  
GGAGCCAGCGAGTACAACCTTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACTC  
CGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTA  
GTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACC  
GCCCGTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTAG  
AGAAGGGGGCAACTCCATCTCAGAGCGAAGAATC

JCABSC23  
(*Saccharomyces  
cerevisiae*)

TTCTCCGCTCTGAGATGGAGTTGCCCTTCTCTAAGCAGATCCTGAGGCCTCA  
CTAAGCCATTCAATCGGTACTAGCGACGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGA  
CGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGAATTCCTCGTTGAAGAG  
CAATAATTACAATGCTCTATCCCCAGCACGACGGAGTTTCAAGATTACCAAG  
ACCTCTCGGCCAAGGTTAGACTCGCTGGCTCCGTGAGTGTAGCGCGCTGCG



GCCCAGAACGTCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCATCG  
GCTTGAAACCGATAGTCCCTCTAAGAAGTGGACAACCAGCAAATGCTAGCACC  
ACTATTTAGTAGGTTAAGGTCTCGTTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACT  
CCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCACAAAATCAAGAAAGAGCTC  
TCAATCTGTCAATCCTTATTGTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCGTGTGAGT  
CAAATTAAGCCGCAAGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTAA  
GTTTCAGCCTTGGCACCATACTCCCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCGT  
AAGGTGCCGAGTGGGTCAATTAACCAACACCACCCGATCCCTAGTCGGCATAG  
TTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCATCTTCGATCCCCTAACCTTCGTT  
CTTGATTAATGAAAACGTCTTTGGCAAATGCTTTTCGCAGTAGTTAGTCTTCAATA  
AATCCAAGAATTTACCTCTGACAATTGAATACTGATGCCCCCGACCGTCCCTA  
TTAATCATTACGATGGTCTAGAAAACCAAAAATAGAACCAAAACGTCTATTCT  
ATTATTCATGCTAATAATATTCGAGCGATACGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTT  
TTCAAAGTAAAAGTCCCGGTTCCGCAAGAGCCACAAGGACTCAAGGTTAGCC  
AGAACGAAAGGCCCGTTGGAATTCAGTGCACGAAAAAATCGGACCGGCCAA  
CCGGGCCCAAAGTTCAACTACGAGCTTTTTAACTGCACCAACTTTAATTATACC  
GGCTAATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCTCCAA  
TTGTTCTCGTTAAGGTATTTACATTGTACTCATTCCAATTACAAGACCCGAATG  
GGCCCTGTATCGTTATATATTGCTACTACCTCCCTGAATTAGGATTGGGTAATTT  
GCGCGCCTGCTGCCTTCCCTTGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCC  
GGAATCGAACCTTATTCCCGTTACCCGTTGAAACCATGGTAGGCCACTATCC  
TACCATCGAAAGTTGATAGGGCAGAAAATTTGAATGAACCATCGCCAGCACAAG  
GCCATGCGATTGAAAAGTTATTATGAATCATCAAAGAGTCCGAAGACATTGAT  
TTTTTATCTAATAAATACATCTCTTCAAAGGGTCGAGATTTAAGCATGATTAG  
CTCTAGAATTACCACAGTTATACCATGTAGTAAAGGAACTATCAAATAAACGATA  
ACTGATTTAATGAGCCATTTCGAGTTTCACTGTAT

JCABKL24  
(*Kluyveromyces*  
*lactis*)

ATTTATACAGTAAAACGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATA  
GTTCCCTTACTACATGGATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTTAAAA  
TCTCGACCCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGTCTTCGGAC  
TCCTTGATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCGATGG  
TTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATG  
GTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCCCTGAG  
AAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCAAAATACCAACTCTA  
ATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCAAATTCGGGTCTTGTA  
ATTGGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAACCTGGAGGGCAAGTC  
TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTG  
CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGTCTGGTTGTCCGGTCCGACTTTAT  
GTCGCGCACTGGTTTTCAACCGGATCTTTCTTCTGGCTAACCTGTACTCCTTG  
TGGGTGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCA  
GGCGAAAGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTTTGGTTCTA  
TTTTGTTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCCGGGGC  
AGTATTCAAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCG  
AAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGA  
AGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCG  
GGTGGTGTTTTTCTTATGACCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTG  
GGTCTGGGGGAGTATGGTCGAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAG  
GGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACT  
CACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTT  
GTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAAT  
TGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGGGTTGCTGGCACTTGCCG  
GTTGACTCTTCTTAGAGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGGAGCAA  
TAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGA  
CGGAGCCAGCGAGTACAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACT  
CCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCT  
AGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGGCTTATTACGTCCCTGCTTTGTACACAC  
CGCCCGTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATTTGCTTA  
GAGAAGGGGGCAACTCCATCTCAGAGCGAAGAATCTGGT

**Anexo 3** Formato del cuestionario usado para el estudio del Perfil Ideal del queso crema.

**STUDIO EN QUESO CREMA**  
No. Cuestionario \_\_\_\_\_

**A. Nombre** \_\_\_\_\_

**B. ¿En qué rango esta su edad? (Seleccione una opción con una X)**

16- 20 años (1)	21-27 años (2)	28-44 años (3)	45-54 años (4)	Más de 55 años (5)

**C. ¿Sexo?**

Masculino (1)	Femenino (2)

**D. Lugar de origen (Estado, localidad)**

\_\_\_\_\_

**E. ¿Qué tipo de queso consume regularmente?**

Panela	De hebra	Crema	Manchego	Otro (especifique)

**F. ¿Consume queso crema?**

<b>Si</b>	<b>No</b>

**G. Si consume queso crema, indique con qué frecuencia lo hace (marque con una X)**

Diario (1)	Una vez a la semana (2)	Una vez al mes (3)	Eventualmente (4)

**H. ¿En qué forma consume el queso crema? (Marque con una X)**

Desmoronado	Untado	Quesadillas	Solo	Otro (especifique)

**I. De los quesos que encuentran disponibles en el mercado, cual queso prefiere consumir**

\_\_\_\_\_

**J. ¿Consume quesos elaborados con leche cruda?**

<b>Si</b>	<b>No</b>

¿Cuál? \_\_\_\_\_

**MUESTRA \_\_\_\_\_**

A1. ¿Qué intensidad tiene el COLOR CREMA de la muestra? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

A2. ¿Qué intensidad de COLOR CREMA sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

B1. ¿Qué intensidad de OLOR tiene la muestra? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

B2. ¿Qué intensidad de OLOR sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

B3. ¿Qué tipo de OLOR identifica usted en la muestra?

R: \_\_\_\_\_

C1. ¿Qué nivel de DUREZA AL TACTO tiene la muestra? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

C2. ¿Qué nivel de DUREZA AL TACTO sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

D1. ¿Qué nivel de DUREZA EN BOCA tiene la muestra? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

D2. ¿Qué nivel de DUREZA EN BOCA sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

E1. ¿Qué tan SALADA es esta muestra? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

E2. ¿Qué nivel de SALADO sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

F1. ¿Qué tan AMARGA es esta muestra? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

F.2 ¿Qué nivel de AMARGOR sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)  
Nada Mucho

---

G1. ¿Qué tan ACIDA es esta muestra? (Coloque una marca en la línea)

Nada

Mucho

---

G2. ¿Qué nivel de ACIDEZ sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)

Nada

Mucho

---

H1. ¿Qué tan ELÁSTICA es esta muestra? (Coloque una marca en la línea)

Nada

Mucho

---

H2. ¿Qué nivel de ELASTICIDAD sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)

Nada

Mucho

---

I1 ¿Que intensidad de OLOR a ESTABLO tiene la muestra? (Coloque una marca en la línea)

Nada

Mucho

---

I1 ¿Que intensidad de OLOR a ESTABLO sería el ideal de su preferencia? (Coloque una marca en la línea)

Nada

Mucho

---

9. ¿Diría que este producto es ACEPTABLE? SI  NO

10. ¿COMPRARIA este producto si estuviera disponible en el mercado? SI  NO

11. ¿Compraría este producto si supiera que fue fabricado con leche cruda? **SI**  **NO**