



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DINÁMICA MICROBIANA Y DE BIOACTIVIDADES DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS.

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN

CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

BLANCA NAYELLI OCAMPO MORALES

Bajo la supervisión de:

Arturo Hernández Montes, PhD.



APROBADA



Chapingo, Estado de México, junio de 2024

DINÁMICA MICROBIANA Y DE BIOACTIVIDADES DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS.

Tesis realizada por Blanca Nayelli Ocampo Morales bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

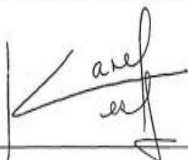
DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR: 
PhD. ARTURO HERNANDEZ MONTES

CO-DIRECTOR: 
PhD. JOSÉ ENRIQUE HERBERT PUCHETA

ASESOR: 
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR: 
DRA. VERENICE TORRES SALAS

LECTOR
EXTERNO: 
DR. KAREL JOHAN ESTRADA GUERRA

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS	vii
DEDICATORIAS	xii
AGRADECIMIENTOS	xiii
DATOS BIOGRÁFICOS	xv
RESUMEN GENERAL	xvi
GENERAL ABSTRACT	xvii
1.INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. Hipótesis	3
1.4. Organización de la tesis.....	3
1.5. Literatura citada	4
2.REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1. Queso Crema de Chiapas	6
2.2. Panorama general de la metagenómica	7
2.2.1. Metagenómica en alimentos	7
2.2.2. Metagenómica dirigida y no dirigida	7
2.2.3. Metagenómica en queso	15
2.2.4. Flujo de trabajo metagenómico para queso.....	16
2.2.4.1. Extracción de ADN	16
2.2.4.2. Amplificación por PCR y preparación de librerías.....	20
2.3. Péptidos bioactivos en queso	21
2.3.1. Perspectiva general de péptidos antimicrobianos.....	24
2.3.1.1. Aspectos generales de la resistencia antimicrobiana	24
2.3.1.2. Características de péptidos antimicrobianos	25
2.3.1.4. Péptidos antimicrobianos en queso	28

2.4. Actividad antiinflamatoria de péptidos de productos lácteos.....	29
2.5. Metabolómica para la determinación de ácidos grasos en alimentos.	34
2.6. Identificación de compuestos en alimentos con RMN.....	39
2.7. Literatura citada	40
3. CAMBIOS EN EL MICROBIOMA DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS DURANTE LA MADURACIÓN.....	57
3.1. Resumen	57
3.2. Abstract.....	58
3.3. Introducción	59
3.4. Materiales y metodología	61
3.4.1. Obtención de muestras de queso Crema de Chiapas	61
3.4.2. Análisis fisicoquímico de queso Crema de Chiapas	62
3.4.3. Análisis microbiológico	62
3.4.4. Extracción de ADN	62
3.5. Análisis estadístico	63
3.5.1. Análisis estadístico fisicoquímico y microbiológico	63
3.5.2. Análisis bioinformático de metagenómica.....	63
3.6. Resultados y discusión	64
3.6.1. Análisis fisicoquímico del queso Crema de Chiapas	64
3.6.2. Análisis microbiológico del queso Crema de Chiapas	66
3.6.3. Metagenómica	68
3.6.3.1. Dinámica bacteriana en queso Crema de Chiapas durante la maduración.....	68
3.6.3.2. Dinámica de hongos y levaduras en queso Crema de Chiapas	75
3.7. Conclusiones	82
3.8. Literatura citada	82
4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIINFLAMATORIA EN EXTRACTOS DE QUESO CREMA DE CHIAPAS.	97
4.1. Resumen	97
4.2. Abstract.....	98
4.3. Introducción	99

4.4. Materiales y métodos.....	100
4.4.1. Actividades biológicas.....	100
4.4.1.1. Obtención de extractos.....	100
4.4.1.2. Actividad antiinflamatoria.....	101
4.4.1.3. Actividad antimicrobiana.....	102
4.5. Análisis estadístico	103
4.6. Resultados y discusión	104
4.6.1. Actividad antimicrobiana de extractos de queso Crema de Chiapas para <i>Listeria innocua</i> ATCC3309.....	104
4.6.2. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos contra <i>Escherichia coli</i> K12	105
4.6.3. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos contra <i>Micrococcus</i> <i>luteus</i> CDBBB1018.....	106
4.6.4. Comparación entre queserías de la actividad microbiana del queso crema de Chiapas.....	107
4.7. Análisis de datos de actividad antiinflamatoria	108
4.8. Conclusiones	111
4.9. Literatura citada	111
5. METABOLÓMICA BASADA EN RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE QUESOS CREMA DE CHIAPAS.....	119
5.1. Resumen	119
5.2. Abstract.....	120
5.3. Introducción	121
5.4. Materiales y métodos.....	122
5.4.1. Obtención de extractos.....	122
5.4.2. Adquisición ¹ H-NMR	123
5.4.3. Análisis estadístico	124
5.5. Resultados y discusión	124
5.5.1. RMN para separar muestras por tiempo de maduración	124
5.5.2. Resonancia magnética nuclear para separar muestras por quesería	133

5.6. Conclusiones	138
5.7. Literatura citada	139
6. METABOLÓMICA NO DIRIGIDA DE INFRARROJO CERCANO CON ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE NO SUPERVISADO Y SUPERVISADO DE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN QUESOS.....	143
6.1. Resumen	143
6.2. Abstract.....	144
6.3. Introducción	145
6.4. Materiales y métodos.....	149
6.4.1. Quesos y materiales	149
6.4.2. Detalles de la adquisición de la absorbancia en el NIR.....	150
6.4.3. Análisis estadístico	151
6.5. Resultados y discusión	151
6.6. Conclusiones	172
6.7. Literatura citada	173
7. CONCLUSIONES GENERALES	178
8. ANEXOS.....	180

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Metagenómica de escopeta en productos lácteos.....	13
Cuadro 2. Quesos de diferentes países donde se realizó el análisis metagenómico.....	17
Cuadro 3. Actividad antimicrobiana en quesos.....	31
Cuadro 4. Estudios con NIR para la detección de ácidos grasos en diferentes matrices alimentarias.....	36
Cuadro 5. Análisis fisicoquímico de queso Crema de Chiapas.....	66
Cuadro 6. Comparaciones múltiples por pares para las actividades antimicrobianas en extractos de queso para <i>L. innocua</i> ATCC3309 a diferentes tiempos de maduración.....	105
Cuadro 7. Comparaciones múltiples por pares para las actividades antimicrobianas en extractos de queso para <i>M. luteus</i> CDBBB1018 a diferentes tiempos de maduración.....	106
Cuadro 8. Prueba de Mann-Whitney para actividad antimicrobiana para <i>Listeria innocua</i> ATCC3309 entre queserías.....	107
Cuadro 9. Prueba de Mann-Whitney para actividad antimicrobiana para <i>Escherichia coli</i> K12 entre queserías.....	108
Cuadro 10. Prueba de Mann-Whitney para actividad antimicrobiana para encontrar diferencia antimicrobiana entre los extractos de queso entre quesería cuando se adiciona <i>Micrococcus luteus</i> CDBBB1018.....	108
Cuadro 11. Comparaciones múltiples por pares de la actividad antiinflamatoria a diferentes tiempos de maduración del Queso Crema de Chiapas.....	109
Cuadro 12. Prueba de Mann-Whitney para actividad antiinflamatoria entre queserías.....	110
Cuadro 13. Señales de vibraciones de ácidos grasos.....	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización del gen 16S en el ribosoma procarionte.....	9
Figura 2. Localización de los ITSs en hongos y levaduras (Pfister & Kühn, 2018; Fathy et al., 2023).....	11
Figura 3. Metagenómica de escopeta (Clark & Pazdernik, 2013).....	12
Figura 4. Diagrama de flujo de la secuenciación por síntesis (Illumina, 2010)...	22
Figura 5. a) Modelo de duela de barril, b) Modelo de poro toroidal, c) Modelo de alfombra (Zhang et al., 2021).....	28
Figura 6. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) estimula a las células del carcinoma gástrico y a las células mesoteliales peritoneales para secretar metaloproteinas de matriz 9 (MMP-9), que promueve la invasión de células cancerosas (Ågren & Auf Dem Keller, 2020).....	30
Figura 7. Conteo de bacterias mesófilas en queso Crema de Chiapas en tres tiempos de maduración (T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d). Letras iguales indican que no hay diferencia estadística significativa ($p>0.05$).....	67
Figura 8. Gráfica de diversidad alfa con los índices de Chao1, Shannon y Simpson en tres tiempos de maduración (T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d) con el gen 16S.....	69
Figura 9. Abundancia relativa de bacterias en queso Crema de Chiapas durante la maduración (T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d).....	71
Figura 10. Diagrama de Venn que muestra el número de OTU específicas y comunes (OTU 102) entre tres tiempos de maduración de queso Crema de Chiapas de leche cruda de vaca construido con las secuencias sin aplicar un parámetro de selección para OTUS que se encuentran en poca abundancia...	75
Figura 11. Gráfica de diversidad alfa expresada en índices, Chao, Shannon y Simpson para tres tiempos de maduración (T1, T2 y T3) del queso Crema de Chiapas con la región ITS.....	77
Figura 12. Abundancia relativa de hongos y levaduras de queso Crema de Chiapas en la maduración.....	80
Figura 13. Diagrama de Venn que muestra el número de OTUs específicas y comunes (OTU 30) entre tres tiempos de maduración de queso Crema de Chiapas de leche cruda de vaca construido por los OTUs crudos sin aplicar un parámetro de selección.....	81
Figura 14. Proyecciones de componente principal no supervisado en la matriz seleccionando todas las regiones (A) y matriz donde se seleccionó la región aromática (B). Biplots de la matriz de datos sin selección de regiones (C) y matriz donde se seleccionó la región aromática (D).....	125
Figura 15. Proyecciones de PLS-DA (A) de la matriz donde se seleccionaron las señales dentro de todo el rango de desplazamientos químicos ($\delta^1\text{H}$) y PLS-DA (B) obtenida de la matriz donde se seleccionó la región aromática. Coeficientes $R^2\text{X}$, $R^2\text{Y}$ y Q^2 observados y con validación cruzada para PLS-DA(C y D, respectivamente).....	127

Figura 16. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA obtenida por la matriz donde se seleccionaron las señales dentro de todo el rango de desplazamientos químicos ($\delta^1\text{H}$). Los recuadros coloreados de la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito.....	128
Figura 17. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA a partir de la región aromática. Los recuadros coloreados de la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito. En la izquierda se observan desplazamientos químicos de compuestos.....	130
Figura 18. Diagrama de árbol para la matriz de datos completa.....	131
Figura 19. Diagrama de árbol para la región aromática.....	132
Figura 20. Diagrama de calor para la matriz de datos completa para extractos de queso Crema de Chiapas durante tres tiempos de maduración (señalar tiempos y queserías, en general, las figuras deben sr autoexplicativas).....	134
Figura 21. Diagrama de calor para la región aromática de extractos de queso Crema de Chiapas.....	135
Figura 22. Gráfica OPLS-DA de la matriz donde se utilizó la región completa (A), gráfica OPLS-DA construida a partir de la matriz donde se seleccionó la región aromática (B). Para OPLS-DA, un análisis de permutación entre un componente predictivo (p_1) y cuatro componentes ortogonales (o_1 , o_2 , o_3 y o_4) produjo los coeficientes R^2X , R^2Y y Q^2 observados y con validación cruzada (C y D).....	136
Figura 23. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA generada de la matriz donde se seleccionaron todas las regiones. Los recuadros coloreados de la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito.....	137
Figura 24. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA originada a partir de la matriz con la región aromática. Los recuadros coloreados de la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito.....	138
Figura 25. A) Espectros de infrarrojo cercano de patrones de ácidos grasos S_1 a S_7 . B) Espectros infrarrojo cercano de los quesos Q_1 a Q_{12}	153
Figura 26. Espectros crudos de absorbancia NIR adquiridos por triplicado, del conjunto completo de quesos Q_1 a Q_{12} analizados, denominada "matriz de datos NIR A" (véanse los materiales y métodos).....	155
Figura 27. Espectros post-procesados de absorbancia NIR de primera derivada adquiridos por triplicado, del conjunto completo de quesos analizados, denominado "matriz de datos NIR B".....	158
Figura 28. Espectros de absorbancia de rangos NIR seleccionados por primera derivada, adquiridos por triplicado, del conjunto completo de quesos analizados, denominado "matriz de datos NIR C".....	159
Figura 29. NIR de los estándares de ácidos grasos S_1 a S_7 (A) datos de absorbancia brutos. (B) Espectros NIR de primera derivada post-procesados y (C) post-procesado primera derivada NIR con intervalos seleccionados.....	160
Figura 30. Flujo de trabajo para producir las matrices de datos NIR A (flechas amarillas), B (flechas rojas) y C (flechas verdes) como entradas para el análisis estadístico multivariante. (flechas rojas) y C (flechas verdes) como entradas para el análisis estadístico multivariante realizado con el software de análisis de datos	

metabolómicos racionalizado MetaboAnalyst 5.0.(<http://www.metaboanalyst.ca/>)
..... 161

Figura 31. Gráficos de puntuación del Análisis de Componentes Principales (ACP) no supervisado (arriba) y biplots entre los componentes principales 1 y 2 (abajo) de cada análisis estadístico multivariante realizado con la matriz de datos NIR A (izquierda), la matriz de datos B (centro) y la matriz de datos C (derecha). Los gráficos de puntuación Q_1 - Q_{12} de los quesos están resaltados en azul, mientras que los gráficos de puntuación S_1 - S_7 de los estándares están resaltados en rojo..... 165

Figura 32. Gráficos de puntuación del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) (arriba) y representación en histograma (abajo) de la bondad del ajuste del MSA (R^2) y la bondad de la predicción (Q^2) de cada análisis estadístico multivariante realizado con la matriz de datos NIR A (izquierda), la matriz de datos B (centro) y la matriz de datos C (derecha). Los gráficos de puntuación Q_1 - Q_{12} de quesos están resaltados en azul, mientras que los gráficos de puntuación S_1 - S_7 de los estándares están resaltados en rojo. La bondad de predicción (Q^2 , histogramas turquesa) y la bondad del ajuste matemático (R^2 , histogramas rosas) se obtuvieron con sólo tres componentes PLS-DA principales, mientras que la contribución de cada componente se resalta como 1, 2 y 3 conjuntos de histogramas.....168

Figura 33. Agrupación jerárquica de la matriz A de datos NIR brutos (extremo izquierdo), la matriz B de datos NIR de la primera derivada (centro) y la matriz C de datos C de los intervalos NIR seleccionados de la primera derivada (extremo derecho), mostradas como dendrogramas, utilizando distancias euclidianas y algoritmos de agrupación para las mediciones de distancia entre las muestras.....171

DEDICATORIAS

*A mi hija María del Carmen Díaz Ocampo
que con su amor me ha hecho mejor
persona.*

*A mis hermanos por llenar mi niñez de
aventuras.*

*A mis amigos (Lolita, Martín, Ricardo y
Osiris) por apoyarme
en todas mis locuras.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi Alma Mater, por darme la oportunidad de vencer mis propias barreras para lograr recibirme, pero por favor inviertan presupuesto en sus laboratorios. Al Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, específicamente al Doctorado en Ciencias Agroalimentarias.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca 2020-000013-01NACF-03858 que me brindo para continuar con mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A. C., Hermosillo, Sonora en especial al Dr. Aarón Fernando González Córdova por haberme apoyado con una beca para realizar mi tesis de licenciatura y posteriormente graduarme de la maestría poniendo a mi disposición materiales y equipos de primer nivel.

Al PhD. Arturo Hernández Montes por confiar en que llegaría a buen término con mi trabajo y proporcionarme los reactivos que necesité para mi tesis por compartir conmigo su experiencia en estadística y darme sus observaciones de manera oportuna.

Al PhD. José Enrique Herbert Pucheta profesor investigador del Instituto Politécnico Nacional por asesorarme sobre el manejo de datos metabolómicos y de resonancia. Por ayudarme a desarrollar habilidades y reconocer mis capacidades. Por brindarme su amistad y contagiarme su actitud tan positiva.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por confiar en que podía realizar metagenómica sin saber nada y asesorarme para poderlo lograr. Por permitirme

el acceso al laboratorio de biología molecular de Fitotecnia porque gracias a eso pude obtener los extractos para la actividad antiinflamatoria y antimicrobiana.

Al Dr. Karel Johan Estrada Guerra del instituto de biotecnología de la UNAM por compartir conmigo su amplia experiencia en análisis de datos metagenómicos y de metatranscriptómica.

Al Dr. Samir Samah por apoyarme en la extracción de ADN y ARN y capacitarme en la plataforma Galaxy.

Al Dr. José Isidro Méndez Romero por orientarme con algunas dudas que tenía sobre la colecta de muestras para metagenómica y por recomendarme algunos programas para análisis de datos en el sistema operativo Linux. Por su disposición para aclararme mis dudas.

Al Dr. José Eleazar Aguilar Toalá por darle un mejor enfoque a la actividad antimicrobiana en mi trabajo y ayudarme con la actividad antiinflamatoria.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por asesorarme para realizar la curva de Bradford para determinación de proteína. Por permitirme acceder al laboratorio de productos naturales para montar la actividad antiinflamatoria y antimicrobiana. Y por ser un gran ejemplo de persona y de investigadora.

A la Dra. Ofelia Sandoval Castilla por asesorarme con la resiembra de las cepas con las que trabaje.

Al M.C Armando Santos Moreno por permitirme trabajar en el laboratorio de lácteos de la Universidad Autónoma Chapingo.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Blanca Nayelli Ocampo Morales

Fecha de nacimiento: 2 de febrero de 1989

Lugar de nacimiento: Tlanepantla, Estado de México.

CURP: OAMB890202MMCCRL07

Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Desarrollo académico

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.

Maestría: Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A. C, Hermosillo, Sonora.

RESUMEN GENERAL

DINÁMICA MICROBIANA Y DE BIOACTIVIDADES DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS.

Se determinaron las diferentes modificaciones fisicoquímicas, microbiológicas y cambios en las actividades antimicrobiana y antiinflamatoria del queso Crema de Chiapas, en diferentes tiempos de maduración. Se analizó la dinámica bacteriana por metagenómica de amplicon mediante la secuenciación del gen ADNr 16S para bacterias y de espaciadores transcritos internos (ITS) para hongos y levaduras. Los géneros más abundantes de bacterias fueron *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, mientras que para hongos fueron *Candida versatilis*, *Candida etchellsii* y *Candida tropicalis*. Por otro lado, la mayor actividad antimicrobiana se observó en los extractos de 47 d. La mayor actividad antiinflamatoria se obtuvo a los 47 y 81 d de maduración. Utilizando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se lograron identificar desplazamientos químicos y se encontró que la región aromática produjo modelos altamente discriminantes con respecto a los factores quesería y tiempo de maduración. Por otro lado, se construyó un modelo multivariante supervisado altamente discriminante de quesos de acuerdo a su composición de ácidos grasos utilizando infrarrojo cercano (NIR). Por lo que, la maduración enriquece de microorganismos, compuestos aromáticos y bioactivos al queso, haciéndolo una matriz de interés funcional en la salud humana.

Palabras clave: queso Crema de Chiapas, metagenómica, actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, RMN, NIR.

GENERAL ABSTRACT

MICROBIAL DYNAMICS AND BIOACTIVITIES DURING RIPENING OF CHIAPAS CREAM CHEESE.

The different physicochemical and microbiological modifications and changes in antimicrobial and anti-inflammatory activities of Chiapas Cream Cheese were determined at different ripening times. Bacterial dynamics were analyzed using amplicon metagenomics, by sequencing the 16S rDNA gene for bacteria and internal transcribed spacers (ITS) for fungi and yeasts. The most abundant bacterial genera were *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*, while the most abundant fungal genera were *Candida versatilis*, *Candida etchellsii* and *Candida tropicalis*. On the other hand, the highest antimicrobial activity was observed in extracts of 47 d. The highest anti-inflammatory activity was obtained at 47 and 81 d of ripening. Using Nuclear Magnetic Resonance (NMR), chemical shifts were identified and it was found that the aromatic region produced highly discriminant models with respect to the cheesemaking and ripening time factors. On the other hand, a highly discriminant multivariate supervised model of cheeses according to their fatty acid composition was constructed using near infrared (NIR). Thus, ripening enriches the cheese with microorganisms and aromatic and bioactive compounds, making it a matrix of functional interest in human health.

Keywords: Crema de Chiapas cheese, metagenomics, antimicrobial and antiinflammatory activity, NMR, NIR.

1.INTRODUCCIÓN GENERAL

El queso Crema de Chiapas es elaborado en diferentes lugares del estado de Chiapas. El proceso de elaboración favorece la acidez y la textura del queso. Los microorganismos presentes en el queso pueden provenir de diferentes fuentes tales como: el ambiente, la alimentación del ganado, instrumentos de ordeña, procesamiento y manipulación por los operadores, entre otras (Possas et al., 2021). La presencia de microorganismos en queso favorece el desarrollo de sabores, los cuales se asocian a las rutas metabólicas como la glucólisis, proteólisis y lipólisis (McSweeney, 2004). Durante la glucólisis ocurre la producción principalmente de ácidos orgánicos que además de originar sabores, funcionan como antimicrobianos (Ahansaz et al., 2023). En la maduración del queso, las proteínas se hidrolizan por proteasas y peptidasas (Dugat-Bony et al., 2015); los péptidos generados a través de este proceso contribuyen a sabores dulces y amargos en el queso, se ha reportado que estos péptidos tienen actividades funcionales entre las que se encuentran la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Por otro lado, la metabolómica con Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ha permitido el estudio de mezclas complejas, mediante el uso de estadística multivariante, lo que ha generado modelos discriminantes por origen geográfico en queso Gravieria (Ralli & Spyros, 2023), autenticidad en queso Parmigiano Reggiano (Cavallini et al., 2023), tiempo de maduración en queso Camembert (Kharbanda et al., 2023), de acuerdo a su composición. También se pueden generar modelos discriminantes con espectroscopía de infrarojo cercano (NIR) para separar muestras por su composición de ácidos grasos en alimentos como grasa presente, en carne de cordero, ternera, pollo y cerdo (Dashti et al., 2022), en aceite de oliva extra virgen (Santos et al., 2020), en almendras (Vega-

Castellote et al., 2021) y en quesos (González-Martín et al., 2020), por mencionar algunos.

Para conocer los microorganismos presentes en los alimentos, se han utilizado diferentes técnicas dependientes de medios de cultivo, lo que limita el estudio de cepas no cultivables y necesitan complementarse con otros métodos, por ejemplo, métodos bioquímicos y serológicos para tener un resultado concluyente (Aladhadh, 2023). Las ciencias ómicas entre las que se halla la metagenómica de amplicones han contribuido a desentrañar las dinámicas bacterianas de diferentes tipos de productos fermentados, entre los que se encuentran el yogurt, el kéfir, vegetales fermentados (Palmnäs-Bédard et al., 2023), productos fermentados árabes lácteos, y no lácteos (Yasir et al., 2023).

La presencia de microorganismos durante la maduración del queso varía debido a sus características fisicoquímicas, planta de elaboración, proceso de elaboración, tiempo de maduración etc. Dentro de este contexto se realizó un estudio metagenómico de amplicón y metabólicomico para conocer la dinámica del queso Crema de Chiapas durante la maduración.

1.1. Objetivo general

- Determinar la dinámica microbiana y bioactividades, a lo largo de tres meses, en la maduración del queso Crema de Chiapas.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar bacterias mediante secuenciación de las regiones V3-V4 del gen ADN 16S, y hongos y levaduras mediante las regiones ITS1- ITS2.
- Determinar la actividad antiinflamatoria y antimicrobiana en extractos acuosos de Queso Crema de Chiapas por UV-VIS.
- Discriminar extractos de queso, por tiempos de maduración y quesería, de acuerdo a la composición mediante RMN en estado líquido.
- Discriminar muestras de queso por su composición de ácidos grasos por espectroscopía NIR.

1.3. Hipótesis

- Los microorganismos del queso cambiarán a lo largo del proceso de maduración.
- La actividad antimicrobiana y antiinflamatoria del queso Crema de Chiapas será diferente a lo largo del tiempo de maduración.
- La composición del extracto de queso obtenida por RMN permitirá discriminar extractos de queso por tiempos de maduración y quesería.
- La composición de quesos adquirida por NIR permitirá separar a los diferentes tipos de quesos y los métodos supervisados tendrán una mejor discriminación.

1.4. Organización de la tesis

La tesis está compuesta por seis capítulos. El Capítulo uno corresponde a la introducción general. El Capítulo dos incluye la revisión de literatura y está integrada por cuatro ejes temáticos que son: técnicas de metagenómica para identificación de microorganismos, en la cual se describen a los péptidos antimicrobianos y antiinflamatorios y sus principales mecanismos de acción, posteriormente se discutieron estudios donde se ha utilizado la técnica de NIR para realizar modelos discriminantes de alimentos basados en su composición. Finalmente, se realizó un resumen de estudios donde utilizaron RMN para la identificación de compuestos en matrices alimentarias.

El Capítulo tres presenta los resultados obtenidos de la secuenciación de bacterias con el gen 16S, y la región ITS para hongos y levaduras, para tres tiempos diferentes de maduración del queso Crema de Chiapas. El Capítulo cuatro muestra la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria del queso Crema de Chiapas durante tres tiempos de maduración. En el Capítulo cinco se identificaron desplazamientos químicos con RMN y se obtuvieron modelos discriminantes por tiempos de maduración y quesería. Por último, en el Capítulo seis se muestra un modelo discriminante para separar a diferentes tipos de queso por su composición de ácidos grasos.

1.5. Literatura citada

- Ahansaz, N., Tarrah, A., Pakroo, S., Corich, V., & Giacomini, A. (2023). Lactic Acid Bacteria in Dairy Foods: Prime Sources of Antimicrobial Compounds. *Fermentation*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110964>
- Aladhadh, M. (2023). A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Microorganisms*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051111>
- Cavallini, N., Strani, L., Becchi, P. P., Pizzamiglio, V., Michelini, S., Savorani, F., Cocchi, M., & Durante, C. (2023). Tracing the identity of Parmigiano Reggiano “Prodotto di Montagna—Progetto Territorio” cheese using NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1278, 341761. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341761>
- Dashti, A., Müller-Maatsch, J., Weesepoel, Y., Parastar, H., Kobarfard, F., Daraei, B., AliAbadi, M. H. S., & Yazdanpanah, H. (2022). The Feasibility of Two Handheld Spectrometers for Meat Speciation Combined with Chemometric Methods and Its Application for Halal Certification. *Foods*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods11010071>
- Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., & Bonnarme, P. (2015). Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses. *PLOS ONE*, 10(4), e0124360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>
- González-Martín, M. I., Vivar-Quintana, A. M., Revilla, I., & Salvador-Esteban, J. (2020). The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*, 156, 104854. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104854>
- Kharbanda, Y., Mailhiot, S., Mankinen, O., Urbańczyk, M., & Telkki, V.-V. (2023). Monitoring cheese ripening by single-sided nuclear magnetic resonance. *Journal of Dairy Science*, 106(3), 1586-1595. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22458>
- McSweeney, P. L. (2004). 27 Symposium contribution Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2), 127-144.
- Palmnäs-Bédard, M., de Santa Izabel, A., Dicksved, J., & Landberg, R. (2023). Characterization of the Bacterial Composition of 47 Fermented Foods in Sweden. *Foods*, 12(20), 3827. <https://doi.org/10.3390/foods12203827>
- Possas, A., Bonilla-Luque, O. M., & Valero, A. (2021). From Cheese-Making to Consumption: Exploring the Microbial Safety of Cheeses through Predictive Microbiology Models. *Foods*, 10(2), 355. <https://doi.org/10.3390/foods10020355>
- Ralli, E., & Spyros, A. (2023). A Study of Greek Graviera Cheese by NMR-Based Metabolomics. *Molecules*, 28(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules28145488>

- Santos, P., Tosato, F., Cesconetto, M., Corrêa, T., Santos, F., Lacerda, V., Pires, A., Ribeiro, A., Filgueiras, P., & Romão, W. (2020). Determinação da autenticidade de amostras de azeite comerciais apreendidas no estado do Espírito Santo usando um espectrofotômetro portátil na região do NIR. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170550>
- Vega-Castellote, M., Pérez-Marín, D., Torres, I., & Sánchez, M.-T. (2021). Non-destructive determination of fatty acid composition of in-shell and shelled almonds using handheld NIRS sensors. *Postharvest Biology and Technology*, 174, 111459. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111459>
- Yasir, M., Alkhalidy, A. A., Soliman, S. A., Turkistani, S. A., & Azhar, E. I. (2023). Metagenomic Insights into the Microbiome and Resistance Genes of Traditional Fermented Foods in Arabia. *Foods*, 12(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/foods12183342>

2.REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Queso Crema de Chiapas

El Queso Crema de Chiapas se produce artesanalmente en tres regiones del estado de Chiapas: Norte, Frailesca y Costa, lo cual influye en las características físicas, químicas y microbiológicas del queso (González-Córdova et al., 2016). El queso se elabora con leche cruda de vaca. Su proceso de elaboración consiste en recepción de la leche, adición de cuajo, corte de la cuajada y reposo, escurrido en bolsas, amasado, salado, moldeado, prensado en moldes rectangulares y finalmente se envuelve en plástico, papel aluminio y celofán (González-Córdova et al., 2016). Es un queso que se consume desde una semana de elaboración y hasta con más de tres meses de maduración (SAGARPA, 2013). El queso Crema de Chiapas, al ser elaborado con leche cruda, genera desconfianza a las instituciones de salud pública. En el codex alimentarius CAC/RCP 57-2004 presenta una serie de medidas adicionales para asegurar la inocuidad y la FDA establece que la leche con la que se elabora el queso debe ser pasteurizada (CFR, 2023). En el estudio realizado por Romero-Castillo et al., (2009), durante los meses de enero a abril de 2007, se tomaron muestras de queso Crema de Chiapas fresco de cinco queserías localizadas en Tonalá, Chiapas y reportaron bacterias patógenas de *E. coli* y *Salmonella* spp.

El crecimiento de patógenos va a depender del tipo de queso y composición fisicoquímica. Quesos blandos y semiblandos tienen mayor riesgo de contaminación por *Listeria monocytogenes* con respecto a quesos duros y semiduros (Gérard et al., 2018). En quesos duros como: queso Cheddar (Chon et al., 2020), quesos italianos (McSweeney, 2007), queso Pecorino Romano (Lai et al., 2020) y queso Lighvan se encontró la disminución de bacterias patógenas a lo largo del tiempo de maduración, debido a la disminución de la humedad, pH, cantidad de sal, actividad de agua, condiciones de elaboración y la interacción con las bacterias ácido lácticas (McSweeney, 2007; Campagnollo et al., 2018).

Los ácidos orgánicos generados por las bacterias ácido lácticas (BAL) inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. El ácido láctico es el más producido por las BAL (Punia Bangar et al., 2022). *Listeria monocytogenes* es susceptible al ácido láctico y ácido acético en dosis altas, los cuales reducen el pH intracelular de bacterias patógenas mediante disociación en el interior de la célula y generan una fuga intracelular por porinas o permeasas (Webb et al., 2022). En el estudio realizado por Oh et al., (2014) analizaron el efecto que tuvieron diferentes extractos de queso Cheddar sobre la supervivencia de *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, encontrando que a lo largo del tiempo de maduración disminuyó la supervivencia. Por otro lado, los ácidos orgánicos son efectivos contra bacterias gram negativas y gram positivas, así como levaduras y mohos (Ibrahim et al., 2021).

2.2. Panorama general de la metagenómica

2.2.1. Metagenómica en alimentos

Chaudhari et al. (2023) definen a la metagenómica como un genoma colectivo compuesto por virus, bacterias y eucariontes asociados con un nicho específico. La metagenómica tiene múltiples aplicaciones en el campo de los alimentos y se ha utilizado para la identificación de virus causantes de enfermedades en humanos (Billington et al., 2022), agrupar muestras de queso por regiones (Kamimura et al., 2019), detección de fraude alimentario (Cardin et al., 2022), el estudio de la dinámica e interacciones microbianas durante el proceso de fermentación (Srinivas et al., 2022) y desarrollo de cultivos iniciadores (Sabater et al., 2021).

2.2.2. Metagenómica dirigida y no dirigida

La secuenciación metagenómica se puede realizar de manera dirigida o secuenciación por amplicón también denominada metabarcoding o metataxonómica, donde una región específica de ADN se amplifica por PCR y se realiza una secuenciación (Billington et al., 2022). Por otro lado, en la metagenómica no dirigida o de escopeta se secuencia todo el material genético (Srinivas et al.,

2022). La elección del tipo de secuenciación va a depender de los objetivos del estudio y la información que se desea conocer.

La secuenciación por amplicones o dirigida, es el método de secuenciación de alto rendimiento (por sus siglas en inglés High-Throughput Sequencing HTS) más frecuentemente utilizado para la identificación de microorganismos (Liu et al., 2021). El ADNr o ARNr 16S se encuentra en el ribosoma de las procariotas y se localiza en la subunidad pequeña 30S (Rodicio & Mendoza, 2004), como se observa en la Figura 1. El ARNr 16S tiene nueve regiones hipervariables V1-V9, las cuales tienen diferentes longitudes y conservación (más de una especie tiene secuencias iguales o muy similares), estos se relacionan con una capacidad diferente para distinguir bacterias (Clarridge, 2004); (Watts et al., 2017). La región V3-V4 tiene una longitud de aproximadamente 460 pb y es la más utilizada para la investigación de la diversidad bacteriana en múltiples entornos (Fadeev et al., 2021); proporcionan una taxonomía más exacta, debido a que regiones más largas pueden ofrecer más información filogenética y son más confiables que las regiones más cortas como V6 (Onywera & Meiring, 2020). Las secuencias de la región 16S se comparan con bases de datos como SILVA, RDP, GreenGenes o NCBI (Boers et al., 2019), para la identificación taxonómica.

Por otro lado, para la identificación de eucariontes se utiliza el ADNr18S y los espaciadores internos transcritos (ITS), principalmente ITS1 e ITS2 (Yang et al., 2018) y RdRP para virus de ARN (Billington et al., 2022). La región ITS tiene una mayor sensibilidad debido a la existencia de aproximadamente 100 copias por genoma (Raja et al., 2017), tiene una longitud de 600 pb (Porrás-Alfaro et al., 2014). La región ITS1 varía en tamaño entre 192 y 282 bases (Edwards et al., 2019). Para la identificación de hongos y levaduras se ha utilizado la región ITS1 e ITS2 por separado (Yang et al., 2018) y combinadas.

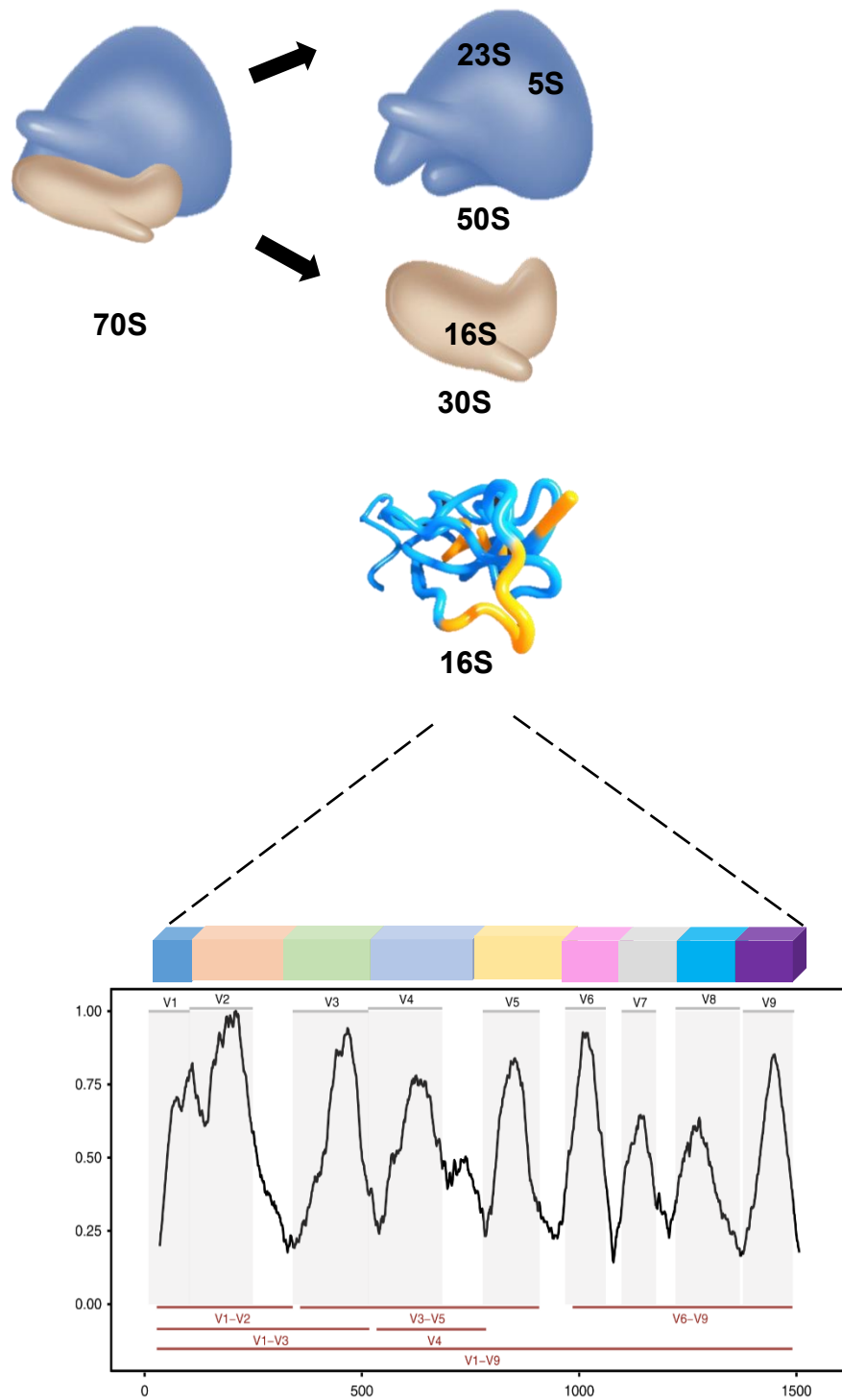


Figura 1. Localización del gen 16S en el ribosoma procarionte (Rodicio & Mendoza, 2004; Johnson et al., 2019).

Los ribosomas 80S eucarióticos constan de las subunidades 40S y 60S. Para hongos y levaduras, el transcrito de ARNr 18S se encuentra en la *subunidad ribosomal pequeña 40S* (Embong et al., 2008), mientras que los ARNr 5.8S y 28S forman parte de la subunidad 60S (Pfister & Kühl, 2018). En la Figura 2 se muestra que el ITS1 se encuentra entre los ARNr 18S y 5.8S y el ITS2 se localiza entre los ARNr 5.8S y 28S (Franco-Duarte et al., 2019). Los genes de ARNr nuclear 18S, 5.8S y 28S son regiones codificantes de evolución lenta y están relativamente conservados entre los hongos (Franco-Duarte et al., 2019). Sin embargo, el tamaño de una región, por sí solo, no tiene el suficiente poder discriminatorio para diferenciar todas las especies, por lo tanto, algunas especies siguen sin ser identificadas (Franco-Duarte et al., 2019). Para el análisis de las secuencias, primeramente se agrupan las lecturas de extremos emparejados de amplicones sin procesar; las lecturas emparejadas se unen y se eliminan los adaptadores, se eligen secuencias representativas con agrupación de unidades taxonómicas operacionales (OTU) y eliminación de ruido en variantes de secuencia de amplicones (ASV), donde se obtiene una tabla de frecuencias de las secuencias y se asigna la taxonomía (Liu et al., 2021).



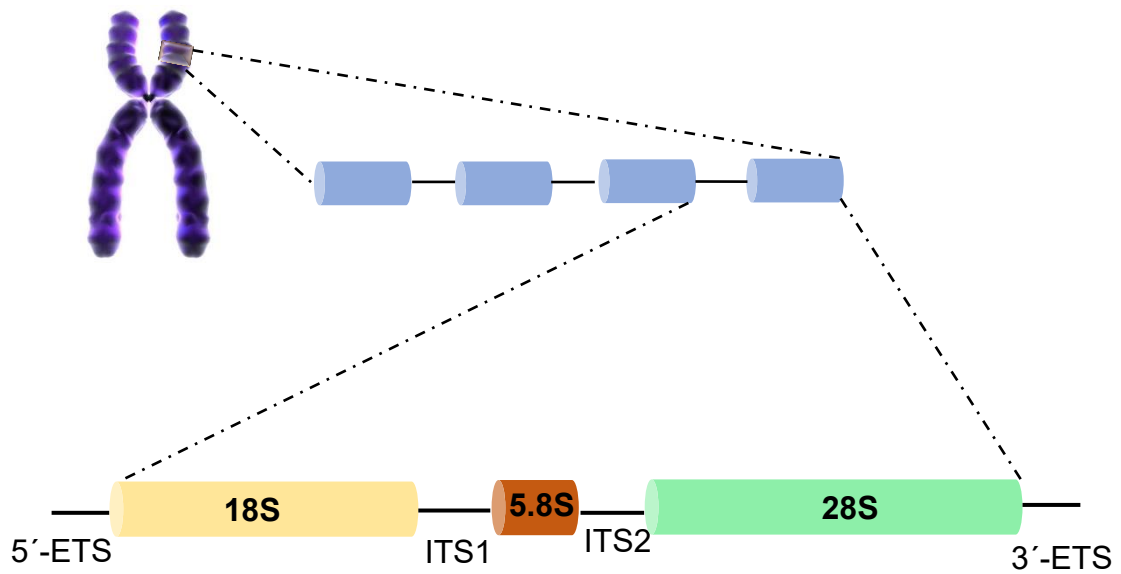


Figura 2. Localización de los ITSs en hongos y levaduras (Pfister & Kühn, 2018; Fathy et al., 2023).

La metagenómica no dirigida se usa cuando se requieren conocer los genes de bacteriocinas, genes de resistencia a los antimicrobianos y caracterización funcional de comunidades microbianas (Srinivas et al., 2022). En la metagenómica de escopeta el genoma se fragmenta en pedazos cortos de 1 a 2 kpb de largo, luego todos los pequeños fragmentos se clonan y secuencian, mediante el análisis bioinformático se buscan regiones superpuestas y se ensamblan las secuencias en varios contigs grandes (Clark & Pazdernik, 2013) como se observa en la Figura 3. La metagenómica proporciona perfiles genéticos funcionales directamente y alcanza una mejor resolución de anotación taxonómica; el fundamento principal del análisis metagenómico es convertir datos limpios en tablas taxonómicas y funcionales, utilizando métodos basados en lecturas y/o ensambles (Liu et al., 2021).

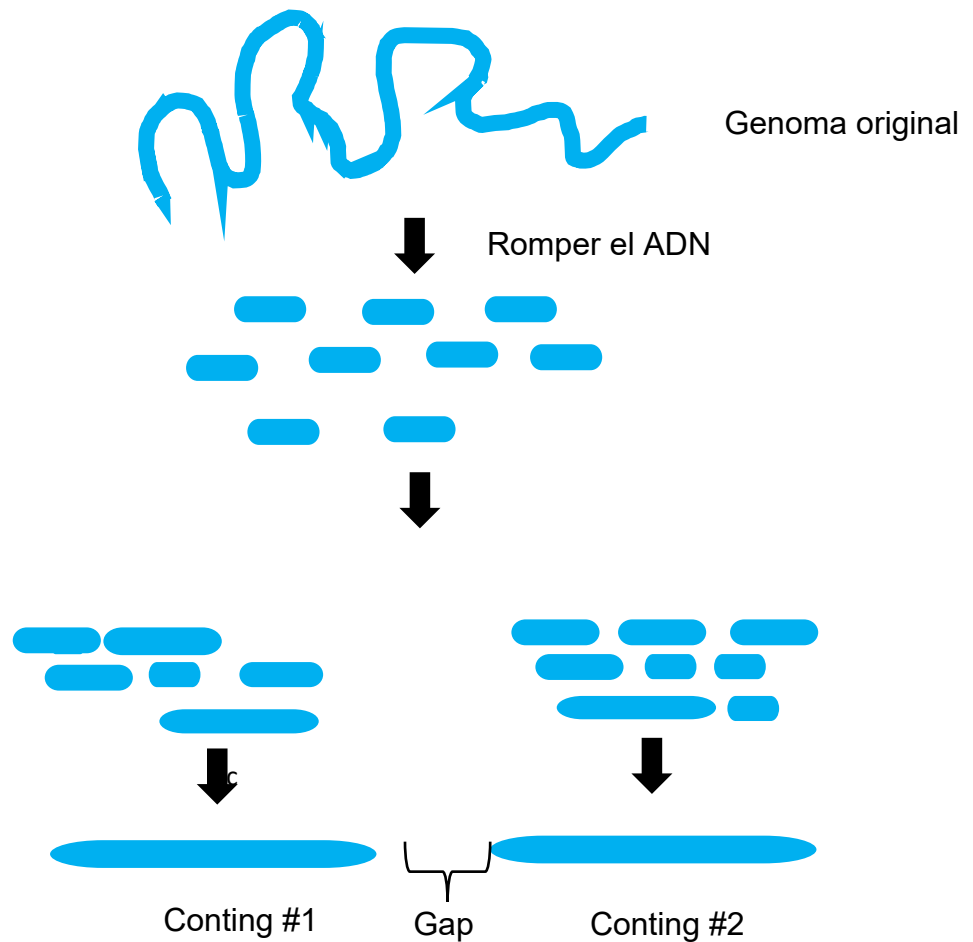


Figura 3. Metagenómica de escopeta (Clark & Pazdernik, 2013)

Los datos de la metagenómica no dirigida se obtienen a partir de la secuenciación de todo el ADN. El flujo de trabajo para la metagenómica de escopeta consiste en la recolección de la muestra, extracción de ADN, preparación y secuenciación de la biblioteca y análisis bioinformático (Navgire et al., 2022). El análisis de todo el ADN favorece la identificación de virus y fagos. La metagenómica no dirigida se ha utilizado para la identificación de microorganismos en quesos árabes, queso Feta y queso Flandes de Bélgica (Cuadro 1). Por otro lado, en leche cruda, leche en polvo, queso Cotija y queso Cheddar se han encontrado genes relacionados con diferentes rutas metabólicas (Cuadro 1)

Cuadro 1. Metagenómica de escopeta en productos lácteos.

Matriz alimentaria	Técnica utilizada	Factor o factores de variación	Microorganismos identificados en queso por metagenómica de escopeta	Rutas metabólicas relacionadas	Autores
Mish, jibneh, zabadi y pepinillos	Secuenciación de escopeta,	Matriz alimentaria	Identificaron 367 especies bacterianas en alimentos fermentados.	Se identificaron 33 genes que causan resistencia a los antimicrobianos; se detectaron genes relacionados con 32 rutas metabólicas.	Yasir et al., (2023)
Leche cruda	ADN total, cgMLST, Escopeta	Leche de vacas, búfalas, cabras y ovejas; Extracción de ADN (Convencional y con agotamiento de células eucariotas)	<i>Bradyrhizobiaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Rhodobacteraceae</i> y <i>Micrococcaceae</i> .	Genes de resistencia antimicrobiana.	Grützke et al., (2021)
Leche desnatada en polvo	Escopeta	Proceso de producción de leche en polvo. Etapa de lactancia.	En leche entera se encontraron <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Lactococcus lactis</i> . En leche en polvo a mitad de la lactancia <i>Thermus</i> , <i>Geobacillus</i> y <i>Streptococcus</i> son los géneros más dominantes.	Genes asociados a la esporulación y latencia.	McHugh et al., (2020)

Matriz alimentaria	Técnica utilizada	Factor o factores de variación	Microorganismos identificados en queso por Shotgun	Rutas metabólicas relacionadas.	Autores
Queso Feta	Escopeta	Elaboración industrial o casera.	<i>Debaryomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Cutaneotrichosporon</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> y <i>Rhodotorula</i>	Veintiséis rutas	Papadimitriou et al., (2022)
Queso Flandes de Bélgica	Escopeta	Salmueras A y C, Programas de alineación, Programas de identificación taxonómica	La salmuera C mostró una mayor diversidad a nivel de género en comparación con la salmuera A. <i>Lactobacillus</i> y <i>Tetragenococcus</i> fueron los géneros más abundantes.	N.R	Vermote et al., (2018)
Queso Cotija	ADN total	Queso de recién elaborado.	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Weissella</i> .	Diez enzimas relacionadas con vías metabólicas como la producción de aminoácidos de cadena ramificada y ácidos grasos libres.	Escobar-Zepeda et al., (2016)
Queso Cheddar	Metagenómica de escopeta.	Grupos de muestras PMA y no PMA. Tiempo de maduración (1 a 7 años)	PMA: <i>Lactococcus</i> , <i>Lactocaseibacillus</i> , <i>Secundilactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Pediococcus</i> y <i>Enterobacter</i> .	Cincuenta genes relacionados con rutas metabólicas, por ejemplo: resistencia a los ácidos, osmoprotección, metabolismo de péptidos entre otras.	Mohamed et al., (2023)

N.R: No reportado, **PMA:** La monoazida de propidio, **cgMLST:** Análisis de tipificación de secuencia multilocus del genoma central

2.2.3. Metagenómica en queso

La leche obtenida de una ubre sana es estéril, sin embargo, las contaminaciones cruzadas desde la ordeña hasta el proceso de producción demeritan su calidad. En leche de Egipto se han identificado bacterias patógenas como, *Brucella* spp, *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* (Grützke et al., 2021). En leche de Irlanda se analizaron diferentes orígenes de contaminación (suelo, pasto, heces, pezones, camas y ensilaje) y se encontró que la superficie del pezón era la principal fuente de contaminación (Doyle et al. 2016). En leche y en queso mexicano se han reportado los géneros *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., y *Lactobacillus* spp (Ruvalcaba-Gómez et al., 2020).

En el Cuadro 2 se observan diferentes estudios en los que se obtuvieron los perfiles metagenómicos de distintos quesos, en uno o diferentes momentos de maduración. El estudio de las regiones hipervariables del gen 16S permitió la identificación de bacterias en queso. Las regiones analizadas en los diferentes estudios presentados en el Cuadro 2 pertenecen a las regiones V2-3-4-8-7 y 9, sin embargo, la región V3-V4 ha sido la más utilizada. Por otro lado, principalmente para identificar hongos y levaduras se utilizaron ITS1 e ITS2. En los estudios se distinguieron pasos comunes en el flujo de trabajo de análisis de datos bioinformáticos, tales como análisis de la calidad de datos, eliminación de adaptadores, unión de secuencias, eliminación de secuencias quiméricas, comparación contra bases de datos para bacterias (SILVA, Greengenes, mothur, NCBI, por mencionar algunas) y para hongos y levaduras (mothur, UNITE ITS1, NCBI entre otras). Algunos parámetros que pueden dar información sobre la diversidad de microorganismos son: diversidad alfa, análisis de diversidad beta, índices Chao1, índice de diversidad de Shannon, índice de Simpson y cobertura de Good (Marino et al., 2019; Papademas et al., 2019; Quijada et al., 2020; Dimov et al., 2021). Los programas utilizados para el análisis de datos son diversos, tales como los programas R, QIIME y QIIME 2 (Marino et al., 2019; Papademas et al., 2019; Quijada et al., 2020). En los diversos quesos mostrados se

identificaron en mayor abundancia BAL, entre las que se encuentran los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, entre otros.

Sin embargo, la identificación de microorganismos, en los 50 quesos mexicanos publicados es escasa (Villegas et al., 2016). Se han reportado las comunidades bacterianas para el queso Cotija (*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella paramesenteroides*) (Escobar-Zepeda et al., 2016), el queso fresco de Sonora (Méndez-Romero et al., 2021), Queso Bola de Ocosingo (Aldrete-Tapia et al., 2018), el Queso de Poro (*Lactobacillus* y *Enterococcus*) (González Ariceaga et al., 2019) y para el Queso Adobera se identificaron especies dominantes de *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Además, extrayendo ADN y ARN se relacionaron los microorganismos con las rutas metabólicas de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y transportadores de membrana (Ruvalcaba-Gómez et al., 2020). En un estudio realizado por Murugesan et al., (2018) se identificaron bacterias y hongos por secuenciación del gen 16S y 18S, se analizaron trece quesos mexicanos y se encontró que los géneros más abundantes fueron *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. En queso bola de Ocosingo se encontraron los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* a lo largo del tiempo de maduración (Aldrete-Tapia et al., 2018).

2.2.4. Flujo de trabajo metagenómico para queso

2.2.4.1. Extracción de ADN

El flujo de trabajo consiste en la extracción del ADN, cuantificación de ADN, preparación de librerías, secuenciación y finalmente el análisis de datos bioinformáticos (Billington et al., 2022; Chaudhari et al., 2023). El ADN puede extraerse mediante lisis química, térmica, enzimática o mecánica o una combinación, que consta de tres pasos: lisis, purificación y recuperación de ADN (Gupta, 2019; Sajali et al., 2018); generalmente, todos los métodos utilizan proteinasa K en el paso de lisis (Sajali et al., 2018). En el caso de los pasos de precipitación de proteínas, se emplean NaCl y disolventes orgánicos (fenol/cloroformo), purificación de ADN (fenol, cloroformo e isopropanol), unión

Cuadro 2. Quesos de diferentes países donde se realizó el análisis metagenómico.

Nombre del queso	Factores de variación	Tipo de leche	Método secuenciación y región utilizada	Programas y bases de datos para los análisis datos utilizados.	Phylum, familia o género identificado	Autores
Queso Feta	Recipientes de plástico y acero inoxidable. Tiempo de maduración 0, 54, 120 días.	N.R	Amplicones empleando las regiones hipervariables V2-4-8 y V3-7-9 del gen 16S rARN	Eliminación de quimeras, Clasificación de OTUs con BLASTn en la base de datos NCBI.	En queso freso y maduro <i>Lactococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> y <i>Carnobacterium</i> , <i>Lactococcus</i> .	Spyrelli et al., (2020)
Queso Belga	Dos queserías. -Salmuera	Leche de vaca pasteurizada	Amplicón utilizando la región V4 del gen 16S rARN del ADN e ITS1 y shotgun	Trimmomatic; clasificación con mothur y SILVA. Amplicones fúngicos Cutadapt, Clasificación con mothur y UNITE ITS1	<i>Tetragenococcus</i> , <i>Chromohalobacter</i> y <i>Halanaerobium</i> como las más abundantes.	Vermote et al., (2018)
Queso Mozzarella	5 grupos de muestras (leche de vaca o de búfala, acidificada con cultivos naturales o seleccionados y obtenida en lechería o en el mercado de masas).	Leche búfala. Leche de vaca.	Gen 16S rARN	Uclust, RDP, Greengenes 16S Rna, QIIME y R, R heatmap.2 y PLS-DA con Unscramble.	Los quesos elaborados con leche búfala <i>Lactobacillus</i> . Queso elaborado con leche de vaca <i>Brochothrix</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Shewanella</i> , <i>Anoxybacillus flavithermus</i> y <i>Thermus thermophilus</i> .	Marino et al., (2019)

Nombre del queso	Factores de variación	Tipo de leche	Método secuenciación y región utilizada	Programas y bases de datos para los análisis datos utilizados.	Resultado, Phylum, familia o género identificado	Autores
Queso Halitzia.	Maduración de 40 y 60 d	Leche cruda de cabra	Amplicones Cebadores 27F y 519R e ITS1F e ITS2R.	BLASTn, NCBI*, QIIME 2	La leche cruda, queso de 40 d y queso de 60 d compartieron 26 géneros de bacterias y 30 géneros de hongos.	Papademas et al., (2019)
Vorarlb erger Bergkäse	Dos queserías diferentes durante la maduración de 0, 14, 30, 90 y 160 d	Leche cruda de vaca	ITS2; 16S rRNA con los cebadores 27F y 1492R.	dada2 en R, BIOM, QIIME2, q2, Naïve Bayes q2-taxa, JColorGrid.	En queso frescos <i>Staphylococcus equorum</i> y <i>Candida</i> . En maduración de 14 a 30 d <i>Psychrobacter</i> y <i>Debaryomyces</i> . En quesos madurados de 90 a 160 d, <i>S. equorum</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> y <i>Scofulariopsis</i>	Quijada et al., (2020)
Queso verde búlgaro	Tipo de leche y maduración 5, 7 y 8 meses	Leche de cabra y oveja	Región V3-V4	FLASH, UCHIME, Mothur Los hongos se analizaron mediante BLAST con Qiime, Unite. Se utilizó MUSCLE, LEfSe, R, Mothur.	120 bacterias (<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Staphylococcus</i>) y 16 especies fúngicas.	Dimov et al., (2021)

Nombre del queso	Factores de variación	Tipo de leche	Método secuenciación y región utilizada	Programas y bases de datos para los análisis de datos utilizados.	Resultado, Phylum, familia o género identificado	Autores
Queso São Jorge	Leche, suero, cuajada y queso con y sin denominación de origen protegida.	Leche cruda de vaca.	Región hipervariable V3-V4	Genoinseq, Calidad se secuencias con PRINSEQ, AdapterRemoval, generación de OTUs con QIIME, fusionaron, detectaron y eliminaron lecturas quiméricas con UCHIME contra la base de datos Greengenes	En queso sin denominación de origen <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i> . En queso con denominación <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Enterococcus</i> .	Coelho et al., (2023)
Queso griego Kopanisti	Cuatro diferentes mezclas de iniciadores, tiempos de maduración (1, 7, 21 y 35 d).	Leche de vaca pasteurizada.	Región hipervariable V1-V3 del gen 16S, ITS1-ITS2 para levaduras/hongos	Diversidad de bacterias y levaduras/hongos se evaluó en R, junto con phyloseq y ggplot2; PLS-DA y mapas de calor con Metaboanalyst.	<i>Lactococcus</i> y <i>Lactocaseibacillus</i>	Kazou et al., (2023)
Queso Parmigiano Reggiano	Seis lecherías, tiempos de maduración 2 días ,1, 2, 6, 7, 9, 12 y 24 meses	N.R	Región V3-V4 amplificada del gen 16S rARN.	FLASH, PRINSEQ, QIIME, RDP y Greengenes, R.	Las especies más abundantes fueron <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> y disminuyeron con la maduración.	Bottari et al., (2020)

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica, **OTU:** Unidades Taxonómicas Operativas y **N.R:** No reportado.

en los kits (ocurre en membranas de sílice o resina) y precipitación (isopropanol, etanol), varían entre los métodos (Sajali et al., 2018). Los kits PowerFood y Nucleospin son los más efectivos para la extracción de ADN de queso Mozzarella, debido a que el uso de microesferas y enzimas aumentó la eficacia de la extracción (Markusková et al., 2021). En la extracción de ADN en queso y leche, usando siete métodos, se reportó que el kit PowerFood™ fue superior a los demás, ya que se obtuvo un ADN puro y altamente concentrado para su posterior amplificación en PCR (Quigley et al., 2012). El kit de purificación de ADN genómico Wizard® se utilizó en queso Maasdam holandés (Duru et al., 2018). La extracción de ADN de queso también se realizó sin kit de extracción, como en queso Cotija (Escobar-Zepeda et al., 2016) y en queso bola de Ocosingo (Aldrete-Tapia et al., 2018).

2.2.4.2. Amplificación por PCR y preparación de librerías

La preparación de librerías de ADN varía de acuerdo a las empresas que las construyen; sin embargo, los pasos generales consisten en la fragmentación de ADN, fijación de adaptadores de oligonucleótidos a los extremos de los fragmentos diana y cuantificación del producto final de la biblioteca para la secuenciación (Kappelman-Fenzl, 2021). Los métodos de fragmentación más comunes son: fragmentación física (cizallamiento acústico, sonicación y cizallamiento hidrodinámico), fragmentación enzimática (ADNasa I u otra endonucleasa de restricción, nucleasa no específica, transposasa) y fragmentación química (calor y catión metálico divalente). La preparación de bibliotecas puede llevarse a cabo por dos diferentes tecnologías de secuenciación (Kappelman-Fenzl, 2021), tales como la unicelular (Illumina, 10xGenomics, Qiagen etc.) y la de lectura larga (Illumina, PacificBioscience, Oxford Nanopore etc.). A continuación se describirá a mayor detalle la tecnología Illumina de secuenciación por síntesis (por sus siglas en inglés sequencing by synthesis SBS) la ADN polimerasa incorpora desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) marcados con fluorescencia durante la síntesis de ADN y la identificación de los nucleótidos se logra mediante la excitación del fluoróforo (Akaçin et al., 2022). Grande-Cano, (2018) menciona que la SBS consiste en

fragmentar el ADN. Posteriormente, al ADN fragmentado se le adiciona un coctel de enzimas y se unen los adaptadores a los fragmentos de ADN permitiendo que se anclen a la celda de flujo para secuenciarse. A continuación, la ADN-polimerasa en presencia de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP's) hace una copia de cada hebra de ADN. Finalmente, se forman clusters (grupos) que al estar marcados con un fluoróforo específico y al ser detectados por el secuenciador registra un nucleótido (Figura 4) (Hassan et al., 2023).

2.3. Péptidos bioactivos en queso

Los quesos contienen una gran cantidad de proteínas, entre las que se encuentran, α_1 , α_2 y β , las cuales son hidrolizadas por enzimas presentes en la plasmina de la leche, κ -caseínas por la quimosina del cuajo y finalmente por las proteasas contenidas en los microorganismos (Ivens et al., 2017). Produciendo péptidos grandes y medianos que posteriormente son hidrolizados, por proteasas y peptidasas a péptidos de menor tamaño (Farkye, 2014). Los productos generados durante la proteólisis son compuestos aromáticos que contribuyen a las características sensoriales del queso (Marilley, 2004). Por otro lado, se ha comprobado que los péptidos liberados durante la maduración del queso tienen efectos benéficos a la salud, tales como: antihipertensivo, antioxidante, antimicrobiano, hipocolesterolémico, opioide (Tagliazucchi et al., 2019), antiinflamatorio, antidiabético, antiobesogénico y anticancerígeno, por mencionar algunos (Ağagündüz et al., 2021).

Los péptidos más reportados en la literatura son los antihipertensivos, entre los que se encuentran la VPP y la IPP identificados en β y κ -caseína, respectivamente (Iwaniak & Mogut, 2020). Yamaguchi et al. (2009) demostraron en modelos animales y en humanos que los péptidos VPP e IPP inhiben a la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). En el estudio realizado por Chamata et al., (2020) encontraron interacciones entre los péptidos derivados del suero y los aminoácidos de la ECA a través de enlaces de hidrógeno y puentes salinos de los aminoácidos Pro, Leu e Ile.

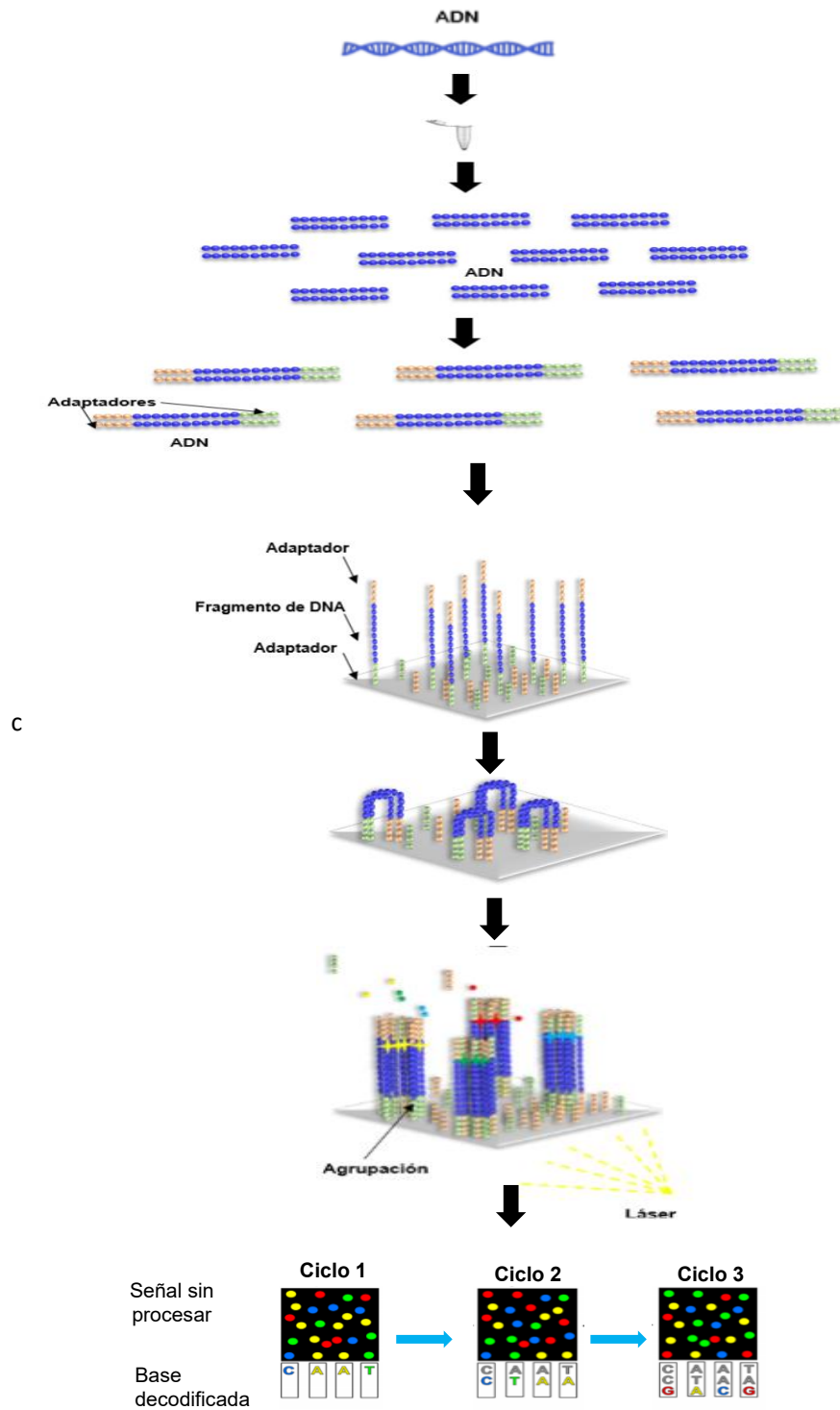


Figura 4. Diagrama de flujo de la secuenciación por síntesis (Illumina, 2010).

Los péptidos antioxidantes están compuestos de 2 a 20 aminoácidos, con un peso molecular inferior a 3 kDa y presentan aminoácidos hidrofóbicos como la prolina, la valina, el triptófano y la fenilalanina (Tadesse & Emire, 2020). En queso

Gouda se han reportado cuatro péptidos antioxidantes (Álvarez-Ramos et al., 2022). En queso duro español fue encontrada la secuencia de un péptido quelante de metales VAPFPQ (Timón et al., 2019). Se ha encontrado actividad antioxidante en quesos mexicanos, tal como el queso Crema de Chiapas, quesos Fresco y Cocido de Sonora (Aguilar-Toalá et al., 2022).

Otras bioactividades como la antitrombótica e hipocolesterolémica han sido reportadas en leches fermentadas por cepas específicas de *Lactococcus lactis* y sometidas a digestión simulada (Rendon-Rosales et al., 2019). En el estudio reportado por Zambrano-Cervantes et al., (2023) en leches fermentadas por cepas de *Lactobacillus* spp también se encontró el efecto hipocolesterolémico. El colesterol que se genera durante la ingesta de alimentos se combina con los ácidos biliares para formar micelas para ser solubilizadas y absorbidas en los intestinos (Chen et al., 2021). Los péptidos hipocolesterolémicos tienen una naturaleza hidrofóbica y al unirse con los ácidos biliares impiden la formación de micelas de colesterol (Chen et al., 2021; Qian et al., 2018). En el estudio realizado por Imai et al., (2021) mencionan que la hidrofobicidad es mayor en el extremo N-terminal, lo que hace suponer que los péptidos conformados por cuatro aminoácidos son más hidrófilos que los péptidos más largos, sin embargo, los péptidos con puntos isoeléctricos y pesos moleculares altos se unirán fuertemente a los ácidos biliares.

En cinco quesos (Edamski, Gouda, Kasztelan, Brie y Rokpol) se reportaron cinco péptidos opioides (casomorfina, casoxina y lactoferroxina) (Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009). En queso Ras encontraron que la actividad opioide incrementó a lo largo de la maduración en un modelo de digestión *in vitro* (Helal et al., 2023). En queso Tulum secuenciaron (Öztürk & Akin, 2021) péptidos opioides provenientes de β -caseína (YPFPGPIHN y YPFPGPIHNSLPQ).

La inhibición de α -glucosidasa y la α -amilasa es efectiva para reducir los niveles de azúcar en sangre, α -glucosidasa es inhibida por los aminoácidos hidrofóbicos Met, Pro, Phe y Leu; la α -amilasa interactúa competitivamente con secuencias peptídicas que tienen los aminoácidos hidrofóbicos Leu, Met y Pro, mientras que

la inhibición de la DPP-IV ocurre tanto con los aminoácidos hidrofóbicos Ala, Gly, Leu, Pro, Met y Trp, como con los aminoácidos hidrofílicos (Gln, His, Arg y Ser) localizados en los extremos del péptido (Koirala et al., 2023). Péptidos antidiabéticos o inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) para el tratamiento de la diabetes tipo II han sido reportados en suero de queso Oaxaca (Mares-Mares et al., 2019). Además, Öztürk & Akın, (2021) identificaron en queso Tulum péptidos antidiabéticos provenientes de β -caseína (LPVPQ, TPVVVP, LPQNIPPL, LGPVRGPFPI, LYQEPVLGPVRGPFP y LPLPL).

El péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) se ha obtenido a partir de la unión del ácido palmítico y una cadena lateral de Lys mediante un conector glutamato (Ahn et al., 2017), llamado liraglutida y su ingesta de 3 mg/día provocó una pérdida de peso (Kumar, 2019). Los péptidos relacionados con la secreción de GLP-1 se encontraron en la hidrólisis de la caseína láctea contenida en queso Tulum (Öztürk & Akın, 2021), extractos obtenidos de yogurt, queso y proteínas de suero (Gillespie et al., 2015) y en queso Parmigiano Reggiano madurado de 0 a 24 meses.

2.3.1. Perspectiva general de péptidos antimicrobianos

2.3.1.1. Aspectos generales de la resistencia antimicrobiana

En Estados Unidos al menos 12,800 personas murieron en 2017 por infecciones provocadas por bacterias resistentes a los antibióticos; 25,000 muertes al año en Europa, y el número es mucho mayor en los países en desarrollo (Centros para el control y prevención de enfermedades, EE.UU., 2019). Se estima que para el año 2050 la resistencia antimicrobiana causará la muerte de diez millones de personas (Kostyanov & Can, 2017).

Las bacterias generan resistencia antimicrobiana debido a la resistencia intrínseca, que se encuentra en el genoma de las especies bacterianas, la resistencia adquirida (Kostyanov & Can, 2017), a la transferencia horizontal de genes y a la adquisición de ADN proveniente de otras bacterias (Abushaheen et al., 2020; Winter et al., 2021). La resistencia adquirida se puede dar por tres mecanismos: modificación de enzimas o inactivación de agentes

antimicrobianos, mediante la adición de grupos acetilo, adenilo o fosfato por las enzimas bacterianas a un sitio específico de los antibióticos, evitando que se unan; reducción de la acumulación intracelular de agentes antimicrobianos y supresión de genes de purinas; así mismo por alteraciones en los sitios diana de los agentes antimicrobianos, mutaciones, modificación química por metilación y sustitución de una diana (Abushaheen et al., 2020).

La transferencia horizontal de genes se da por tres mecanismos: transformación, transducción y conjugación. Durante la transformación, los fragmentos de ADN de una bacteria muerta ingresan a una bacteria receptora y se incorporan a su cromosoma; en la transducción se transfiere material genético de una bacteria a otra por un bacteriófago. Por último, en la conjugación, principal mecanismo de transferencia horizontal de genes, se realiza el traspaso del plásmido o plásmidos, que contienen genes de resistencia (Christaki et al., 2020; Mayorga-Ramos et al., 2023).

Los genes se almacenan en integrones y se transfieren intra y/o intercelularmente mediante transposones, plásmidos o elementos integrativos y conjugativos (Botelho & Schulenburg, 2021). Los transposones, elementos integrativos y conjugativos, e integrones contienen genes de resistencia y se adquieren mediante conjugación o transducción (Mayorga-Ramos et al., 2023). Los transposones son fragmentos de ADN que se desplazan a lo largo de la molécula del ADN, o a otras moléculas del ADN, debido a que poseen la enzima transposasa (Clark & Pazdernik, 2016). Los elementos integrativos y conjugativos pueden integrarse y dividir el cromosoma utilizando Tyr/ Ser, recombinasas o transposasas DDE una enzima con un dominio catalítico (Asp y Glu), asociado con una región de unión al ADN (Guérillot et al., 2014); se transfieren entre taxones distantes, ya sea de forma vertical u horizontal, generalmente son inmunes a la pérdida segregacional (Botelho & Schulenburg, 2021).

2.3.1.2. Características de péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos naturales presentan de 5-6 residuos de aminoácidos; en condiciones fisiológicas son catiónicos, debido a la presencia de

residuos de Arg y Lys, tienen una alta proporción de residuos hidrófobos y se pliegan en una variedad de estructuras y conformaciones anfipáticas (Marcos y Manzanares, 2011). Los péptidos antimicrobianos catiónicos son generalmente α -helicoidales (Lei et al., 2019), también se han reportado estructuras lineales de hélice α , lámina β y combinación (Huan et al., 2020). Li et al., (2021) mencionaron que la actividad antimicrobiana se ve afectada por las características fisicoquímicas de los péptidos tales como: la composición de aminoácidos ricos en Pro, Arg, Cys y/o Gly; la longitud de los péptidos, cuando son cortos favorecen la formación de micelas y los largos pueden doblarse y estabilizar poros; el mayor contenido de hélices α se correlaciona con actividades antimicrobianas más fuertes; la curvatura de los péptidos antimicrobianos influye en el modo de acción, cuando es una hélice anfipática lineal favorece la organización en poro de duela de barril y un péptido anfipático curvo forma el poro toroidal.

Péptidos aniónicos también han demostrado tener actividad antimicrobiana con cargas netas de -1 a -8 y están compuestos de 5 a 70 residuos de aminoácidos (Zhang et al., 2021); tienen un peso molecular que oscila entre 721.6 y 823.8 Da y estos péptidos son ricos en Glu y Asp (Rai et al., 2016). Este tipo de péptidos es producido durante la hidrólisis de proteínas o mediante la codificación por genes, se requieren de iones metálicos y de la carga negativa de la membrana microbiana para formar puentes salinos y tener el efecto antimicrobiano (Zhang et al., 2021). Se han reportado péptidos aniónicos obtenidos de suero de queso, proteínas del suero de leche inhibidoras de *Listeria monocytogenes* (Demers-Mathieu et al., 2013).

2.3.1.3. Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos

Los mecanismos de los péptidos antimicrobianos donde interviene la membrana son principalmente tres: modelo de duela de barril, poro toroidal y alfombra. En el modelo duela de barril, los péptidos antimicrobianos se orientan inicialmente en paralelo a la membrana, pero finalmente se insertan perpendicularmente (Figura 5a) en la bicapa lipídica (Kumar et al., 2018). Los péptidos transmembrana se empaquetan como las duelas de un barril con sus superficies

hidrófilas alineadas hacia el centro de un poro lleno de agua, los péptidos transmembrana están estrechamente ensamblados entre sí y forman un poro circular rígido (Li et al., 2021), lo que hace que el contenido de las células bacterianas se salga y las bacterias mueran (Lei et al., 2019). Tuerkova et al., (2020) señalan tres cosas necesarias para formación de la duela de barril: rigidez del péptido, fuerte interacción péptido-péptido y longitud del péptido. Los péptidos lineales encajan mejor en la geometría del poro de la duela del barril y la flexibilidad del péptido dificulta el empaquetado apretado, necesario en los péptidos. En segundo lugar, se necesitan fuertes interacciones péptido-péptido para estabilizar el ensamblaje de péptidos en forma de haz. Por último, la longitud de los péptidos formadores de poros en duela de barril debe coincidir con el grosor de la membrana para la formación de un poro en duela de barril, el péptido debe orientarse aproximadamente perpendicular con respecto al plano de la membrana.

En el modelo de poro toroidal, los péptidos interactúan con los grupos de cabezas de lípidos, lo que induce a que la bicapa se doble y se inserte verticalmente en la bicapa de membrana y forme orificios compuestos por los péptidos y las cabezas de fosfolípidos (Li et al., 2022), como se muestra en la Figura 5b. Tuerkova et al., (2020) identificaron que en los péptidos formadores del poro toroidal no es esencial la autoasociación (un contenido hidrofóbico de aproximadamente 50 % será suficiente para la formación de poros toroidales), su flexibilidad mejora la actividad, la posición del pliegue puede alterar la estructura de los poros y la superficie alineada de los péptidos fuera del poro pueden participar en la estabilización del poro.

En el mecanismo de la alfombra, a una concentración de péptidos inferior a la concentración crítica, la membrana sufre algunas perturbaciones intrínsecas, tales como adelgazamiento, expansión lateral, agrupamiento de lípidos aniónicos, deformación y alta tensión superficial (Li et al., 2017). La presencia de lípidos cargados negativamente ayuda a la formación de una densa alfombra peptídica, ya que ayudan a reducir las fuerzas electrostáticas de repulsión entre

péptidos cargados positivamente (Bechinger & Lohner, 2006). Posteriormente, cuando la concentración de péptidos alcanza el umbral, los péptidos antimicrobianos cubren la membrana en grupos y provocan su rotura de forma similar a un surfactante (Figura 5c) (Zhang et al., 2021).

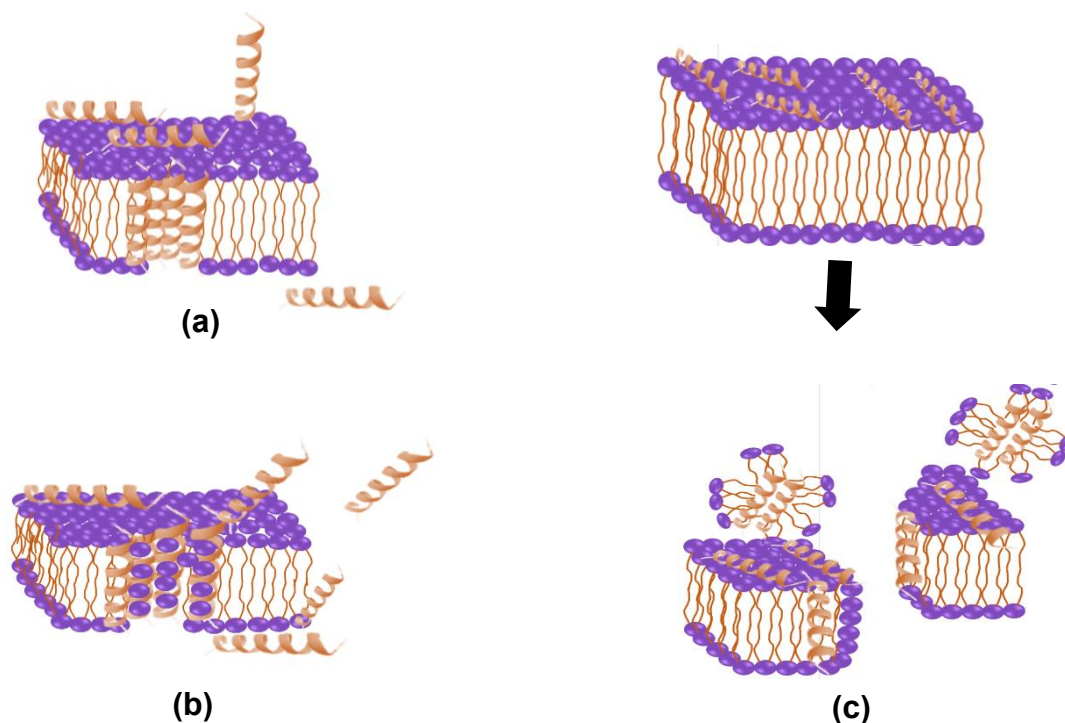


Figura 5. a) Modelo de duela de barril, b) Modelo de poro toroidal, c) Modelo de alfombra (Zhang et al., 2021).

2.3.1.4. Péptidos antimicrobianos en queso

En quesos italianos, se han identificado péptidos antimicrobianos potentes como: casecquinas, isracidina, casosidina-I, kappacina y lactoferricina (Rizzello et al., 2005). En queso Canastra producido en Brasil se cuantificaron péptidos solubles que mostraron actividad inhibidora sobre *Escherichia coli* y se señaló la secuencia de los péptidos antimicrobianos de α_{s1} -caseína como la isracidina (Fialho et al., 2018). Pritchard et al., (2010) obtuvieron extractos peptídicos de queso y reportaron que inhiben *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*. En queso "Coalho" de origen brasileño se identificaron 32 péptidos con actividad antimicrobiana, provenientes de α , β y κ -caseínas (Silva et al., 2016). En queso

Tulum encontraron isracidina proveniente de α_{s1} -caseína y casosidina, péptido derivado de α_{s2} -CN con actividad antibacteriana (Öztürk et al., 2021).

La lactoferricina y otros péptidos antibacterianos pueden producirse a partir del suero del queso de bajo costo por hidrólisis mediada por pepsina y cuajo (Elbarbary et al., 2019). En suero se ha reportado el péptido kappacina hidrolizado a partir de κ -caseína (López-Expósito et al., 2006). A partir del suero ácido, producto de la producción de requesón, se obtuvo lactoferrina con actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157: Toxina H7 (Matijašić et al., 2020).

En el Cuadro 3 se muestran siete estudios donde se observa el potencial de los quesos como fuente de antimicrobianos contra diferentes cepas patógenas, las técnicas utilizadas para la determinación de actividad antimicrobiana son la difusión de discos y UV-VIS (Nguyen Thi et al., 2014; Théolier et al., 2014; Öztürk & Akin, 2017; Banihashemi et al., 2020; Turan & Durak, 2022). La actividad antimicrobiana necesita complementarse con técnicas como la espectrofotometría de masas con tándem que permite conocer las secuencias peptídicas. En el artículo de Öztürk & Akin, (2017) faltó complementarse con un perfil peptídico o espectrofotometría de masas para poder asociar la bioactividad del péptido a características específicas. En el estudio realizado por Atanasova et al., (2021) se utilizó espectrofotometría de masas, pero no se comprobó la bioactividad antimicrobiana contra cepas específicas de patógenos. Así mismo, en el estudio realizado por Théolier et al., (2014) solo se obtienen péptidos menores de ≤ 10 KDa y no realizaron una caracterización más profunda, pero mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos.

2.4. Actividad antiinflamatoria de péptidos de productos lácteos

Estudios clínicos demuestran que del 15 al 20 % de las neoplasias malignas en todo el mundo se desarrollan debido a inflamaciones crónicas que provocan morbilidad y mortalidad (Serhan y Savill, 2006). Las respuestas inflamatorias crónicas a menudo se asocian con: diabetes tipo 2, inflamación intestinal, artritis, aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares (Guha y Majumder, 2019).

El proceso de evolución de la inflamación a tumor involucra células fagocíticas, como neutrófilos y macrófagos, que producen varios mediadores citotóxicos (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno), serina y cisteína proteasas, agentes perforantes de membrana, metaloproteínasa de matriz, factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés tumor necrosis factor), interleucinas, interferones y enzimas (ciclooxygenasa-2, lipooxygenasa -5 y fosfolipasa A2) como se observa en la Figura 6 (Strömstedt et al., 2014).

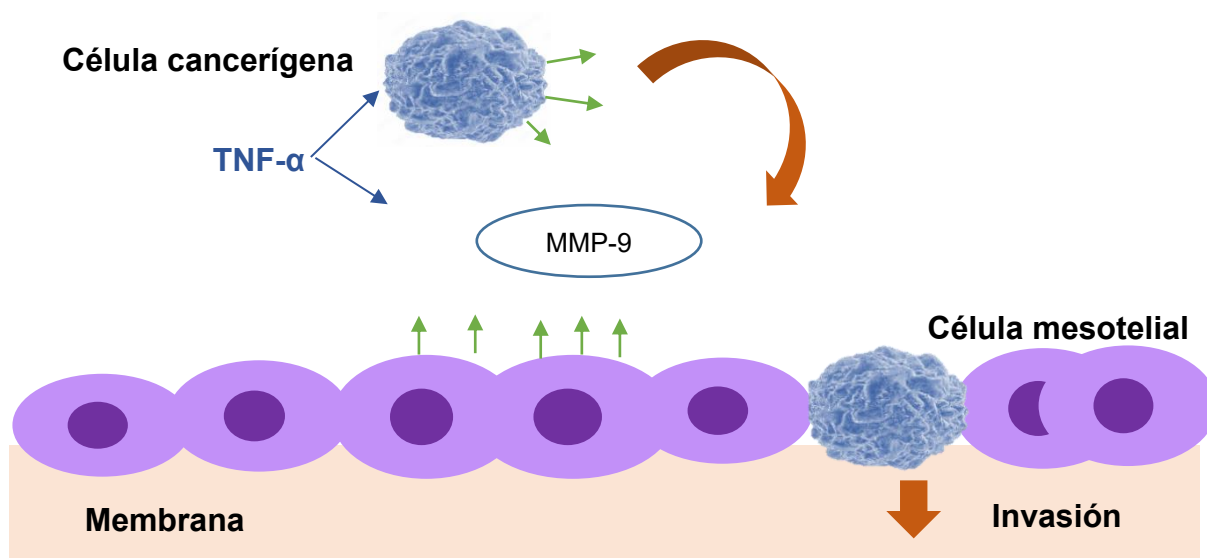


Figura 6. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) estimula a las células del carcinoma gástrico y a las células mesoteliales peritoneales para secretar metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9), que promueve la invasión de células cancerosas (Ågren & Auf Dem Keller, 2020).

En estudios para determinar el efecto antiinflamatorio se usan modelos *in vitro* en los que ocupan principalmente cultivos celulares de mamíferos, mientras que estudios *in vivo* usan animales y humanos (Guha y Majumder, 2019). Se ha reportado que, en extractos de péptidos solubles en agua, de queso Cheddar, obtenido a partir de leche de búfala y de vaca, existe un potencial antiinflamatorio que puede proteger a las células de macrófagos RAW-264.7, del daño inflamatorio (Rafiq et al., 2018). Por otra parte, a partir de queso Mozzarella de búfala de campana se obtuvo el péptido MBCP, que posee efectos antiinflamatorios tanto *in vitro* como *in vivo* (Tenore et al., 2019). Por otra parte,

Cuadro 3. Actividad antimicrobiana en quesos.

Tipo de queso	Condiciones del estudio Origen/ tiempo de maduración/técnica para determinar actividad antimicrobiana.	Péptido encontrado	Microorganismo que inhibe	Resultados obtenidos	Autores
Queso Tulum	Leche de vaca y de cabra; tiempo de maduración 0, 15, 30, 60, 90 y 120 d; técnica de difusión en disco.	Péptidos hidrófobos	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 (90 días, leche de cabra)	Incrementó del número de péptidos con la maduración	Öztürk & Akin, (2017)
Quesos Emmental de Savoie y Asiago d'Alveo	Leche cruda; tiempo de maduración 97, 114 y 149 días; fraccionamiento de extracto mediante C.L.I.C.; densidad óptica 600 nm	Péptidos con masa molecular inferior a 1 g.mol ⁻¹	Emmental de Savoie madurado, 97 días, 100 %, queso Asiago, 150 días, 42 % de actividad antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i>	Péptidos catiónicos tienen actividad antimicrobiana.	Nguyen Thi et al., (2014)
Queso Koopeh	Fraccionamiento de extractos por ultrafiltración; determinación de pesos moleculares por espectrofotometría de masas; difusión en disco.	Pesos moleculares de péptidos contenidos en la fracción de 2–10 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Salmonella enterica</i> .	Actividad antimicrobiana y antioxidante	Banihashemi et al., (2020)
Queso de búfalo fresco.	El queso se produjo por dos empresas diferentes en dos estaciones diferentes; Extracto liofilizado; MALDI-TOF MS/MS	YQEPVLGPVRGPFPI (péptido antimicrobiano y antihipertensivos) GLPQGVLNENLL y LYQEPVLGPVRGPFPI (específicos de <i>Bubalus bubalis</i>)	<i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .	Actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana.	Silva et al., (2019)

Tipo de queso	Condiciones del estudio Origen/ tiempo de maduración/técnica para determinar actividad antimicrobiana.	Péptido encontrado	Microorganismo que inhibe	Resultados obtenidos	Autores
Quesos blancos búlgaros en salmuera.	Leche de cabra, oveja y vaca. MALDI-TOF.	Los aminoácidos con niveles más altos fueron Leu, Phe, Arg, Val y Lys. α ₂ -CN generó el péptido antimicrobiano (LKKISQR) β -CN hidrolizo el péptido YQEPVLGPVRGPFPIIV.	N.R	Queso de vaca 51 péptidos, queso de oveja 31 péptidos y queso de cabra 22 péptidos.	Atanasova et al., (2021)
Quesos blancos tradicionales turcos.	Leche de vaca y cabra, queso madurado por 9 meses; Ezine maduraron por 12 meses; espectrofotometría de masas con tandem; difusión en disco.	Péptidos antimicrobianos derivados de α ₁ -CN (GLPQE, IKHQGLPQE, TTMLPW, VLNENLLR y YLEQLLR); péptidos derivados de α ₂ -CN(IQPKTKVIPYVR, LKKISQ y TKVIPYVRYL), Péptidos derivados de β -CN (EMAPK y PVVPPFLQPE)	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	42 secuencias peptídicas	Turan & Durak, (2022)
Mozzarella, Gouda, Suizo y Cheddar	Los extractos de suero se ultrafiltraron con membranas de 10 kDa y se desalinizaron ; absorbancia a 595 nm y conteo en placa.		Mozzarella y Gouda redujeron bacterias (<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> y <i>E.coli</i> MC4100) y hongos Mozzarella,		Théolier et al., (2014)

**producidos
en Canadá**

Gouda, Suizo y Cheddar
(*Fusarium* spp,
Aspergillus versicolor y
Mucor racemosus).

C.L.I.C: Cromatografía Líquida de Intercambio Catiónico; **N.R:** No reportado.

en el estudio realizado por Aguilar-Toalá et al., (2017), reportan actividad antiinflamatoria de cepas de *Lactobacillus plantarum*, aisladas de quesos semiblandos portugueses, de leche cruda de oveja e inoculadas en leche, sin el uso de líneas celulares o ratones.

Estudios estructurales indican que los péptidos con actividad antiinflamatoria presentan en su secuencia aminoácidos cargados positivamente e hidrófobos, agrupados hacia el extremo N-terminal y contienen grupos polares en el extremo C-terminal, entre los que se encuentran principalmente Arg y Lys (Guha y Majumder, 2019). Un mecanismo de inflamación que inhiben los péptidos es el que se origina por la presencia del lipopolisacarido de bacterias gram negativa que conduce a la sepsis (Solov'eva et al., 2023; Li et al., 2023). La lactoferricina humana, con residuos de Arg en el grupo N-terminal, pueden unirse al lipopolisácarido liberado por las bacterias y así bloquear la respuesta inflamatoria (Latorre et al., 2010). Otro aminoácido relacionado con actividad antiinflamatoria es la Gln (González-Montoya et al., 2018). Los péptidos con alta hidrofobicidad promueven la unión del péptido a las membranas; la despolarización de la membrana en las células microbianas contribuye a modular el efecto antiinflamatorio (Nan et al., 2009). Sin embargo, la distribución de los aminoácidos no tiene una posición fija, lo que se traduce en que tendrán funciones diferentes (Li et al., 2023). Por otro lado, se han identificado péptidos cargados negativamente pEL, g-EC y g-EV con excelentes propiedades antiinflamatorias (Zhang et al., 2015). Además de péptidos de gran tamaño como la lunasina con 43 aminoácidos y el glicomacropéptido (GMP) con 64 aminoácidos con actividad antiinflamatoria (Ahn et al., 2012).

2.5. Metabolómica para la determinación de ácidos grasos en alimentos.

La metabolómica tiene como objetivo proporcionar un perfil completo de todos los metabolitos de bajo peso molecular mediante técnicas analíticas tales como resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida (LC-MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Zheng et al., 2015). El uso de infrarrojo cercano (NIR) ha permitido identificar ácidos

grasos de diferentes matrices alimentarias, carne de res, grasa de cerdo, chorizo curado, aceite de pescado, arroz, leche desnatada en polvo, leche de vaca y quesos, como se muestra en el Cuadro 4 (Liu et al., 2018; Barragán-Hernández et al., 2020; Daoud et al., 2020; González-Martín et al., 2020; Hernández-Jiménez et al., 2020; Lu et al., 2021; Nieto-Ortega et al., 2022; Parrini et al., 2023). Primero se realiza un barrido seleccionando una longitud de onda, en estudios realizados se maneja un rango de absorbancia de 600 a 2500 nm, de acuerdo a la matriz alimentaria. Para el pre-procesamiento de datos se aplicó el uso de la primera y/o segunda derivada, selección de regiones y combinación de algoritmos para obtener la mejor matriz de datos.

El análisis de datos se realizó mediante diferentes modelos estadísticos, tanto dirigidos como no dirigidos; los modelos utilizados con mayor frecuencia fueron PLS (por sus siglas en inglés, partial least squares), PCA (por sus siglas en inglés, principal component analysis) y MPLS (por sus siglas en inglés, modified partial least square). La selección del método dependerá mucho de la hipótesis de investigación, si lo que se quiere es únicamente separar muestras por composición de ácidos grasos, el modelo PCA es adecuado; y en la mayoría de los casos no se realiza validación.

Cuadro 4. Estudios con NIR para la detección de ácidos grasos en diferentes matrices alimentarias.

Matriz	Condiciones	Pre-procesamiento de datos	Modelos multivariante utilizado	Resultados	Autores
Carne de res	Carne macerada, cubeta de cuarzo, 800 a 2500 nm	Primera y segunda derivada, la variación normal estándar (SNV) y D, algoritmo Savitzky-Golay.	PLS y R-SVR	R-SMV ($R^2=0.92$)	Barragán-Hernández et al., (2020)
Grasa de cerdo	Grasa picada 4021-9999 Absorbancia	Selección de regiones AGS 5400–7500 cm^{-1} . PUFA 5400–6100 y 7400 –8400 cm^{-1} .	PLS	Cuantificación n6 PUFA y n3 PUFA La suma de AGS presentó una calibración ($R^2=0.89$) y validación ($R^2=0.87$). MUFA total calibración ($R^2=0.90$)	Parrini et al., (2023).
Chorizo curado	Rebanada de chorizo Reflectancia 1100-2000 nm		MPLS y ANN	ANN (RSQ=0.61 a 0.92)	Hernández-Jiménez et al., (2020)
Aceite de pescado (subproducto)	NIR portátil y compacto 900 a 1650 nm Transflectancia	SNV y SNVd, MSC, primera y segunda derivada de Savitzky-Golay.	PLSR	Modelos para AGS($R^2=0.98$), MUFA($R^2=0.97$), PUFA($R^2=0.96$), ω -3($R^2=0.99$) y ω -6($R^2=0.95$) errores pequeños y un valor de sesgo bajo.	Nieto-Ortega et al., (2022)

Matriz	Condiciones	Pre-procesamiento de datos	Modelos multivariante utilizado	Resultados	Bibliografía
Arroz	20 g de arroz Plato de cuarzo 900–1700 nm	Segunda derivada	PCA y BPNN	PC1= 55.53 % BPNN($R_P = 0.9265$); RMSEP=1.1005 mg/100 g	Lu et al., (2021)
Leche desnatada en polvo	4000 a 600 cm^{-1} Absorbancia		PLSR utilizando el rango espectral de 800 a 2400 nm PCA	Volátiles para detectar oxidación de lípidos ($R^2 > 0.9$).	Daoud et al., (2020)
Leche de vaca orgánica y no orgánica.	NIRS portátil 908 a 1676 nm Modo reflectancia NIRS de mesa 1000 a 2500 nm con el modo de transmisión. Ventana de cuarzo, 1100 a 2000 nm Extractos grasos, células "cam-lock" 1100 a 2498 nm	Escalado automático, centrado en la media, suavizado, primera derivada, transformación $\log_{10}$ y MSC.		Los dos primeros componentes principales (PC) explican el 92 %.	Liu et al., (2018)
Quesos elaborados con leche de vaca, oveja y cabra.			PCA-MPLS	Determinación de diecinueve ácidos grasos	González-Martín et al., (2020)

PLS: Mínimos Cuadrados Parciales, **R-SVR:** Regresión de máquina de vectores de soporte en núcleo radial, **PCA:** Análisis de Componentes Principales, **BPNN:** Red neuronal de retropropagación, **RMSEP:** Error cuadrático medio, **AGS:** Ácidos grasos saturados, **MSC:** Corrección de dispersión múltiple, **MPLS:** Regresión por mínimos cuadrados parciales modificada, **SNV y SNVd:** variable normal estándar sin y con dependencia, **MSC:** Corrección de Dispersión Multiplicativa, **PLSR:** Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales, **ANN:** Redes Neuronales Artificiales.

Por otro lado, el modelo PLS permitió discriminar muestras basado en su composición de ácidos grasos, realizar validación cruzada para evitar sobreajuste en el modelo, eliminar y calibrar muestras es usado para predecir valores (Sørensen et al., 2021). Los modelos supervisados como el PLS discriminant analysis (PLS-DA) y orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS) han demostrado tener ventajas sobre los modelos no supervisados como el PCA, mejorando la separación entre grupos de interés. Sin embargo, en los análisis metabolómicos siempre aparecen juntos el PCA-PLS-DA, PCA-PLS-DA-OPLS-DA. Dentro de los métodos de aprendizaje automático, el aprendizaje profundo con redes neuronales artificiales se utiliza en metabolómica para la resolución de problemas complejos que no se pueden resolver con los algoritmos tradicionales (Pomyen et al., 2020).

2.6. Identificación de compuestos en alimentos con RMN

El principio de RMN consiste en que el momento magnético nuclear de las moléculas interactúa con el campo externo generado por el instrumento de RMN (Hatzakis, 2019). La RMN es ampliamente utilizada para el análisis de varios alimentos tales como: mezcales y vinos (López-Aguilar et al., 2021), bebidas, aceites, verduras, carnes y productos lácteos en forma líquida o sólida (Hatzakis, 2019). Una gran cantidad de compuestos han sido identificados utilizando la RMN. En aceite de oliva se han reportado triglicéridos, diglicéridos, terpenos y aldehídos (^1H -RMN) y se ha detectado la distribución de ácidos grasos del glicerol (^{13}C -RMN). En frutas se ha reportado la presencia de azúcares, aminoácidos, antocianinas y otros fenoles (Capitani et al., 2014; Capitani et al., 2017). En leche, con RMN, se han identificado carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos (Sundekilde et al., 2011). Andreotti et al., (2000), identificaron por ^{13}C -RMN, 13 ácidos grasos presentes en leche de búfala y de vaca, en el que el ácido cáprico (C10:0) se encontró en mayor concentración en leche de búfala. En el queso Pecorino Sardo se detectaron con RMN ácidos grasos saturados de cadena larga e isómeros (Scano et al., 2011).

En un estudio realizado por Segato et al., (2019) en queso Pressato, que tiene un tiempo de maduración de 20 a 90 días, utilizando ^1H -RMN detectaron colina, 2,3-butanodiol, Lys, Tyr y azúcares. Sin embargo, la aplicación de la metabolómica basada en ^1H -RMN fue un método eficaz solo para las muestras de queso con un período de maduración corto. Los perfiles de metabolitos de las variedades de queso de Parmigiano Reggiano, Emmental y Mozzarella se analizaron con éxito utilizando resonancia magnética nuclear de alta resolución con giro de ángulo mágico (HRMAS-RMN) (Mazzei y Piccolo, 2012). En quesos Gouda, Camembert, Berg, Appenzeller, Cheddar, Brie, Brown, Emmental, Frill, Quark y Reblochon, se han detectado por HRMAS-RMN, aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y fosfolípidos (Kandasamy et al., 2020). Afshari et al., (2020) reportaron que utilizando un análisis integrador de conjuntos de datos multiómicos se podían detectar las relaciones que existían entre el microbioma (taxones) y el metaboloma (metabolitos) en queso Cheddar.

El análisis estructural de péptidos con espectroscopía de RMN, generalmente se basa en el conocimiento de su secuencia primaria, para permitir la asignación de las resonancias, antes de la determinación de la estructura tridimensional (Wilson y Daly, 2018). La RMN se ha utilizado para identificar péptidos antimicrobianos en extractos liofilizados de queso de Zacazonapan; y se menciona que la rigidez en la estructura de los péptidos podría explicar la falta de actividad antimicrobiana en la fracción soluble (Torres-Salas et al., 2020). Por otro lado, la RMN también se ha utilizado para cuantificar los pesos moleculares y el índice de polidispersidad de mezclas complejas de péptidos, tales como, el acetato de glatiramer, hidrolizado de colágeno y un extracto de leucocitos humanos, utilizando resonancia magnética nuclear espectroscopía ordenada por difusión (DOSY-RMN) (Vázquez-Leyva et al., 2019).

2.7. Literatura citada

Abushaheen, M. A., Muzahed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance,

- mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020). Cheesomics: The future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 33-47. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>
- Ağagündüz, D., Yılmaz, B., Şahin, T. Ö., Güneşliol, B. E., Ayten, Ş., Russo, P., Spano, G., Rocha, J. M., Bartkiene, E., & Özogul, F. (2021). Dairy Lactic Acid Bacteria and Their Potential Function in Dietetics: The Food–Gut–Health Axis. *Foods*, 10(12), 3099. <https://doi.org/10.3390/foods10123099>
- Ågren, M. S., & auf dem Keller, U. (2020). Matrix Metalloproteinases: How Much Can They Do? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms21082678>
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846>
- Aguilar-Toalá, J. E., Torres-Llanez, M. J., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2022). Antioxidant capacity and identification of radical scavenging peptides from Crema de Chiapas, Fresco and Cocido cheeses. *Journal of Food Science and Technology*, 59(7), 2705-2713. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05291-2>
- Ahn, C.-B., Je, J.-Y., & Cho, Y.-S. (2012). *Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/1125392>
- Ahn, J.-M., Kassees, K., Lee, T.-K., Manandhar, B., & Yousif, A. M. (2017). 6.03 - Strategy and Tactics for Designing Analogs: Biochemical Characterization of the Large Molecules☆. En S. Chackalamannil, D. Rotella, & S. E. Ward (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (pp. 66-115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12413-8>
- Akaçin, İ., Ersoy, Ş., Doluca, O., & Güngörmüşler, M. (2022). Comparing the significance of the utilization of next generation and third generation sequencing technologies in microbial metagenomics. *Microbiological Research*, 264, 127154. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127154>
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, C. M., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2018). Characterization of Bacterial Communities in Mexican Artisanal Raw Milk “Bola de Ocosingo” Cheese by High-Throughput Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2598. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02598>
- Álvarez Ramos, L., Arrieta Baez, D., Dávila Ortiz, G., Carlos Ruiz Ruiz, J., & Manuel Toledo López, V. (2022). Antioxidant and antihypertensive activity of Gouda cheese at different stages of ripening. *Food Chemistry: X*, 14, 100284. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100284>

- Andreotti, G., Trivellone, E., Lamanna, R., Di Luccia, A., & Motta, A. (2000). Milk identification of different species: ^{13}C -NMR spectroscopy of triacylglycerols from cows and buffaloes' milks. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2432-2437. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75133-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75133-2)
- Atanasova, J., Dalgalarondo, M., Iliev, I., Moncheva, P., Todorov, S. D., & Ivanova, I. V. (2021). Formation of Free Amino Acids and Bioactive Peptides During the Ripening of Bulgarian White Brined Cheeses. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(1), 261-272. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09669-0>
- Banihashemi, S. A., Nikoo, M., Ghasempour, Z., & Ehsani, A. (2020). Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101798. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798>
- Barragán-Hernández, W., Mahecha-Ledesma, L., Burgos-Paz, W., Olivera-Angel, M., & Angulo-Arizala, J. (2020). Using near-infrared spectroscopy to determine intramuscular fat and fatty acids of beef applying different prediction approaches. *Journal of Animal Science*, 98(11), skaa342. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa342>
- Bechinger, B., & Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1529-1539. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.001>
- Berini, F., Casciello, C., Marcone, G. L., & Marinelli, F. (2017). Metagenomics: Novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS Microbiology Letters*, 364(21), fnx211. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx211>
- Billington, C., Kingsbury, J. M., & Rivas, L. (2022). Metagenomics Approaches for Improving Food Safety: A Review. *Journal of Food Protection*, 85(3), 448-464. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-301>
- Boers, S. A., Jansen, R., & Hays, J. P. (2019). Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(6), 1059-1070. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03520-3>
- Botelho, J., & Schulenburg, H. (2021). The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. *Trends in Microbiology*, 29(1), 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.011>
- Bottari, B., Levante, A., Bancalari, E., Sforza, S., Bottesini, C., Prandi, B., De Filippis, F., Ercolini, D., Nocetti, M., & Gatti, M. (2020). The Interrelationship Between Microbiota and Peptides During Ripening as a Driver for Parmigiano Reggiano Cheese Quality. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581658. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581658>
- Campagnollo, F. B., Gonzales-Barron, U., Pilão Cadavez, V. A., Sant'Ana, A. S., & Schaffner, D. W. (2018). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. *Food Control*, 92, 370-379. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.019>

- Capitani, D., Sobolev, A. P., Delfini, M., Vista, S., Antiochia, R., Proietti, N., Bubici, S., Ferrante, G., Carradori, S., Salvador, F. R. D., & Mannina, L. (2014). NMR methodologies in the analysis of blueberries. *ELECTROPHORESIS*, 35(11), 1615-1626. <https://doi.org/10.1002/elps.201300629>
- Capitani, D., Sobolev, A. P., & Mannina, L. (2017). Nuclear Magnetic Resonance – Metabolomics. En *Food Authentication* (pp. 177-197). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118810224.ch6>
- Cardin, M., Cardazzo, B., Mounier, J., Novelli, E., Coton, M., & Coton, E. (2022). Authenticity and Typicity of Traditional Cheeses: A Review on Geographical Origin Authentication Methods. *Foods*, 11(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/foods11213379>
- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- CFR - Code of Federal Regulations Title 21. (s. f.). Recuperado 17 de abril de 2024, de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=133&showFR=1>
- Chamata, Y., Watson, K. A., & Jauregi, P. (2020). Whey-Derived Peptides Interactions with ACE by Molecular Docking as a Potential Predictive Tool of Natural ACE Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms21030864>
- Chaudhari, H. G., Prajapati, S., Wardah, Z. H., Raol, G., Prajapati, V., Patel, R., Shati, A. A., Alfaifi, M. Y., Elbehairi, S. E. I., & Sayyed, R. Z. (2023). Decoding the microbial universe with metagenomics: A brief insight. *Frontiers in Genetics*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgen.2023.1119740>
- Chen, G.-W., Lin, H.-T. V., Huang, L.-W., Lin, C.-H., & Lin, Y.-H. (2021). Purification and Identification of Cholesterol Micelle Formation Inhibitory Peptides of Hydrolysate from High Hydrostatic Pressure-Assisted Protease Hydrolysis of Fermented Seabass Byproduct. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5295. <https://doi.org/10.3390/ijms22105295>
- Chon, J.-W., Kim, J.-W., Song, K.-Y., Lim, J.-S., Bae, D., Kim, H., & Seo, K.-H. (2020). Fate and survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during ripening of cheddar cheeses manufactured from unpasteurized raw milk. *LWT*, 133, 109944. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109944>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26-40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). Chapter 9—Genomics & Systems Biology. En D. P. Clark & N. J. Pazdernik (Eds.), *Molecular Biology (Second Edition)* (pp. 248-272). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378594-7.00009-3>
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). Chapter 1—Basics of Biotechnology. En D. P. Clark & N. J. Pazdernik (Eds.), *Biotechnology (Second Edition)* (pp. 1-31). Academic Cell. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385015-7.00001-6>

- Claridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
- Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2023). Distinct Bacterial Communities in São Jorge Cheese with Protected Designation of Origin (PDO). *Foods*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/foods12050990>
- Daoud, S., Bou-Maroun, E., Waschatko, G., Horemans, B., Mestdagh, R., Billecke, N., & Cayot, P. (2020). Detection of Lipid Oxidation in Infant Formulas: Application of Infrared Spectroscopy to Complex Food Systems. *Foods*, 9(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/foods9101432>
- Demers-Mathieu, V., Gauthier, S. F., Britten, M., Fliss, I., Robitaille, G., & Jean, J. (2013). Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in Cheddar cheese by an anionic peptides-enriched extract from whey proteins. *International Dairy Journal*, 32(1), 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.008>
- Dimov, S. G., Gyurova, A., Zagorchev, L., Dimitrov, T., Georgieva-Miteva, D., & Peykov, S. (2021). NGS-Based Metagenomic Study of Four Traditional Bulgarian Green Cheeses from Tcherni Vit. *LWT*, 152, 112278. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112278>
- Doyle, C. J., Gleeson, D., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2016). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: A High-Throughput Sequencing Study. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(2), e02694-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02694-16>
- Duru, I. C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., & Smolander, O.-P. (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 281, 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017>
- Edwards, J. E., Hermes, G. D. A., Kittelmann, S., Nijssse, B., & Smidt, H. (2019). Assessment of the Accuracy of High-Throughput Sequencing of the ITS1 Region of *Neocallimastigomycota* for Community Composition Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02370>
- Elbarbary, H. A., Ejima, A., & Sato, K. (2019). Generation of antibacterial peptides from crude cheese whey using pepsin and rennet enzymes at various pH conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 555-563. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9214>
- Embong, Z., Wan Hitam, W. H., Yean, C. Y., Rashid, N. H. A., Kamarudin, B., Abidin, S. K. Z., Osman, S., Zainuddin, Z. F., & Ravichandran, M. (2008). Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmology*, 8, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-8-7>
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, 57, 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004>
- Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L., & Boetius, A.

- (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.637526>
- Farkye, N. Y. (2014). Cheese: Microbiology of Cheesemaking and Maturation. En *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 395-401). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00059-8>
- Fathy, W. A., Techen, N., Elsayed, K. N. M., Essawy, E. A., Tawfik, E., Alwutayd, K. M., Abdelhameed, M. S., Hammouda, O., & Ross, S. A. (2023). Applying an internal transcribed spacer as a single molecular marker to differentiate between *Tetraselmis* and *Chlorella* species. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1228869>
- Fialho, T. L., Carrijo, L. C., Magalhães Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., Piccoli, R. H., & de Abreu, L. R. (2018). Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 107, 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.009>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G., & Sindic, M. (2018). Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review. *International Journal of Dairy Technology*, 71(4), 825-843. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12552>
- Gillespie, A. L., Calderwood, D., Hobson, L., & Green, B. D. (2015). Whey proteins have beneficial effects on intestinal enteroendocrine cells stimulating cell growth and increasing the production and secretion of incretin hormones. *Food Chemistry*, 189, 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.022>
- González Ariceaga, C. C., Afzal, M. I., Umer, M., Abbas, S., Ahmad, H., Sajjad, M., Parvaiz, F., Imdad, K., Imran, M., Maan, A. A., Khan, M. K. I., Ullah, A., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E., Villegas de Gante, A., Jacquot, M., & Cailliez-Grimal, C. (2019). Physicochemical, Sensorial and Microbiological Characterization of PoroCheese, an Artisanal Mexican Cheese Made from Raw Milk. *Foods*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/foods8100509>
- González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, Á. M., De la Rosa-Alcaraz, M. de los Á., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3250-3262. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>
- González-Martín, M. I., Vivar-Quintana, A. M., Revilla, I., & Salvador-Esteban, J. (2020). The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*, 156, 104854. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020>

.104854

- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry*, 242, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.035>
- Grande-Cano, R. (2018). Secuenciación masiva de ADN. Biotecnología en Movimiento. *Revista de divulgación del Instituto de Biotecnología de la UNAM*, 13, 13-21. <https://biotecmov.ibt.unam.mx/services/pdfDownloader.php?id=MTMqKI8qKjA=>
- Grützke, J., Gwida, M., Deneke, C., Brendebach, H., Projahn, M., Schattschneider, A., Hofreuter, D., El-Ashker, M., Malorny, B., & Al Dahouk, S. (2021). Direct identification and molecular characterization of zoonotic hazards in raw milk by metagenomics using *Brucella* as a model pathogen. *Microbial Genomics*, 7(5), 000552. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000552>
- Guérillot, R., Siguier, P., Gourgouy, E., Chandler, M., & Glaser, P. (2014). The Diversity of Prokaryotic DDE Transposases of the Mutator Superfamily, Insertion Specificity, and Association with Conjugation Machineries. *Genome Biology and Evolution*, 6(2), 260. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu010>
- Guha, S., & Majumder, K. (2019). Structural-features of food-derived bioactive peptides with anti-inflammatory activity: A brief review. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12531. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12531>
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116-117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Hassan, S., Bahar, R., Johan, M. F., Mohamed Hashim, E. K., Abdullah, W. Z., Esa, E., Abdul Hamid, F. S., & Zulkafli, Z. (2023). Next-Generation Sequencing (NGS) and Third-Generation Sequencing (TGS) for the Diagnosis of Thalassemia. *Diagnostics*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13030373>
- Hatzakis, E. (2019). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 189-220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>
- Helal, A., Cattivelli, A., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2023). Effect of Ripening and In Vitro Digestion on Bioactive Peptides Profile in Ras Cheese and Their Biological Activities. *Biology*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biology12070948>
- Hernández-Jiménez, M., Hernández-Ramos, P., Martínez-Martín, I., Vivar-Quintana, A. M., González-Martín, I., & Revilla, I. (2020). Comparison of artificial neural networks and multiple regression tools applied to near infrared spectroscopy for predicting sensory properties of products from quality labels. *Microchemical Journal*, 159, 105459. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105459>

- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12), 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- Imai, K., Shimizu, K., & Honda, H. (2021). Machine learning screening of bile acid-binding peptides in a peptide database derived from food proteins. *Scientific Reports*, 11, 16123. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95461-1>
- Illumina, 2010. https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights_sequencing.pdf. 6/07/2024.
- Ivens, K. O., Baumert, J. L., Hutkins, R. L., & Taylor, S. L. (2017). Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1629-1639. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11649>
- Iwaniak, A., & Mogut, D. (2020). Metabolic Syndrome-Preventive Peptides Derived from Milk Proteins and Their Presence in Cheeses: A Review. *Applied Sciences*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/app10082772>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kamimura, B. A., De Filippis, F., Sant'Ana, A. S., & Ercolini, D. (2019). Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food Microbiology*, 80, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.014>
- Kandasamy, S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H. B., Seol, K.-H., & Ham, J.-S. (2020). ¹H HRMAS-NMR based metabolic fingerprints for discrimination of cheeses based on sensory qualities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1446-1461. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.043>
- Kappelman-Fenzl, M. (2021). Library Construction for NGS. In M. Kappelman-Fenzl (Ed.), *Next Generation Sequencing and Data Analysis* (pp. 39-45). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62490-3_3
- Kazou, M., Gavriil, A., Kalagkatsi, O., Paschos, T., & Tsakalidou, E. (2023). The Impact of Different Inoculation Schemes on the Microbiota, Physicochemical and Sensory Characteristics of Greek Kopanisti Cheese throughout Production and Ripening. *Microorganisms*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010066>
- Koirala, P., Dahal, M., Rai, S., Dhakal, M., Nirmal, N. P., Maqsood, S., Al-Asmari, F., & Buranasompob, A. (2023). Dairy Milk Protein-Derived Bioactive Peptides: Avengers Against Metabolic Syndrome. *Current Nutrition Reports*, 12(2), 308-326. <https://doi.org/10.1007/s13668-023-00472-1>

- Kostyaneyev, T., & Can, F. (2017). The Global Crisis of Antimicrobial Resistance. En *Antimicrobial Stewardship* (pp. 3-12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810477-4.00001-5>
- Kumar, M. S. (2019). Peptides and Peptidomimetics as Potential Antiobesity Agents: Overview of Current Status. *Frontiers in Nutrition*, 6, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00011>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Lai, G., Melillo, R., Pes, M., Addis, M., Fadda, A., & Pirisi, A. (2020). Survival of Selected Pathogenic Bacteria during PDO Pecorino Romano Cheese Ripening. *Dairy*, 1(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/dairy1030020>
- Latorre, D., Puddu, P., Valenti, P., & Gessani, S. (2010). Reciprocal Interactions between Lactoferrin and Bacterial Endotoxins and Their Role in the Regulation of the Immune Response. *Toxins*, 2(1), 54-68. <https://doi.org/10.3390/toxins2010054>
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919-3931.
- Li, J., Koh, J.-J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00073>
- Li, S., Wang, Y., Xue, Z., Jia, Y., Li, R., He, C., & Chen, H. (2021). The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.005>
- Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022). Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules*, 27(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>
- Li, Y., Gao, X., Pan, D., Liu, Z., Xiao, C., Xiong, Y., Du, L., Cai, Z., Lu, W., Dang, Y., & Zhu, X. (2023). Identification and virtual screening of novel anti-inflammatory peptides from broccoli fermented by *Lactobacillus* strains. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1118900. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1118900>
- Liu, N., Parra, H. A., Pustjens, A., Hettinga, K., Mongondry, P., & van Ruth, S. M. (2018). Evaluation of portable near-infrared spectroscopy for organic milk authentication. *Talanta*, 184, 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.097>
- Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12(5), 315-330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- López-Aguilar, R., Zuleta-Prada, H., Hernández-Montes, A., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Comparative NMR Metabolomics Profiling between Mexican Ancestral & Artisanal Mezcals and Industrialized Wines to Discriminate

- Geographical Origins, Agave Species or Grape Varieties and Manufacturing Processes as a Function of Their Quality Attributes. *Foods*, 10(1), 157. <https://doi.org/10.3390/foods10010157>
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L., & Recio, I. (2006). Identification of antibacterial peptides from bovine kappa-casein. *Journal of Food Protection*, 69(12), 2992-2997. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.12.2992>
- Lu, H., Jiang, H., & Chen, Q. (2021). Determination of Fatty Acid Content of Rice during Storage Based on Feature Fusion of Olfactory Visualization Sensor Data and Near-Infrared Spectra. *Sensors*, 21(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/s21093266>
- Mares-Mares, E., Barboza-Corona, J. E., Sosa-Morales, M. E., Gutiérrez-Chávez, A. J., Gutiérrez-Vargas, S., & León-Galván, M. F. (2019). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by enzymatic hydrolysates derived from primary and secondary whey of fresh and Oaxaca cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4), 626-632. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12623>
- Marino, M., Dubsky de Wittenau, G., Saccà, E., Cattonaro, F., Spadotto, A., Innocente, N., Radovic, S., Piasentier, E., & Marroni, F. (2019). Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, 79, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.007>
- Marilley, L. (2004). Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 139-159. [https://doi.org/10.1016/S01681605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S01681605(03)00304-0)
- Markusková, B., Minarovičová, J., Véghová, A., Drahovská, H., & Kaclíková, E. (2021). Impact of DNA extraction methods on 16S rRNA-based profiling of bacterial communities in cheese. *Journal of Microbiological Methods*, 184, 106210. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106210>
- Matijašić, B. B., Oberčkal, J., Mohar Lorbeg, P., Paveljšek, D., Skale, N., Kolenc, B., Gruden, Š., Poklar Ulrih, N., Kete, M., & Zupančič Justin, M. (2020). Characterisation of Lactoferrin Isolated from Acid Whey Using Pilot-Scale Monolithic Ion-Exchange Chromatography. *Processes*, 8(7), 804. <https://doi.org/10.3390/pr8070804>
- Mayorga-Ramos, A., Zúñiga-Miranda, J., Carrera-Pacheco, S. E., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2023). CRISPR-Cas-Based Antimicrobials: Design, Challenges, and Bacterial Mechanisms of Resistance. *ACS Infectious Diseases*, 9(7), 1283-1302. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00649>
- Mazzei, P., & Piccolo, A. (2012). 1H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132(3), 1620-1627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.142>
- McHugh, A. J., Feehily, C., Fenelon, M. A., Gleeson, D., Hill, C., & Cotter, P. D. (2020). Tracking the Dairy Microbiota from Farm Bulk Tank to Skimmed Milk Powder. *mSystems*, 5(2), 10.1128/msystems.00226-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.00226-20>

- McSweeney, P. L. H. (Ed.). (2007). Pathogens and food poisoning bacteria. En *Cheese Problems Solved* (pp. 133-151). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.133>
- Méndez-Romero, J. I., Reyes-Díaz, R., Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Sayago-Ayerdi, S. G., Gómez-Gil, B., & González-Córdova, A. F. (2021). Artisanal Fresco cheese from Sonora: Physicochemical composition, microbial quality, and bacterial characterization by high-throughput sequencing. *International Journal of Dairy Technology*, 74(2), 359-370. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12751>
- Mohamed, H. M., Barzideh, Z., Siddiqi, M., & LaPointe, G. (2023). Taxonomy, Sequence Variance and Functional Profiling of the Microbial Community of Long-Ripened Cheddar Cheese Using Shotgun Metagenomics. *Microorganisms*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082052>
- Murugesan, S., Reyes-Mata, M. P., Nirmalkar, K., Chavez-Carbajal, A., Juárez-Hernández, J. I., Torres-Gómez, R. E., Piña-Escobedo, A., Maya, O., Hoyo-Vadillo, C., Ramos-Ramírez, E. G., Salazar-Montoya, J. A., & García-Mena, J. (2018). Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Research International*, 113, 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.023>
- Nan, Y. H., Park, K. H., Jeon, Y. J., Park, Y., Park, I.-S., & Shin, K.-S. H. and S. Y. (2007, septiembre 30). *Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities of a Leu/Lys-Rich Antimicrobial Peptide with Phe-Peptoid Residues*. Protein & Peptide Letters. <https://www.eurekaselect.com/81893/article>
- Nan, Y. H., Park, K. H., Park, Y., Jeon, Y. J., Kim, Y., Park, I.-S., Hahm, K.-S., & Shin, S. Y. (2009). Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin. *FEMS Microbiology Letters*, 292(1), 134-140. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01484.x>
- Navgire, G. S., Goel, N., Sawhney, G., Sharma, M., Kaushik, P., Mohanta, Y. K., Mohanta, T. K., & Al-Harrasi, A. (2022). Analysis and Interpretation of metagenomics data: An approach. *Biological Procedures Online*, 24(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12575-022-00179-7>
- Nguyen Thi, P., Dupas, C., Adt, I., Degraeve, P., Ragon, M., Missaoui, M.-F., Novelli, E., Segato, S., Phan The, D., & Oulahal, N. (2014). Partial characterisation of peptides inhibiting *Listeria* growth in two Alpine cheeses. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 61-72. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0141-6>
- Nieto-Ortega, S., Olabarrieta, I., Saitua, E., Arana, G., Foti, G., & Melado-Herreros, Á. (2022). Improvement of Oil Valorization Extracted from Fish By-Products Using a Handheld near Infrared Spectrometer Coupled with Chemometrics. *Foods*, 11(8), 1092. <https://doi.org/10.3390/foods11081092>
- Oh, J.-H., Vinay-Lara, E., McMinn, R., Glass, K. A., Johnson, M. E., & Steele, J. L. (2014). Evaluation of NaCl, pH, and lactic acid on the growth of Shiga

- toxin-producing *Escherichia coli* in a liquid Cheddar cheese extract. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6671-6679. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7946>
- Onywera, H., & Meiring, T. L. (2020). Comparative analyses of Ion Torrent V4 and Illumina V3-V4 16S rRNA gene metabarcoding methods for characterization of cervical microbiota: Taxonomic and functional profiling. *Scientific African*, 7, e00278. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00278>
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2017). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38, 674-682. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.11917>
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2021). Effect of ripening time on peptide dynamics and bioactive peptide composition in Tulum cheese. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 3832-3852. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19494>
- Öztürk, H. İ., Konak Göktepe, Ç., & Akin, N. (2021). Proteolysis pattern and functional peptides in artisanal Tulum cheeses produced from Mut province in Turkey. *LWT*, 149, 111642. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111642>
- Papademas, P., Aspri, M., Mariou, M., Dowd, S. E., Kazou, M., & Tsakalidou, E. (2019). Conventional and omics approaches shed light on Halitzia cheese, a long-forgotten white-brined cheese from Cyprus. *International Dairy Journal*, 98, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.010>
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Georgalaki, M., Bounenni, R., Paximadaki, A., Charmpi, C., Alexandraki, V., Kazou, M., & Tsakalidou, E. (2022). Comparison of the Microbiome of Artisanal Homemade and Industrial Feta Cheese through Amplicon Sequencing and Shotgun Metagenomics. *Microorganisms*, 10(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051073>
- Parrini, S., Sirtori, F., Čandek-Potokar, M., Charneca, R., Crovetto, A., Kušec, I. D., Sanchez, E. G., Cebrian, M. M. I., Garcia, A. H., Karolyi, D., Lebret, B., Ortiz, A., Panella-Riera, N., Petig, M., Jesus da Costa Pires, P., Tejerina, D., Razmaite, V., Aquilani, C., & Bozzi, R. (2023). Prediction of fatty acid composition in intact and minced fat of European autochthonous pigs breeds by near infrared spectroscopy. *Scientific Reports*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34996-x>
- Pfister, A. S., & Köhl, M. (2018). Chapter Four—Of Wnts and Ribosomes. En J. Larraín & G. Olivares (Eds.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 153, pp. 131-155). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.006>
- Pomyen, Y., Wanichthanarak, K., Pongsombat, P., Fahrman, J., Grapov, D., & Khomrung, S. (2020). Deep metabolome: Applications of deep learning in metabolomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2818-2825. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.033>
- Porras-Alfaro, A., Liu, K.-L., Kuske, C. R., & Xie, G. (2014). From Genus to Phylum: Large-Subunit and Internal Transcribed Spacer rRNA Operon Regions Show Similar Classification Accuracies Influenced by Database Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 829-840. <https://doi.org/10.1128/AEM.02894-13>

- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545-1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Punia Bangar, S., Suri, S., Trif, M., & Ozogul, F. (2022). Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Bioscience*, 46, 101615. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615>
- Qian, F., Wang, Y., Wen, Z., Jiang, S., Tuo, Y., & Mu, G. (2018). Plastein reaction enhanced bile-acid binding capacity of soybean protein hydrolysates and whey protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 1021-1027. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3015-8>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. p., Paul Ross, R., Fitzgerald, G. f., & Cotter, P. d. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 96-105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x>
- Quijada, N. M., Schmitz-Esser, S., Zwirzitz, B., Guse, C., Strachan, C. R., Wagner, M., Wetzels, S. U., Selberherr, E., & Dzieciol, M. (2020). Austrian Raw-Milk Hard-Cheese Ripening Involves Successional Dynamics of Non-Inoculated Bacteria and Fungi. *Foods*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods9121851>
- Rafiq, S., Huma, N., Rakariyatham, K., Hussain, I., Gulzar, N., & Hayat, I. (2018). Anti-inflammatory and anticancer activities of water-soluble peptide extracts of buffalo and cow milk Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 432-438. Scopus. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12483>
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., & Kövics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3381-3394. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5>
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V., & Carvalho, I. S. (2017). Internal Transcribed sequence (ITS) of *Halocafeteria seosinensis* (Bicosoecids). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(3), 266-268. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.04.009>
- Rendon-Rosales, M. Á., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Mazorra-Manzano, M. A., & Vallejo-Cordoba, B. (2019). In Vitro Antithrombotic and Hypocholesterolemic Activities of Milk Fermented with Specific Strains of *Lactococcus lactis*. *Nutrients*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/nu11092150>
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348-2360. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72913-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1)
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.

- Romero-Castillo, P. A., Leyva-Ruelas, G., & Cruz-Castillo, J. G. (2009). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SANITARIA DE QUESOS CREMA TROPICAL MEXICANO DE LA REGIÓN DE TONALÁ, CHIAPAS*. 8(1), 9.
- Ruvalcaba-Gómez, J. M., Delgado-Macuil, R. J., Zelaya-Molina, L. X., Maya-Lucas, O., Ruesga-Gutiérrez, E., Anaya-Esparza, L. M., Villagrán-de la Mora, Z., López-de la Mora, D. A., & Arteaga-Garibay, R. I. (2020). Bacterial Succession through the Artisanal Process and Seasonal Effects Defining Bacterial Communities of Raw-Milk Adobera Cheese Revealed by High Throughput DNA Sequencing. *Microorganisms*, 9(1), 24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010024>
- Sabater, C., Cobo-Díaz, J. F., Álvarez-Ordóñez, A., Ruas-Madiedo, P., Ruiz, L., & Margolles, A. (2021). Novel methods of microbiome analysis in the food industry. *International Microbiology*, 24(4), 593-605. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00215-8>
- SAGARPA, 2013. La tradición no se vende, se hereda y se conserva REGLAS DE USO. Marca Colectiva QUESO CREMA DE CHIAPAS - PDF Free Download. Recuperado 26 de enero de 2024, de <https://docplayer.es/29387300-Chiapas-centenario-la-tradicion-no-se-vende-se-hereda-y-se-conserva-reglas-de-uso-marca-colectiva-queso-crema-de-chiapas.html>
- Sajali, N., Wong, S. C., Hanapi, U. K., Abu Bakar @ Jamaluddin, S., Tasrip, N. A., & Mohd Desa, M. N. (2018). The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: A Review. *Journal of Food Science*, 83(10), 2409-2414. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14338>
- Scano, P., Anedda, R., Melis, M. P., Dessì, M. A., Lai, A., & Roggio, T. (2011). ¹H- and ¹³C-NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(9), 1305-1316. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1797-9>
- Segato, S., Caligiani, A., Contiero, B., Galaverna, G., Bisutti, V., & Cozzi, G. (2019). ¹H NMR Metabolic Profile to Discriminate Pasture Based Alpine Asiago PDO Cheeses. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/ani9100722>
- Serhan, C., & Savill, J. (2006). Serhan CN, Savill J Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nat Immunol* 6:1191-1197. *Nature immunology*, 6, 1191-1197. <https://doi.org/10.1038/ni1276>
- Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H., & Iwan, M. (2009). Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal*, 19(4), 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.011>
- Silva, D., Lima, M., Silva, M., Silva, G., Campos, J., Albuquerque, W., Cavalcanti, M., & Porto, A. (2019). Bioactive water-soluble peptides from fresh buffalo cheese may be used as product markers. *LWT*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.035>
- Silva, R. A., Bezerra, V. S., Pimentel, M. do C. B., Porto, A. L. F., Cavalcanti, M. T. H., & Filho, J. L. L. (2016). Proteomic and peptidomic profiling of

- Brazilian artisanal «Coalho» cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4337-4344.
- Solov'eva, T. F., Bakholdina, S. I., & Naberezhnykh, G. A. (2023). Host Defense Proteins and Peptides with Lipopolysaccharide-Binding Activity from Marine Invertebrates and Their Therapeutic Potential in Gram-Negative Sepsis. *Marine Drugs*, 21(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/md21110581>
- Sørensen, K. M., van den Berg, F., & Engelsen, S. B. (2021). NIR Data Exploration and Regression by Chemometrics—A Primer. En Y. Ozaki, C. Huck, S. Tsuchikawa, & S. B. Engelsen (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Theory, Spectral Analysis, Instrumentation, and Applications* (pp. 127-189). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8648-4_7
- Spyrelli, E., Stamatiou, A., Tassou, C., Nychas, G.-J., & Doulgeraki, A. (2020). Microbiological and Metagenomic Analysis to Assess the Effect of Container Material on the Microbiota of Feta Cheese during Ripening. *Fermentation*, 6(1), 12. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010012>
- Srinivas, M., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Sinderen, D. van, & Kenny, J. G. (2022). The Application of Metagenomics to Study Microbial Communities and Develop Desirable Traits in Fermented Foods. *Foods*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203297>
- Strömstedt, A. A., Felth, J., & Bohlin, L. (2014). Bioassays in Natural Product Research – Strategies and Methods in the Search for Anti-inflammatory and Antimicrobial Activity. *Phytochemical Analysis*, 25(1), 13-28. <https://doi.org/10.1002/pca.2468>
- Sundekilde, U. K., Frederiksen, P. D., Clausen, M. R., Larsen, L. B., & Bertram, H. C. (2011). Relationship between the Metabolite Profile and Technological Properties of Bovine Milk from Two Dairy Breeds Elucidated by NMR-Based Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7360-7367. <https://doi.org/10.1021/jf202057x>
- Tadesse, S. A., & Emire, S. A. (2020). Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon*, 6(8), e04765. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04765>
- Tagliazucchi, D., Martini, S., & Solieri, L. (2019). Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Fermentation*, 5(4), 96. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040096>
- Tenore, G. C., Pagano, E., Lama, S., Vanacore, D., Di Maro, S., Maisto, M., Capasso, R., Merlino, F., Borrelli, F., Stiuso, P., & Novellino, E. (2019). Intestinal Anti-Inflammatory Effect of a Peptide Derived from Gastrointestinal Digestion of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Mozzarella Cheese. *Nutrients*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nu11030610>
- Théolier, J., Hammami, R., Fliss, I., & Jean, J. (2014). Antibacterial and antifungal activity of water-soluble extracts from Mozzarella, Gouda, Swiss, and Cheddar commercial cheeses produced in Canada. *Dairy Science & Technology*, 94(5), 427-438. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0170-9>

- Timón, M. L., Andrés, A. I., Otte, J., & Petró, M. J. (2019). Antioxidant peptides (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International*, 120, 643-649. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.019>
- Torres-Salas, V., Hernández-Rodríguez, B. E., Hernández-Montes, A., Castillo, E., Zuleta-Prada, H., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Solid-state NMR spectroscopy for disentangling structural and motional features of lyophilized ripened cheese water-soluble extracts related to antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 334, 127603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127603>
- Tuerkova, A., Kabelka, I., Králová, T., Sukeník, L., Pokorná, Š., Hof, M., & Vácha, R. (2020). Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation. *eLife*, 9, e47946. <https://doi.org/10.7554/eLife.47946>
- Turan, N., & Durak, M. Z. (2022). The functionality, bioavailability, and bioactive peptides in white cheeses produced in Turkey. *European Food Research and Technology*, 248(6), 1645-1652. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-03992-2>
- Vázquez-Leyva, S., Vallejo-Castillo, L., López-Morales, C. A., Herbert-Pucheta, J. E., Zepeda-Vallejo, L. G., Velasco-Velázquez, M., Pavón, L., Pérez-Tapia, S. M., & Medina-Rivero, E. (2019). Identity Profiling of Complex Mixtures of Peptide Products by Structural and Mass Mobility Orthogonal Analysis. *Analytical Chemistry*, 91(22), 14392-14400. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02873>
- Vermote, L., Vercé, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2018). Amplicon and shotgun metagenomic sequencing indicates that microbial ecosystems present in cheese brines reflect environmental inoculation during the cheese production process. *International Dairy Journal*, 87, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.010>
- Villegas de Gante, A., Moreno, A., & Cervantes-Escoto, F. (2016). Atlas de los quesos mexicanos genuinos. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/314205827_Atlas_de_los_Quesos_Mexicanos_Genuinos
- Watts, G. s., Youens-Clark, K., Slepian, M. j., Wolk, D. m., Oshiro, M. m., Metzger, G. s., Dhingra, D., Cranmer, L. d., & Hurwitz, B. I. (2017). 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: Accuracy for identification of clinically important bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1584-1596. <https://doi.org/10.1111/jam.13590>
- Webb, L., Ma, L., & Lu, X. (2022). Impact of lactic acid bacteria on the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Quality and Safety*, 6, fyac045. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyac045>
- Wilson, D., & Daly, N. L. (2018). Nuclear Magnetic Resonance seq (NMRseq): A New Approach to Peptide Sequence Tags. *Toxins*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/toxins10110437>
- Winter, M., Buckling, A., Harms, K., Johnsen, P. J., & Vos, M. (2021). Antimicrobial resistance acquisition via natural transformation: Context is everything. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.009>

- Yamaguchi, N., Kawaguchi, K., & Yamamoto, N. (2009). Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *European Journal of Pharmacology*, 620(1), 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.005>
- Yang, R.-H., Su, J.-H., Shang, J.-J., Wu, Y.-Y., Li, Y., Bao, D.-P., & Yao, Y.-J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE*, 13(10), e0206428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206428>
- Yasir, M., Alkhalidy, A. A., Soliman, S. A., Turkistani, S. A., & Azhar, E. I. (2023). Metagenomic Insights into the Microbiome and Resistance Genes of Traditional Fermented Foods in Arabia. *Foods*, 12(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/foods12183342>
- Zambrano-Cervantes, M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Rendón-Rosales, M. Á., Manzanarez-Quin, C. G., Torres-Llanez, M. J., & Vallejo-Cordoba, B. (2023). Fermented milks with specific *Lactobacillus* spp. With potential cardioprotective effects. *Journal of Food Science and Technology*, 60(6), 1749-1760. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05715-1>
- Zhang, H., Kovacs-Nolan, J., Kodera, T., Eto, Y., & Mine, Y. (2015). γ -Glutamyl cysteine and γ -glutamyl valine inhibit TNF- α signaling in intestinal epithelial cells and reduce inflammation in a mouse model of colitis via allosteric activation of the calcium-sensing receptor. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1852(5), 792-804. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.023>
- Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
- Zheng, H., Clausen, M., Dalsgaard, T., & Bertram, H. (2015). Metabolomics to Explore Impact of Dairy Intake. *Nutrients*, 7, 4875. <https://doi.org/10.3390/nu7064875>

3. CAMBIOS EN EL MICROBIOMA DEL QUESO CREMA DE CHIAPAS DURANTE LA MADURACIÓN.

3.1. Resumen

En México se producen diferentes quesos artesanales que forman parte de la cultura regional dentro del país. El queso Crema de Chiapas es un alimento artesanal elaborado con leche cruda de vaca. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de este queso mediante pruebas fisicoquímicas, microbiológicas e identificación de microorganismos durante tres tiempos de maduración (2, 29 y 58 d). Se utilizó la técnica de metagenómica de amplicones para conocer los microorganismos presentes, secuenciando las regiones 16S para bacterias e ITS para organismos eucariontes. Las características fisicoquímicas del queso analizado permanecieron constantes a lo largo del tiempo. Los géneros y especies de hongos presentaron variaciones, mientras que la diversidad y riqueza en bacterias disminuyó a lo largo del tiempo de acuerdo a los índices de Shannon y Simpson. Para hongos y levaduras la diversidad y riqueza de especies aumentó con el tiempo de maduración. Durante la maduración, los géneros más abundantes de bacterias fueron *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Los primeros dos géneros aumentaron a medida que avanzó el tiempo de maduración y *Lactobacillus* disminuyó. Las especies de hongos abundantes durante estos tres tiempos fueron *Candida versatilis*, *Candida etchellsii* y *Candida tropicalis*. La metagenómica dirigida permitió conocer la dinámica microbiana del queso a diferentes tiempos de maduración.

Palabras clave: queso, metagenómica, 16S, ITS, amplicones, maduración.

3. CHANGES IN THE MICROBIOME OF CHIAPAS CREAM CHEESE DURING RIPENING.

Abstract

In Mexico, different artisanal cheeses are produced that are part of the regional culture within the country. Crema de Chiapas cheese is an artisanal food made from raw cow's milk. The objective of this work was the characterization of this cheese by means of physicochemical and microbiological tests and identification of microorganisms during three ripening times (2, 29 and 58 d). The amplicon metagenomics technique was used to identify the microorganisms present, sequencing the 16S regions for bacteria and ITS for eukaryotic organisms. The physicochemical characteristics of the cheese analyzed remained constant over time, while there were variations in fungal genera and species. Microbial diversity and richness decreased over time in bacteria according to the Shannon and Simpson indices. For fungi and yeasts, the diversity and species richness of fungi and yeasts increased with ripening time. During ripening the most abundant genera of bacteria were *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Lactococcus*. The genera *Streptococcus* and *Lactococcus* increased as ripening time progressed and *Lactobacillus* decreased. Abundant fungal species were also identified during these three times, *Candida versatilis*, *Candida etchellsii* and *Candida tropicalis*. *Candida versatilis* is variable with maturation, *Candida etchellsii* decreases; and *Candida tropicalis* increases with maturation time. Targeted metagenomics provided insight into the microbial dynamics of cheese at different ripening times.

Key words: cheese, metagenomics, 16S, ITS, amplicons, maturation.

3.3. Introducción

En México se producen diversos quesos artesanales, entre los que se encuentra el queso Crema de Chiapas, que tiene una apariencia húmeda, sabor ácido, adhesivo, gomoso y con poca firmeza (Villegas et al., 2016). Este queso se elabora con leche cruda de vaca. El diagrama de proceso involucra las siguientes operaciones: recepción de la leche, adición de cuajo enzimático, reposo de la cuajada, cortado y reposo, amasado, salado, moldeado y prensado en piezas rectangulares y empackado con tres materiales diferentes (plástico, papel aluminio y celofán) dispuestos en capas (González-Córdova et al., 2016) y se recomienda que se consuma después de tres días de su elaboración (SAGARPA, 2013). La textura seca y desmoronable del queso Crema de Chiapas se debe a que la cuajada tiene un pH de 4.5 que favorece la expulsión de suero originando quesos más secos. El queso se fractura debido a que el fosfato de calcio de las micelas de caseína se solubiliza y se pierde en el suero (Powell et al., 2011).

La inocuidad de los quesos artesanales al realizarse con leche sin pasteurizar siempre ha sido una preocupación. Las bacterias patógenas más ampliamente reportadas en quesos artesanales son: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Brucella* spp. (Rangel-Ortega et al., 2023). En queso fresco de Sonora y queso Poro de Tabasco se reportaron las bacterias *E. coli* y *Staphylococcus aereus* (Méndez-Romero et al., 2021; De la Rosa-Alcaraz et al., 2020). En queso Bola de Ocosingo y en queso Oaxaca se identificaron a *Escherichia* spp y *Shigella* spp. (Aldrete-Tapia et al., 2018) Murugesan et al., 2018). En queso Crema de Chiapas se han encontrado bacterias tipo *E. coli* y *Salmonella* spp. (Romero-Castillo et al., 2009). Otros géneros también han sido reportados en quesos artesanales mexicanos como *Pseudomonas*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Vibrio* y *Klebsiella*. Es importante destacar que la presencia de bacterias patógenas no se encuentra solo en quesos mexicanos, pues en quesos de otros países también se han reportado algunos de estos géneros (Yoon et al., 2016). Sin embargo, los estudios antes mencionados se llevaron a cabo en quesos con diferentes etapas de elaboración (De la Rosa-Alcaraz et al., 2020).

Particularmente, en el queso Bola de Ocosingo (Chiapas, México) que es un queso madurado, la contaminación reportada se atribuyó a prácticas de elaboración inadecuadas; ya que la maduración del queso, inhibe el crecimiento de bacterias patógenas (Oh et al., 2014; Rios et al., 2020), debido a que las bacterias ácido lácticas (BAL) producen ácidos orgánicos, bacteriocinas y otros compuestos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y reuterina (Thierry et al., 2015; Ibrahim et al., 2021).

La secuenciación de amplicones es frecuentemente usada para la identificación de microorganismos y se basa en la secuenciación del gen 16S para bacterias o los espaciadores transcritos internos (ITS) para hongos y levaduras. El ribosoma bacteriano 70S se compone de la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S), en esta última se encuentra el ARNr 16S (Rodicio & Mendoza, 2004), que tiene una longitud de ~1500 pb y comprende nueve regiones (Johnson et al., 2019). Para la identificación de bacterias en queso Robiola di Roccaverano (Biolcati et al., 2020) y quesos artesanales blandos (Erhardt et al., 2023) se utilizaron las regiones variables V3-V4 (Biolcati et al., 2020), en queso Raclette du Valais se usaron las regiones variables V1-V2 (Dreier et al., 2022), en queso Minas Frescal (Abreu et al., 2021) y quesos Cheddar, Provolone y queso Suizo la región V4 (Choi et al., 2020). El uso de una u otra región variable es diferente en cada investigación, pero el uso de regiones largas da una mayor cantidad de información (Onywera y Meiring, 2020).

Los ribosomas 80S de eucariontes se componen de la subunidad grande 60S donde se encuentran los ARNr 25S/28S, 5.8S y 5S, (Kressler et al., 2017); mientras que en la subunidad pequeña 40S se encuentra el ARNr 18S; ambos grupos asociados con proteínas altamente específicas conformando las subunidades (Nazar, 2003). El ITS1 en el cromosoma se ubica entre el gen de ARNr 18S y 5.8S; y el ITS2 se localiza entre el gen de ARNr 5.8S y 28S (Pfister & Kühl, 2018). La región ITS para hongos y levaduras tiene (~600 pb) de largo y si se combina con el gen 26S (región D1/D2) se obtienen hasta 1100 pb (Macrogene, 2024). El gen 26S ofrece una alta cobertura y una asignación taxonómica precisa de amplicones fúngicos cortos (~400

pb) (Mota-Gutierrez et al., 2019). En queso Taleggio (Giannino et al., 2011) y yogur griego (Sulaiman et al., 2014) se utilizó la región ITS1, en queso tipo Cantal se amplificó la región ITS2 de una longitud de ~350 pb (Frétin et al., 2022), en queso, vino y carne fermentada el ITS2 fue el más adecuado comparado con ITS1 (Rué et al., 2023), y en queso y yogur se secuenció la zona ITS de la subunidad grande del ribosoma nuclear (Buehler et al., 2017) y en queso y yogur se secuenciaron los dominios D1/D2 de la zona (26S) de la subunidad grande del ribosoma nuclear (Buehler et al., 2017).

En quesos mexicanos se ha realizado metagenómica en queso Cotija (Escobar-Zepeda et al., 2016), queso fresco de Sonora (Méndez et al., 2021), queso Bola de Ocosingo (Aldrete-Tapia et al., 2018), en los quesos, Adobera, Panela, Jocoque, Doble Crema, Ranchero, Zacatecas, Chihuahua, Cincho, Oaxaca, Canasta, Asadero y queso tipo Manchego (Murugesan et al., 2018). Sin embargo, aunque se hayan realizado estudios similares, la presencia de microorganismos es diferente entre cada uno de los quesos y esto depende de factores como: características fisicoquímicas del queso, el ambiente, condiciones de ordeña, alimentación del ganado, proceso de fabricación, condiciones de almacenamiento, entre otros (Gobbetti et al., 2018). En el presente trabajo se realizó la identificación molecular de bacterias y hongos del queso Crema de Chiapas, a través del análisis de metagenómica de amplicones, con la finalidad de registrar los cambios en las poblaciones microbianas durante la maduración del queso.

3.4. Materiales y metodología

3.4.1. Obtención de muestras de queso Crema de Chiapas

Los quesos se elaboraron a partir de leche cruda y se colectaron tres piezas de queso de cada uno de los tres lotes elaborados en días consecutivos, cada lote de queso se dejó madurar por diferentes tiempos T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d, con tres repeticiones cada uno (un queso se consideró una unidad experimental) las muestras se obtuvieron de la quesería San Juan localizada a 15° 43' 39.9354" latitud norte y -93° 15' 45.4314" latitud oeste en el municipio de Pijijiapan, Chiapas, México. Las muestras fueron transportadas vía terrestre (12 h) a temperatura ambiente al

laboratorio de Lácteos de la Universidad Autónoma Chapingo y almacenadas a los tiempos correspondientes a 22 °C.

3.4.2. Análisis fisicoquímico de queso Crema de Chiapas

En el análisis fisicoquímico se consideró la determinación de proteína, grasa, sólidos totales y NaCl utilizando el equipo FoodScan™ Lab (FOSS Analytical AB, Hillerød, Dinamarca). Las variables de humedad (Wilster et al., 1940) y ceniza (Zajác et al., 2023) fueron determinadas por método gravimétrico. Por otro lado, para la determinación de actividad de agua (a_w) se utilizó el instrumento AQUA LAB (Decagon Devices, Pullman, WA) (Öztürk y Akın, 2018). Para medir el pH se utilizaron 10 g de queso considerando el método descrito por Altahir et al. (2014) y con el potenciómetro Conductronic PH120 (Puebla, México). La determinación de carbohidratos (CHO'S) se realizó por diferencia utilizando la siguiente Ecuación (1), como lo describe Tamime et al., (1999): $\text{CHO'S (\%)} = \text{Sólidos totales (ST \%)} - (\text{grasa \%} + \text{proteína \%} + \text{ceniza \%})$ Ecuación (1).

3.4.3. Análisis microbiológico

Para los análisis microbiológicos se utilizaron seis bloques de queso ($n=6$) de tres lotes diferentes, dos repeticiones de cada uno, de donde se tomó una porción de 10 g del interior de cada bloque (Vasek et al., 2008) y se homogenizó con 90 mL de agua peptona estéril al 0.1 % (Campos et al., 2020). El conteo de bacterias mesófilas aerobias se realizó de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994. Para la determinación de hongos y levaduras se siguió la NOM-111-SSA1-1994, la siembra en cultivo se realizó en medio Agar Papa Dextrosa (por sus siglas en inglés PDA) a una temperatura de incubación de 25 ± 1 °C por un periodo de 5 días. Por otro lado, las bacterias coliformes totales se cuantificaron usando la NOM-113-SSA1-1994, se cultivaron en medio agar rojo violeta bilis lactosa (por sus siglas en inglés RVBA) en placas y se incubaron durante 24 ± 2 h a 35 °C.

3.4.4. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de seis quesos como se indicó en la sección 3.4.3. Posteriormente, las extracciones de dos quesos que pertenecían al mismo tiempo fueron mezcladas. Cada uno de los quesos se colocó en un mortero y se agregó nitrógeno líquido. Este

se molió hasta obtener partículas muy finas cuidando que la muestra no se calentara. A continuación, se pesaron 0.1g de queso y se siguió el protocolo de extracción del kit de minipreparación de ADN ZymoBIOMICS (California, EE. UU.). Los pasos para la extracción fueron, lisado de los microorganismos contenidos en el queso mediante el uso de proteinasa K, perlas y solución de lisis; el ADN fue precipitado y quedó en el tubo Zymo-SpinTMIII F; el ADN se lavó con los buffers 1 y 2; enseguida se resuspendió en buffer; en una tercera columna Zymo-SpinTMIII-HCR el ADN fue purificado. Se colocó una alícuota de 2µL de ADN y se midió la absorbancia con un nanoDrop UVS-99 (Avans Biotechnology, Taipei, Taiwán, China) a 260 nm para determinar la pureza e integridad del ADN.

3.5. Análisis estadístico

3.5.1. Análisis estadístico fisicoquímico y microbiológico

Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov utilizando el programa NCSS 2007 (NCSS LLC, Kaysville, Utah, USA), para las variables pH, a_w , humedad, proteína, grasa, ceniza, sal, ST, CHO'S, conteos de mesófilos y de hongos y levaduras en tres tiempos de maduración. Para los datos que mostraron tener una distribución normal, se utilizó el análisis de varianza aplicando un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un $\alpha = 0.05$. La comparación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de 0.05 en el programa estadístico MINITAB 2017 (Minitab, LLC, Pine Hall Road, PA, USA). Por otro lado, cuando los datos no tuvieron una distribución normal, se utilizó la prueba estadística de Kruskal Wallis (Xia, 2020). La comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner con un nivel de significancia de 0.05, los datos se analizaron en el programa estadístico XL-STAT 2019 (XL-STAT, LLC, Rue Damrémont, Paris, Francia).

3.5.2. Análisis bioinformático de metagenómica

Se utilizó la secuenciación de amplicones ocupando las regiones V3 y V4 del gen 16S en la identificación de bacterias e ITS1- ITS2 para hongos y levaduras. La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina. La verificación de la calidad de las secuencias se llevó a cabo utilizando MultiFastQC de la Comunidad Galaxy (The

Galaxy Community, 2022) Por otra parte, la eliminación de adaptadores se realizó con la herramienta trimmomatic.

El programa Flash v1.2.11(<https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) se utilizó para unir las secuencias pareadas de los amplicones; posteriormente se eliminaron las secuencias repetidas y quiméricas utilizando el programa vsearch (<https://github.com/torognes/vsearch>); se realizó la clasificación de perfiles taxonómicos utilizando el programa Parallel-Meta Suite versión 3.7 (<http://bioinfo.single-cell.cn/parallel-meta.html>) utilizando la base de datos Greengenes. Finalmente, se utilizaron scripts de perl y R para generar las gráficas de abundancia relativa (AR); se calcularon los índices de Shannon, Simpson y Chao1 y se construyeron los diagramas de Venn.

3.6. Resultados y discusión

3.6.1. Análisis fisicoquímico del queso Crema de Chiapas

Las variables pH, a_w , proteína (%), sal (%), ST (%), CHO'S (%) y los conteos de mesófilos en los diferentes tiempos de maduración presentaron una distribución normal (datos no mostrados). Por otro lado, las variables humedad, grasa, ceniza, conteo de hongos y levadura tuvieron una distribución no normal (datos no mostrados).

Los resultados del análisis estadístico se muestran en el Cuadro 5. En las muestras analizadas, el pH no tuvo diferencia estadística significativa durante la maduración y osciló en un rango de 3.53 a 3.6. Este comportamiento fue similar al reportado en queso Lighvan (Rashtchi et al., 2021), queso Gorgonzola (Moreira et al., 2019) y queso San Simón da Costa envasado al vacío (Franco et al., 2023). Esto se debe a que la velocidad de las reacciones de fermentación de la lactosa, proteólisis y lipólisis son las mismas, lo que neutraliza el pH (Rashtchi et al., 2021).

La a_w en el queso Crema analizado es constante a través del tiempo y es de 0.93, similar a lo reportado en queso Gouda envuelto en aluminio (Wemmenhove et al., 2016), queso San Simón da Costa envasado al vacío (Franco et al., 2023) y queso Gouda (Álvarez Ramos et al., 2022). La a_w óptima para el crecimiento de la mayoría

de las bacterias en los alimentos es de 0.98 (Erkmen & Bozoglu, 2016). Esto se asocia con el comportamiento de la humedad, la cual no tuvo diferencia estadística significativa durante la maduración los valores oscilaron entre 33.36 a 34.56 % acorde con lo reportado por Hélias et al., (2007). La humedad obtenida cumple con el etiquetado y con la NOM-121-SSA1-1994 que menciona 58 % de humedad máxima. En queso semiduro madurado sumergido en aceite (Levak et al., 2023), queso San Simón da Costa madurado con y sin envasar al vacío (Franco et al., 2023) y queso Cheddar de vaca almacenado a 4°C (Batool et al., 2018) no hubo variación en la humedad a lo largo del tiempo de maduración.

En las muestras de queso analizadas se observó una disminución en tres variables: sólidos totales, proteína y sal (Cuadro 5). En queso Örgü (Celik & Turkoglu, 2007) y queso Feta griego (Tzora et al., 2021) disminuyeron la cantidad de sólidos totales y proteína con la maduración, mientras que en queso blanco turco decreció la proteína con la maduración (Bakirci et al., 2012). Los valores de proteína en las muestras de estudio disminuyeron de 27.81 a 22.87 % a lo largo del tiempo de maduración, esto debido a que las reacciones de degradación ocasionan disminución en el contenido de proteína y sólidos totales en queso (Celik & Turkoglu, 2007). Por otro lado, Prasad & Alvarez, (1999) reportaron que en queso Feta la sal disminuyó con la maduración y esto se atribuyó a la interacción entre la concentración de salmuera y el cuajo. Gandhi y Shah, (2016) encontraron en queso Akawi que la cantidad de sodio depende del lote.

La cantidad de grasa no mostró diferencia estadística a lo largo del tiempo de maduración, este comportamiento coincide con lo reportado en queso Tulum (Öztürk & Akin, 2021), queso San Simón da Costa envasado al vacío (Franco et al., 2023) y en queso de cabra debido a la disminución de la lipólisis ocasionada por la actividad lipolítica limitada de las BAL (Guizani et al., 2006).

Cuadro 5. Análisis fisicoquímico de queso Crema de Chiapas en diferentes etapas de maduración.

Variables	2 días	29 días	58 días
pH	3.6±0.00a ^Z	3.57±0.21a	3.53±0.06a
a_w	0.93±0.02a	0.93±0.02a	0.93±0.01a
Humedad(%)	34.56±0.90a	33.36±2.48a	33.98±0.9a
Proteína (%)	27.81±0.99a	25.7±0.38b	22.87±0.89c
Grasa (%)	36.01±0.52a	35.15±2.43a	36.9±0.85a
Ceniza (%)	3.54±9.90a	3.35±0.75a	3.58±0.08a
Sal (%)	2.73±0.24a	1.99±0.11b	1.91±0.29b
Sólidos totales (%)	69.26±1.90a	64.61±1.51b	64.61±1.51b
CHO´S (%)	1.91±1.28a	1.33±0.9a	1.91±0.29a

^Z Medias ± error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, p < 0.05).

3.6.2. Análisis microbiológico del queso Crema de Chiapas

En los quesos analizados en los tiempos T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d no se observó crecimiento de coliformes totales. En queso Chihuahua (Sánchez-Gamboa et al., 2018), queso Canastra (Campos et al., 2021) y queso Gouda (Park et al., 2019) se reportó que a medida que aumentó el tiempo de maduración disminuyeron los coliformes, debido a la presencia de antimicrobianos como bacteriocinas, ácidos orgánicos tales como, láctico, acético, fórmico, propiónico (Coelho et al., 2022), etanol, H₂O₂, etc. Adicionalmente a los cambios fisicoquímicos del queso, tal como la disminución de pH, a_w y humedad (Campagnollo et al., 2022; Sánchez-Gamboa et al., 2018).

En el conteo de bacterias mesófilas, no se observó diferencia estadística significativa en los tres tiempos de maduración del queso crema de Chiapas, los valores oscilaron entre 4.36 y 6.13 log₁₀ UFC g⁻¹(Figura 7). Este comportamiento coincide con lo reportado en queso Tulum (Hayaloglu et al., 2007), queso Gouda (Park et al., 2019), queso Tjaga (Criste et al., 2020) y corteza del queso Torta del Casar (Rodríguez-Pinilla et al., 2015). El grupo de microorganismos mesófilos aerobios no está contemplado en la NOM-243-SSA1-2010, si bien pudieran ser un indicador de malas prácticas de producción, en el grupo también se encuentran las BAL que son deseables en los productos lácteos (Romero-Castillo et al., 2009).

Igualmente, para hongos y levaduras no se observó diferencia significativa durante el proceso de maduración (Figura 7). La presencia de hongos en queso es controversial debido a que habitan en el aire y algunos producen toxinas; en queso Oaxaca industrial se han reportado como más abundantes la aflatoxina B1 y el aflatoxicol, provenientes de la harina de maíz adicionada a la masa para espesarla (Carvajal-Moreno et al., 2019; Kure & Skaar, 2019). Sin embargo, los hongos y levaduras participan en la proteólisis y lipólisis del queso contribuyendo a las propiedades sensoriales (Zheng et al., 2021). Otro factor importante a considerar es el ambiente durante el procesamiento o maduración, el cual favorece el crecimiento de determinadas especies de hongos (Kure & Skaar, 2019).

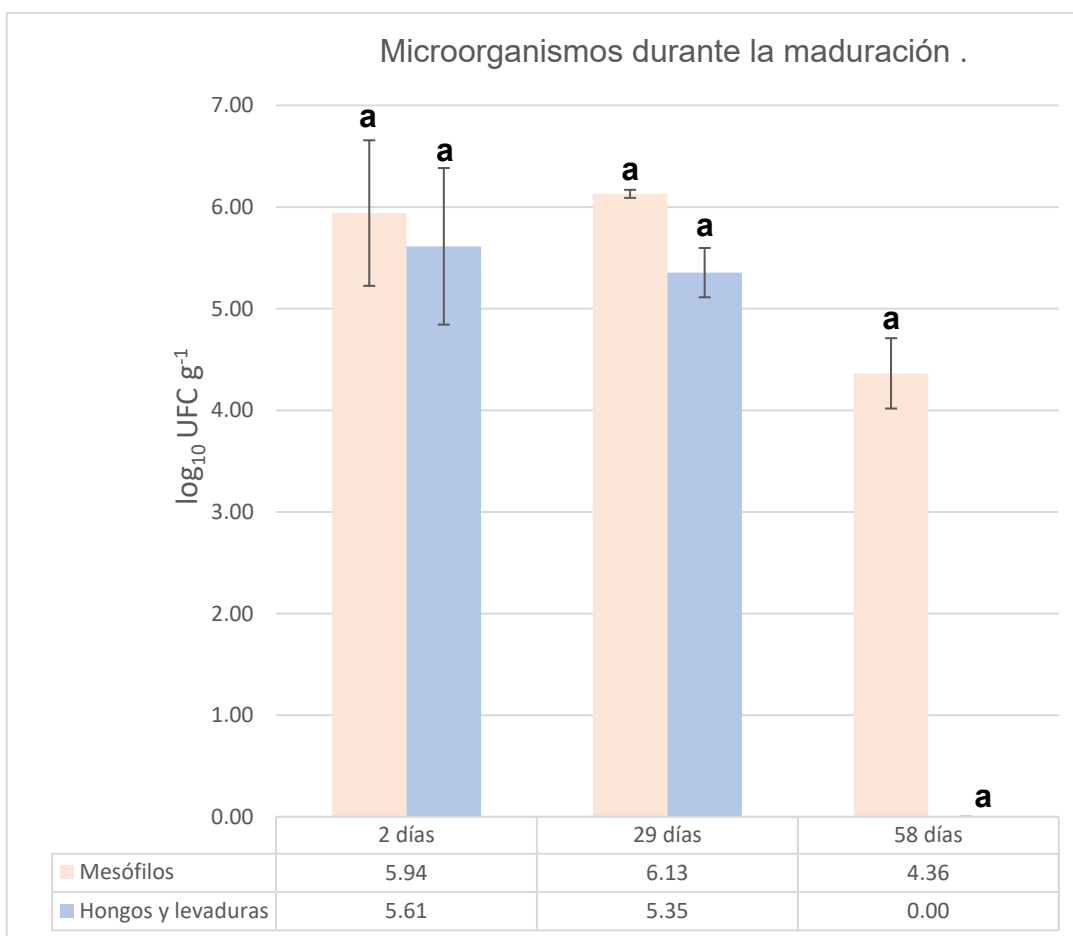


Figura 7. Conteo de bacterias mesófilas en queso Crema de Chiapas en tres tiempos de maduración (T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d). Letras iguales indican que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

3.6.3. Metagenómica

3.6.3.1. Dinámica bacteriana en queso Crema de Chiapas durante la maduración

En los quesos se observó que el tiempo de 2 d es el que presentó mayor riqueza y diversidad de especies, acorde con los valores de Shannon de 3.09 y Simpson de 0.93 (Figura 8). Para conocer la diversidad y riqueza de especies, en las muestras se utilizaron los índices de Chao1, Shannon y Simpson los cuales se calcularon en función de las especies y la abundancia de OTUs (Liu et al., 2020; Quijada et al., 2020), entre más altos fueron los índices, mayor fue la diversidad microbiana (Yin et al., 2019). Así mismo, se encontró que la diversidad y riqueza bacteriana de las muestras disminuyeron a lo largo del tiempo de maduración, de acuerdo a los índices de Shannon y Simpson, este comportamiento coincidió con lo reportado en queso Parmigiano Reggiano (Bottari et al., 2020). Además, los índices de Shannon y Simpson tuvieron una alta correlación, ya que se derivaron de la misma fórmula (Cazzolla Gatti et al., 2020). Por otro lado, la diversidad de bacterias se expresó por el índice Chao1 que aumentó con el tiempo de maduración alcanzando su valor más alto de 136.5 a los 58 d, este comportamiento fue similar en queso Cheddar canadiense (Barzideh et al., 2022).

Durante el tiempo de maduración del queso se identificaron siete géneros de bacterias en total. En el T1 = 2 d se encontraron cinco géneros de bacterias, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Lactococcus* y *Enterobacter*. Para el T2 = 29 d se identificaron cinco géneros que fueron: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Aeromonas* y *Chryseobacterium*. Finalmente, a los 58 d (T3) se reconocieron un total de seis géneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Aeromonas*, *Bifidobacterium* y *Chryseobacterium* (Figura 9). Los cambios en la abundancia de diferentes géneros de microorganismos durante la maduración del

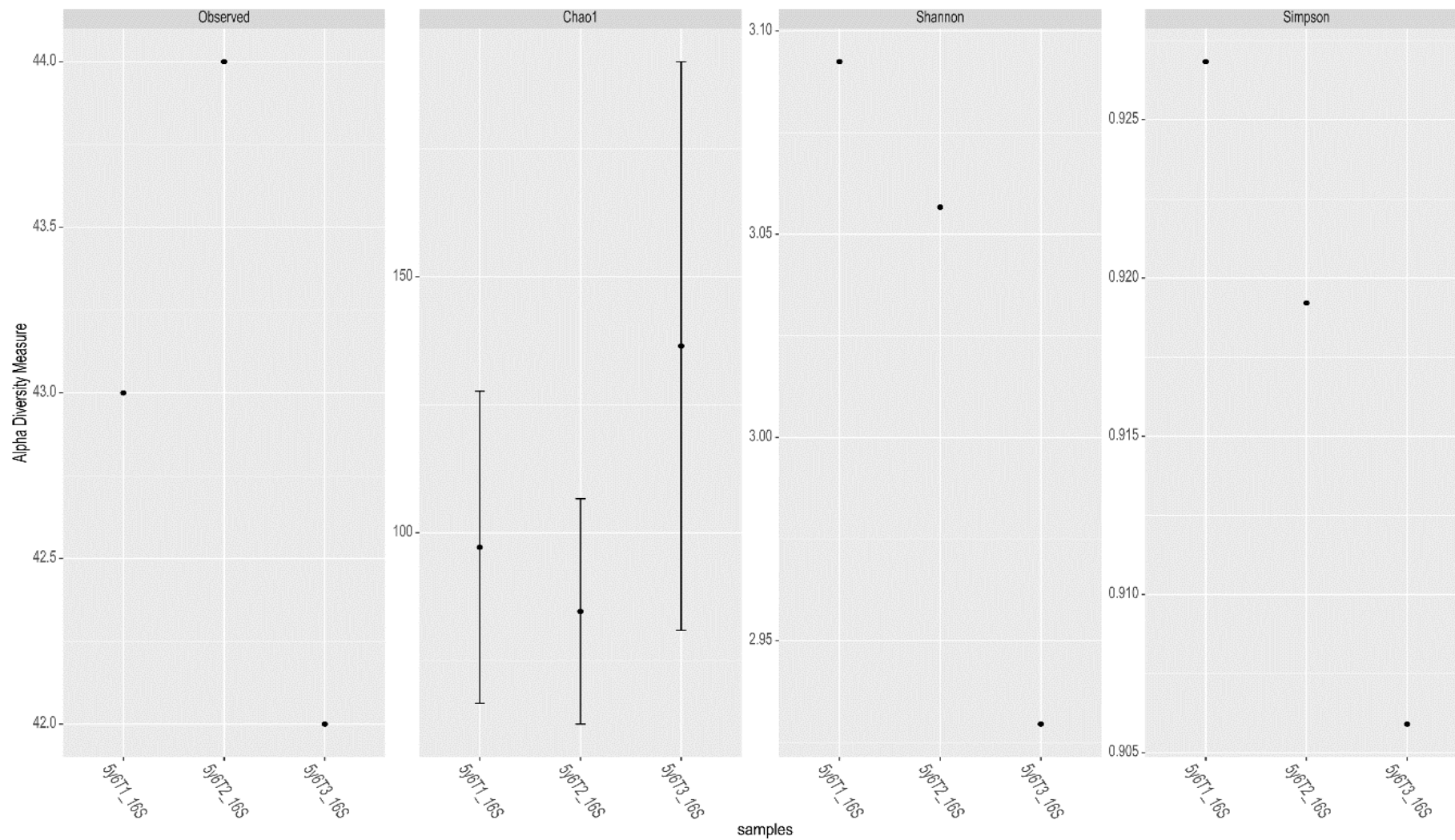


Figura 8. Gráfica de diversidad alfa con los índices de Chao1, Shannon y Simpson en tres tiempos de maduración (T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d) con el gen 16S

queso ha sido reportado para queso Feta (Spyrelli et al., 2020), queso Mineiro (Camargo et al., 2021) y queso verde búlgaro (Dimov et al., 2021); esto se relaciona con los cambios en la matriz alimentaria que promueven la selección de especies microbianas y con los factores ambientales que influyen en queso ha sido reportado para queso Feta (Spyrelli et al., 2020), queso Mineiro (Camargo et al., 2021) y queso verde búlgaro (Dimov et al., 2021); esto se relaciona con los cambios en la matriz alimentaria que promueven la selección de especies microbianas y con los factores ambientales que influyen en la dinámica microbiana durante la fabricación y maduración del queso (Aldrete-Tapia et al., 2014). En las muestras analizadas se observa que en el tiempo de 58 d los géneros aumentaron de cinco a seis, este incremento de géneros ha sido reportado en queso tipo holandés (Porcellato y Skeie, 2016).

El género más abundante en el queso Crema de Chiapas, en los diferentes tiempos de maduración, fue *Streptococcus*, seguido de *Lactobacillus* y luego *Lactococcus*. El primer género *Streptococcus* aumentó con el tiempo de maduración, este comportamiento fue similar a lo reportado en queso Tomme d'Orchies (Ceugniet et al., 2017) y queso de pasta hilada Caciocavallo Pugliese (De Pasquale et al., 2014). En queso Poro se reportaron los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* en suero, cuajada y queso con 7 y 60 d de maduración (Aldrete-Tapia et al., 2014). En el queso bola de Ocosingo se han encontrado especies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* que varían de acuerdo a la temporada (lluvias y secas) y a la quesería. Aldrete-Tapia et al., (2018), comentaron que la presencia de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular y asociaciones con el género *Lactobacillus* favorece el crecimiento de *Streptococcus* spp.

La dinámica bacteriana es compleja debido a que los microorganismos establecen interacciones entre ellos y tienen adaptaciones para resistir a la acidez como la modificación del exopolisacárido y para las condiciones de estrés osmótico y presencia de sales biliares modifican la proporción de ácidos grasos de la membrana (Gaucher et al., 2019). En el queso se observó que a medida que aumentó el género *Streptococcus* hubo una disminución en el género *Lactobacillus*.

Esto coincide con lo reportado en queso São Jorge (Coelho et al., 2023) y en quesos irlandeses y griegos (Kamilari et al., 2022). Por otra parte, se encontraron correlaciones negativas para los pares *Streptococcus-Enterococcus*, *Streptococcus-Lactococcus* y *Streptococcus-Lactobacillus*, en este último, el *Lactobacillus* metabolizó el nitrógeno que requería el *Streptococcus* (Aldrete-Tapia et al., 2018; Kamilari et al., 2022; Coelho et al., 2023).

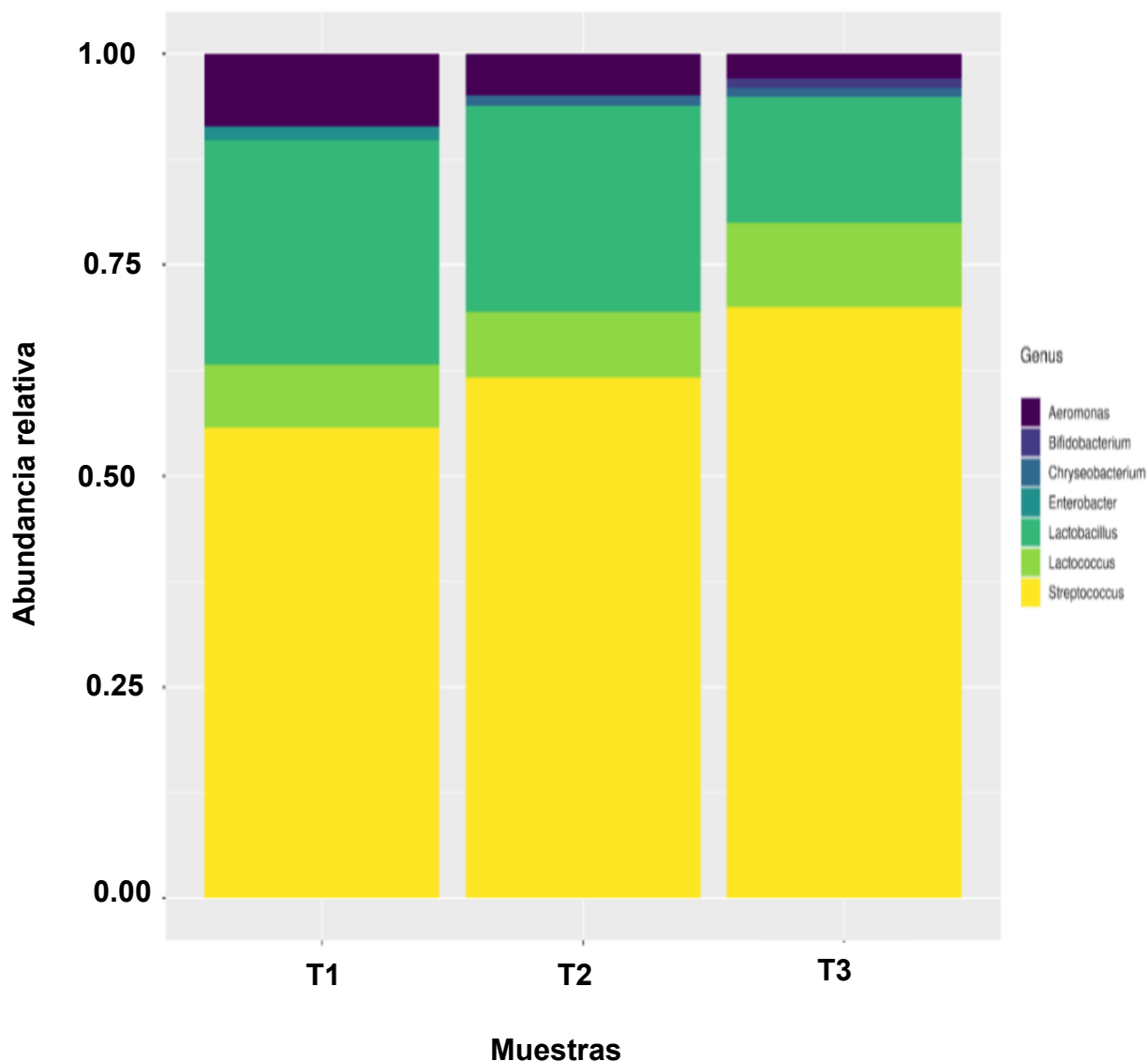


Figura 9. Abundancia relativa de bacterias en queso Crema de Chiapas durante la maduración (T1 = 2, T2 = 29 y T3 = 58 d).

En la Figura 9 se muestra que cuando se incrementó el género *Streptococcus*, disminuyó el género *Enterobacter*. La relación que existe entre estos dos géneros

de bacterias no se ha reportado hasta el momento, sin embargo, Tabla et al., (2016) encontraron que *Enterobacter* disminuye por la cantidad de ST, concentración de sal y temperatura de maduración. Otros investigadores reportaron el desconocimiento del mecanismo por el cual los *Streptococcus* inhiben el crecimiento de *Enterobacter* en queso, lo cual podría deberse a que los primeros pudieran producir bacteriocinas (Nes et al., 2007). Por otro lado, en *Streptococcus mutans* aislado de la boca se ha encontrado que inhibe a *Enterobacter* por la producción de mutanobactina que degrada la envoltura celular (Robertson & Willett, 2023).

En el queso Crema de Chiapas se descubrió al género *Lactobacillus* como el segundo más abundante y fue disminuyendo a lo largo del tiempo, este comportamiento coincide con lo reportado en queso Cantal (Frétin et al., 2022) y en queso Tulum (Cakmakci et al., 2008). La abundancia de cepas de *Lactobacillus* es diferente respecto al tiempo, como se mostró en queso Feta griego (Tzora et al., 2021) y queso Parmigiano Reggiano (Bottari et al., 2020).

El género *Lactococcus* fue el tercero más abundante, en el tiempo de 58 d tuvo una abundancia relativa (AR) de 0.25. Este comportamiento coincide con lo reportado en queso Gouda (Salazar et al., 2018), queso Feta (Spyrelli et al., 2020), se asocia a que cepas de *Lactococcus* pueden sobrevivir a un rango amplio de temperaturas entre 10 y 40 °C (Kondrotiene et al., 2024), tolerar concentraciones altas de sal (Kondrotiene et al., 2024) y su pH óptimo fue de 6.5 (Andersen et al., 2009). El queso Crema de Chiapas se almacenó a 22 °C lo que entra en el rango de temperatura donde crece y su cantidad de sal es de 2.73 %, lo cual favorece el crecimiento.

Los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* podrían contribuir a las propiedades sensoriales del queso Crema de Chiapas, a lo largo del proceso de maduración. Tal como ha sido reportado en queso Historic Rebel, en el cual se correlacionó positivamente *Lactobacillus* spp con 2-heptanol, *Lactococcus* con 3-hidroxi-2-butanona, *Streptococcus* con 1-hexanol (Turri et al., 2021). El 2-heptanol se asocia con notas de olor, terroso, dulce, afrutado, aceitoso, herbal (Santamarina-García et al., 2023) y especiado (Qian y Burbank, 2007), 3-hidroxi-2-butanona se

relaciona con un olor mantecoso (Carpino et al., 2004), las cetonas se han identificado como un olor etéreo y dulce con una nota picante (Turri et al., 2021) y 1-hexanol se asocia con aroma a vino, oleoso, floral y afrutado (Santamarina-García et al., 2023). En queso tipo Cantal se correlacionó *Lactococcus* spp. con acetona y *Lactobacillus* spp. con ésteres y alcoholes (Frétin et al., 2022), los ésteres y n-alcoholes se asocian a notas afrutadas (Arqués et al., 2007) y ésteres a notas dulces y florales (Ianni et al., 2020). En suero de queso Pelardon, el género *Lactococcus* se relacionó con la producción de ácido acético, ácido láctico y 3-hidroxibutanona (Marino et al., 2019). En queso Kazajo se correlacionó positivamente *Lactococcus* con acidez, amargor y umami; *Lactobacillus* con sabor salado y umami (Zhang et al., 2021).

En los quesos, adicionalmente se encontraron en menor AR los géneros *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Chryseobacterium* y *Bifidobacterium*. Las *Aeromonas* disminuyeron en la maduración del queso, lo cual concuerda con lo reportado en queso Paipa (Castellanos-Rozo et al., 2020). Las *Aeromonas* han sido identificadas en queso Panela, queso Adobera, queso Ranchero, Jocoque (Murugesan et al., 2018), queso fresco de Sonora (Méndez-Romero et al., 2021), leche cruda, queso egipcio (Hammad et al., 2018), yogur, verduras, carne y alimentos refrigerados (Durães-Carvalho et al., 2012). Algunas cepas de *Aeromonas* tienen genes de virulencia que necesitan combinarse "hemolisina" extracelular de *Aeromonas hydrophila* (ahh1) + aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (aerA)" y "enterotoxina citotóxica (alt) + enterotoxina termolábil citotóxica (act)" para ocasionar diarrea grave en humanos (Hammad et al., 2018). Sin embargo, estas bacterias pueden ser eliminadas con la pasteurización (Durães-Carvalho et al., 2012; Castellanos-Rozo et al., 2020).

El género *Enterobacter* se encontró en el primer tiempo de maduración y disminuyó durante el proceso de maduración del queso Crema. En quesos blandos y semiduros, de la familia *Enterobacteriaceae*, se descubrieron los géneros *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., y *Yersinia* spp., los cuales disminuyeron durante la maduración del queso (Tabla et al., 2016).

En los tiempos T2 = 29 y T3 = 58 d se encontró al género *Chyseobacterium*, el cual ha sido reportado en queso Idiazabal y fue asociado con la quesería en la que se elaboró el queso. La frescura de este queso ha sido correlacionada con la producción de compuestos volátiles 2-propen-1-ol se relaciona con notas de olor picante y a mostaza y butanoato de pentilo con notas de aroma afrutado, dulce, piña y plátano (Santamarina-García et al., 2023). El género *Chyseobacterium* se ha reportado frecuentemente en productos lácteos, leche cruda (Hugo et al., 2003), en queso Poro de Tabasco (Aldrete-Tapia et al., 2014), en queso Paipa (Castellanos-Rozo et al., 2020), en queso tipo Katiki (Pavlatou et al., 2023), en queso Saint-Nectaire (Delbès et al., 2007) y en queso Fontina (Giannino et al., 2009). El *Chyseobacterium*, por un lado, ha sido relacionado con el deterioro del queso y por otro lado, aporta propiedades sensoriales mediante su actividad proteolítica y/o lipolítica (Giannino et al., 2009).

Otro género importante encontrado en el tercer tiempo de maduración que equivale a aproximadamente tres meses fue *Bifidobacterium*, este comportamiento coincide con lo reportado en queso italiano (Secchi et al., 2023), queso Parmigiano Reggiano (Bottari et al., 2020) y en Queso "Tomme d'Orchies" (Ceugniet et al., 2017).

Para evaluar la distribución de las 213 OTUs obtenidas entre los diferentes tiempos de maduración, se construyó un diagrama de Venn (Figura 10). Los datos indicaron que 102 OTUs incluyeron el 48 % de las lecturas totales, las cuales fueron compartidas en los tres tiempos de maduración. El mayor número ($n = 28$) de OTUs únicas se ubicó en el tiempo de maduración de 58 d y el menor número ($n = 22$) de OTUs únicas se observó para el T1, este comportamiento en el T3 se podría relacionar con un menor contenido de NaCl, lo cual favoreció la presencia de bacterias que podrían afectar la calidad del alimento al generar compuestos desagradables (Tidona et al., 2022). En un queso modelo se reportó que la cantidad de cepas específicas de bacterias pueden aumentar o disminuir por la reducción del contenido de sal (Dugat-Bony et al., 2016). Sin embargo, en queso Crema de Chiapas los géneros de BAL tales como: *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* se encontraron en el T3. Los OTUS compartidos pueden brindar

información de posibles bacterias que pueden ser seleccionadas como cultivos iniciadores y también de bacterias patógenas que prevalecen a lo largo de la maduración. Sin embargo, las bacterias más específicas de cada tiempo contribuyen a las características únicas del queso en cada tiempo de maduración.

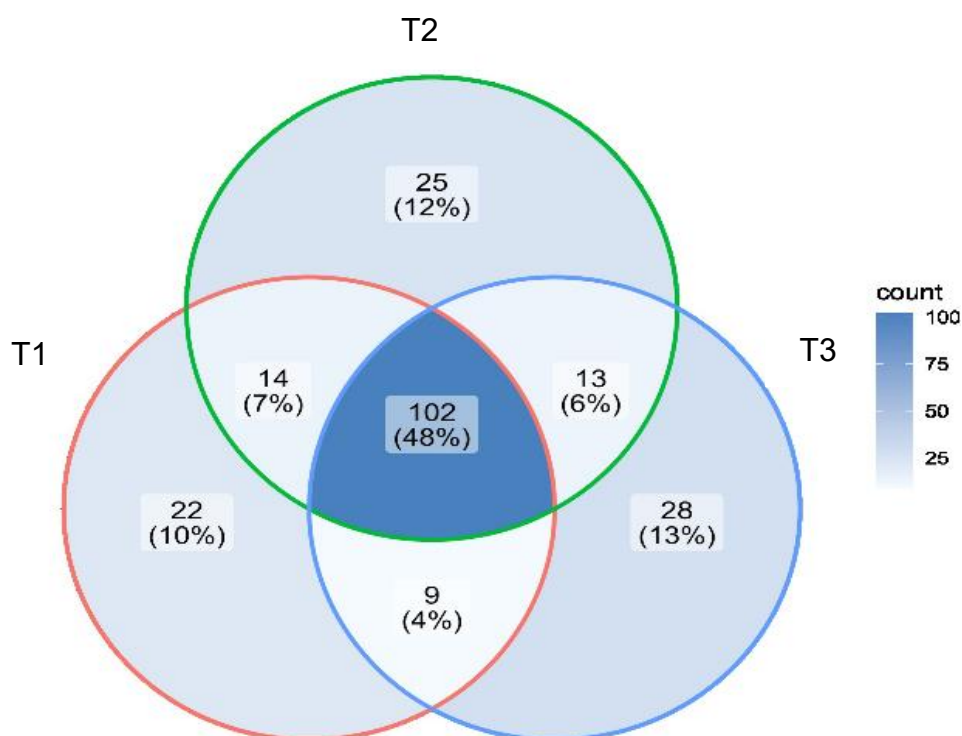


Figura 10. Diagrama de Venn que muestra el número de OTU específicas y comunes (OTU 102) entre tres tiempos de maduración de queso Crema de Chiapas de leche cruda de vaca construido con las secuencias sin aplicar un parámetro de selección para OTUS que se encuentran en poca abundancia.

3.6.3.2. Dinámica de hongos y levaduras en queso Crema de Chiapas

En la Figura 11 se observa que los índices de Chao1, Sannon y Simpson mostraron que a medida que transcurrió el tiempo de maduración incrementó la diversidad y riqueza de especies, alcanzado un valor máximo Chao1 = 144.75, Sannon = 3.394 y Simpson = 0.955 en el tiempo de 58 d. En el estudio realizado por Dimov et al.,(2021), reportaron que en queso verde búlgaro los valores de los índices Chao1 y Sannon aumentaron con respecto al tiempo de maduración.

En queso Crema de Chiapas se identificaron ocho especies de hongos y dos levaduras a lo largo del proceso de maduración. En T2 d las cepas más abundantes fueron *S. cerevisiae*, *C. versatilis*, *C. tropicalis* y *C. etchellsii*. En el tiempo de 29 d las especies más abundantes fueron *C. versatilis*, *Candida kruissii*, *C. etchellsii*, *Phaeoacremonium hungaricum* y *Pichia* sin clasificar. En el tiempo de 58 d las especies más abundantes fueron *C. versatilis*, *C. Kruisii*, *C. etchellsii*, *Candida tropicalis*, *Phaeoacremonium hungaricum*, *Pichia* (sin clasificar), *Trichosporon debeurmannianum*, *Malassezia furfur*, *S. cerevisiae* y *C. parapsilosis*. Se observó un mayor número de especies de hongos a medida que se incrementó el tiempo de maduración, este comportamiento es similar a lo reportado en queso Cantal (Frétin et al., 2022) y queso Vorarlberger Bergkäse austriaco (Quijada et al., 2020).

Por otro lado, en queso Serro Minas la mayor diversidad de levaduras fue reportada a los 3 d, en temporada de lluvias (Cardoso et al., 2015). Los géneros más comunes encontrados en diferentes quesos han sido *Candida*, *Pichia*, *Saccaromyces* y *Trichosporon* (Bintsis, 2021). En quesos mexicanos se han identificado 16 géneros de hongos y los más abundantes fueron *Galactomyces*, *Saccharomyces* y *Scheffersomyces* (Murugesan et al., 2018).

En las muestras, las tres cepas más abundantes de hongos en los tres tiempos de maduración fueron *C. versatilis*, *C. etchellsii* y *C. tropicalis*. En el queso, la primera especie fue la más abundante y variable durante la maduración. En queso Vorarlberger Bergkäse, el género *Candida* fue abundante al inicio de la maduración y con el tiempo disminuyó (Quijada et al., 2020). La cepa de *C. versatilis* se ha identificado en suero, yogur y queso (Moeini et al., 2004; Garnier et al., 2017). Además, ha sido reportado en queso Feta, queso Halloumi (Bintsis & Papademas, 2002), queso Gorgonzola y queso Danés (Viljoen et al., 2003); en salsa de soya con altas cantidades de sal contribuyó al desarrollo de sabores asociados (Zhang et al., 2020). *C. etchellsii* fue la segunda cepa más abundante en los tres tiempos evalua-

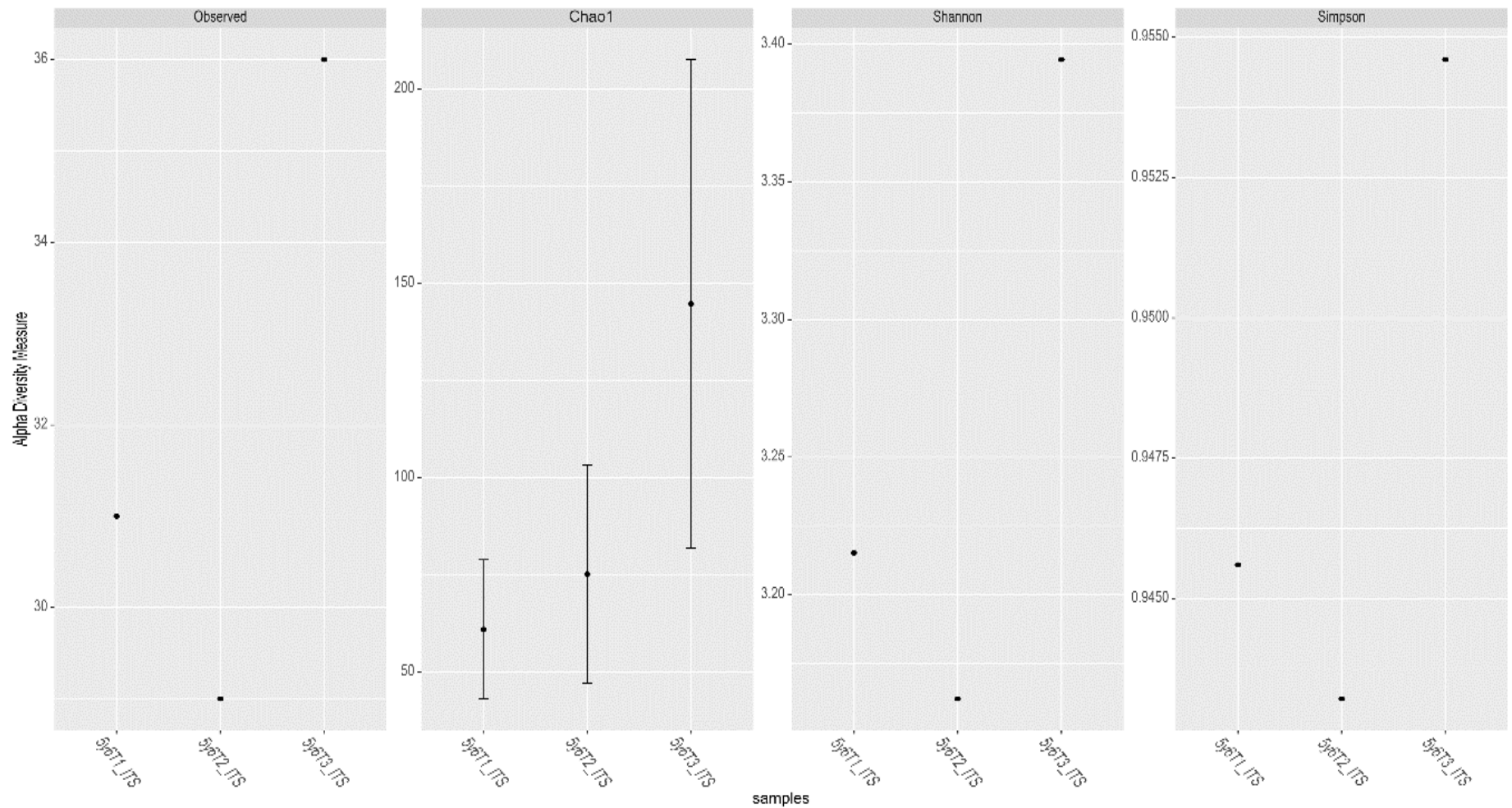


Figura 11. Gráfica de diversidad alfa expresada en índices, Chao, Shannon y Simpson para tres tiempos de maduración (T1, T2 y T3) del queso Crema de Chiapas con la región ITS.

los tres tiempos evaluados pero su abundancia se redujó con la maduración. Esta cepa se ha reportado en queso Cotija (Chombo-Morales et al., 2016) y en queso Taleggio fue más variable durante la maduración (Giannino et al., 2011). En queso Vorarlberger Bergkäse, el género *Candida* fue abundante al inicio de la maduración y con el tiempo disminuyó (Quijada et al., 2020). La cepa de *C. versatilis* se ha identificado en suero, yogur (Moeini et al., 2004; Garnier et al., 2017), queso Feta, queso Halloumi (Bintsis & Papademas, 2002), queso Gorgonzola, queso Danés (Viljoen et al., 2003). *C. etchelsi* es la segunda cepa más abundante en los tres tiempos de maduración, cuya abundancia se redujo al transcurrir la maduración y se ha reportado en queso Cotija (Chombo-Morales et al., 2016) y queso Taleggio (Giannino et al., 2011).

Candida tropicalis es la tercera cepa más abundante e incrementa con el tiempo de maduración. La cepa *C. tropicalis* fue identificada en queso Oaxaca (Saxer et al., 2013), leche cruda de vaca, en queso Cremoso (Spanamberg et al., 2018), en queso Mihalic (Yalcin et al., 2017) y en queso de Quebec (Hatoum et al., 2013). Además, Dinika et al., (2019) reportaron que durante la fermentación de suero de queso Mozzarella con esta cepa se hidrolizaron péptidos que contenían principalmente Asp, Glu, Thr, Val, Ile y Lys, los cuales se asocian a la biosíntesis del glutamato.

Respecto a las levaduras, *S. cerevisiae* presentó el valor más alto de AR (0.44), en T1 (Figura 12). Esta levadura se ha identificado en queso Frescal (Gonçalves et al., 2020), en queso Gorgonzola y en queso Danbo, reportándose la producción de aldehídos y alcoholes ramificados (Sørensen et al., 2011). *Saccharomyces* también ha sido reportada por Murugesan et al., (2018) en quesos mexicanos como: Adobera, Doble Crema de Chiapas, Ranchero, Chihuahua, Cincho, Oaxaca, Canasta, Manchego y Jocoque.

Otras cepas se encontraron en menor abundancia en las muestras de queso Crema de Chiapas tales como: *Candida kruisii*, *Phaeoacremonium hungaricum*, *Pichia* (sin clasificar), *Thrichosporon debeermannianum*, *Malassezia furfur* y

Candida parapsilosis. *C. kruisii* disminuye a medida que transcurre el tiempo de maduración. *P. hungaricum* en queso Crema de Chiapas se encontró en el tiempo de 58 d de maduración, este género no ha sido reportado en quesos. Sin embargo, se han aislado del medio ambiente, plantas leñosas enfermas, madera, vid, humanos con infecciones feohifomicóticas, larvas de escarabajos de corteza, artrópodos y del suelo (Gramaje et al., 2015).

El género *Pichia* se encontró en el tercer tiempo de maduración con una AR de 0.06 (Figura 12). Este comportamiento fue opuesto a lo que se reportó en queso Fossa, en el cual *Pichia occidentalis* se encontró en el ambiente donde se elaboró el queso y disminuyó con la maduración (Biagiotti et al., 2018). El género *Pichia* se ha identificado en quesos artesanales mexicanos (Murugesan et al., 2018), en queso Manouri (Lioliou et al., 2001) y en queso Roquefort (Yurt et al., 2023). El género *Pichia* se ha utilizado como cultivo iniciador en queso Kasajo (Xiao et al., 2020) y en queso Cantal (De Freitas et al., 2008), se observó que dependiendo de las cepas se obtienen diferentes perfiles de aroma (Xiao et al., 2020).

En el queso Crema de Chiapas se encontró *Trichosporon debeurmannianum* en el tiempo de maduración T3. Este género se reportó en leche cruda y queso Quebec (Lavoie et al., 2012). Su presencia indicó contaminación, ya que esta especie se asocia con muestras clínicas de pacientes con infecciones urinarias (Nath et al., 2018), infección de pie diabético (Yoo et al., 2022), ampulas micóticas (Noy et al., 2020). Este hongo también ha sido reportado en el medio ambiente, piel, tracto intestinal y vagina (Colombo et al., 2011). El género *Trichosporon* utiliza diferentes carbohidratos y fuentes de carbono y además degrada la urea, pero no es fermentativo (Colombo et al., 2011).

En el queso estudiado se encontró *Malassezia furfur* en el T3 (Figura 11), no es común en queso, sin embargo, el género *Malassezia* es dependiente de lípidos (Cafarchia et al., 2011). Se ha reportado que el género *Malassezia* crece de 33 a 41 °C en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y con baja disponibilidad de nutrientes (Spatz & Richard, 2020). *Malassezia furfur* se reportó en la piel de humanos (Gaitanis et al., 2009) y en leche materna (Boix-Amorós et al., 2017).

Candida parapsilosis en el queso analizado se identificó en baja abundancia en el T3. Esta cepa favoreció el crecimiento de *Lactobacillus paracasei* en queso Comte (Didelot et al., 2006) y se ha identificado en queso Cheddar, queso tipo Suizo y queso azul estadounidense (Banjara et al., 2015).

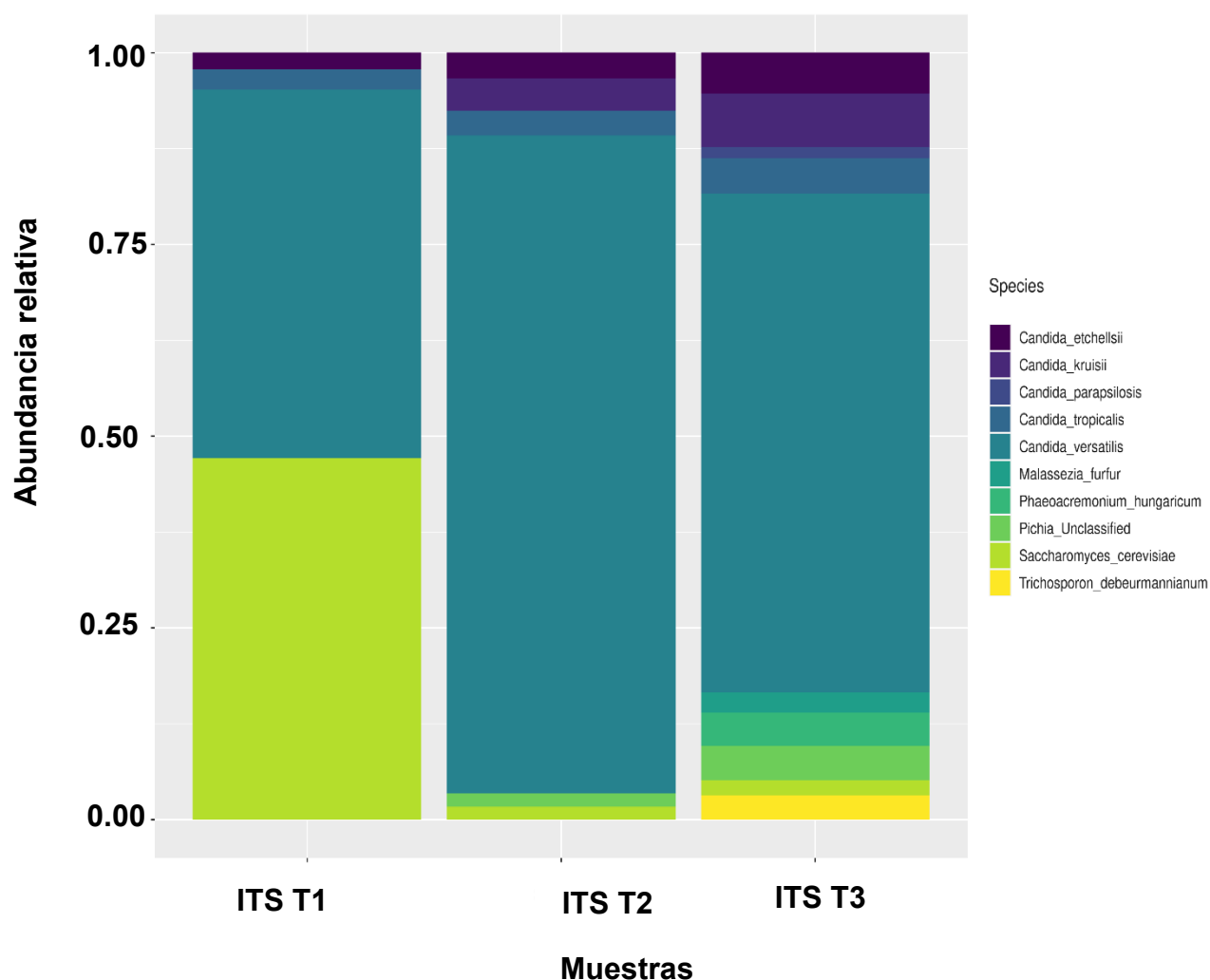


Figura 12. Abundancia relativa de hongos y levaduras de queso Crema de Chiapas en la maduración.

Para evaluar la distribución de las 72 OTUs obtenidas entre los diferentes tiempos de maduración, se construyó un diagrama de Venn (Figura 13). Los datos indicaron que 30 OTUs incluyeron el 42 % de las lecturas totales, las cuales fueron compartidas en los tres tiempos de maduración. El mayor número (n=13) de OTUs únicas se ubicó en los tiempos de maduración de 2 y 58 d y el menor

número ($n = 6$) de OTUs únicas se observó para el tiempo (T2) de 29 d. El número de especies de hongos en los tiempos T1 y T3 solo se diferencia por una especie, esto puede explicarse debido a que algunos hongos tienen osmotolerancia, por ejemplo: *S.cerevisiae* produjo glicerol para sobrevivir a esta condición (Plemenitaš et al., 2014). Por otro lado, se mostró que la cantidad de especies es menor en el T2 al no haber modificaciones en las características fisicoquímicas. Podríamos suponer que las bacterias presentes en este tiempo podrían haber inhibido determinadas cepas de hongos. Leyva Salas et al., (2018) encontraron que cepas de *Lactobacillus* impiden el crecimiento de 10 cepas entre las que se encontraron los géneros *Penicillium*, *Mucor*, *Galactomyces*, *Yarrowia*, *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Didymella* y *Trichosporon* en un queso modelo y yogurt, debido a que producen compuestos antifúngicos tales como: ácido láctico, acético, succínico, propiónico, fórmico y butírico.

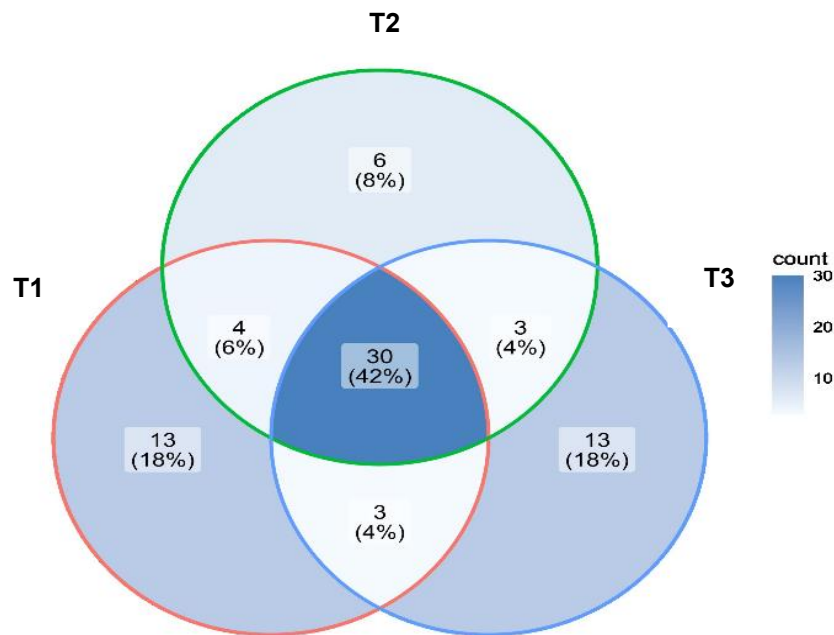


Figura 13. Diagrama de Venn que muestra el número de OTUs específicas y comunes (OTU 30) entre tres tiempos de maduración de queso Crema de Chiapas de leche cruda de vaca construido por los OTUs crudos sin aplicar un parámetro de selección.

3.7. Conclusiones

La microbiota del queso Crema de Chiapas se modificó durante el tiempo de maduración. Las bacterias ácido lácticas predominaron durante la maduración del queso, sin embargo, las abundancias fueron diferentes durante los tres tiempos de maduración, debido a que las características fisicoquímicas del queso y las relaciones entre microorganismos favorecieron o limitaron el crecimiento de determinados géneros, este mismo comportamiento fue observado para hongos y levaduras. Así mismo, se encontraron géneros de bacterias potencialmente patógenas y hongos perjudiciales para el humano. Los microorganismos son indicadores del manejo que se tuvo desde la ordeña, procesamiento y conservación del queso; su presencia otorga características únicas al queso. Comparar la dinámica bacteriana, de hongos y levaduras permite identificar posibles peligros para el consumidor durante la maduración del queso, generar nuevos cultivos iniciadores y descubrir microorganismos no cultivables. Este trabajo, junto con otros similares, podrá alimentar bases de datos con información de secuencias de microorganismos de quesos mexicanos, para contribuir a la bioseguridad del consumidor.

3.8. Literatura citada

- Abreu, A. C. D. S., Carazzolle, M. F., Crippa, B. L., Barboza, G. R., Mores Rall, V. L., De Oliveira Rocha, L., & Silva, N. C. C. (2021). Bacterial diversity in organic and conventional Minas Frescal cheese production using targeted 16S rRNA sequencing. *International Dairy Journal*, 122, 105139. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105139>
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, C. M., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2018). Characterization of Bacterial Communities in Mexican Artisanal Raw Milk “Bola de Ocosingo” Cheese by High-Throughput Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2598. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02598>
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M. C., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2014). High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology*, 44, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.022>
- Altahir, M. O. E., Elgasim, E. A., & Mohamed Ahmed, I. A. (2014). Ripening of Sudanese Braided (Muddaffara) Cheese Manufactured from Raw or Pasteurized Milk: Effect of Heat Treatment and Salt Concentration on the

- Physicochemical Properties. *International Journal of Food Science*, 2014, 698263. <https://doi.org/10.1155/2014/698263>
- Álvarez Ramos, L., Arrieta Baez, D., Dávila Ortiz, G., Carlos Ruiz Ruiz, J., & Manuel Toledo López, V. (2022). Antioxidant and antihypertensive activity of Gouda cheese at different stages of ripening. *Food Chemistry: X*, 14, 100284. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100284>
- Andersen, A. Z., Carvalho, A. L., Neves, A. R., Santos, H., Kummer, U., & Olsen, L. F. (2009). The metabolic pH response in *Lactococcus lactis*: An integrative experimental and modelling approach. *Computational Biology and Chemistry*, 33(1), 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2008.08.001>
- Arqués, J. L., Garde, S., Fernández-García, E., Gaya, P., & Nuñez, M. (2007). Volatile Compounds, Odor, and Aroma of La Serena Cheese High-Pressure Treated at Two Different Stages of Ripening. *Journal of Dairy Science*, 90(8), 3627-3639. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0185>
- Bakirci, İ., Kavaz, A., & Macit, E. (2012). *Effect of different brine concentrations and ripening period on some quality properties of Turkish white pickled cheese*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Effect-of-different-brine-concentrations-and-period-Bakirci-Kavaz/686b21f121a504f456e9ee756162832f6f285edb>
- Banjara, N., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2015). Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *Current Microbiology*, 70(6), 792-800. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>
- Barzideh, Z., Siddiqi, M., Mohamed, H. M., & LaPointe, G. (2022). Dynamics of Starter and Non-Starter Lactic Acid Bacteria Populations in Long-Ripened Cheddar Cheese Using Propidium Monoazide (PMA) Treatment. *Microorganisms*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081669>
- Batool, M., Nadeem, M., Imran, M., Khan, I. T., Bhatti, J. A., & Ayaz, M. (2018). Lipolysis and antioxidant properties of cow and buffalo cheddar cheese in accelerated ripening. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0871-9>
- Biagiotti, C., Ciani, M., Canonico, L., & Comitini, F. (2018). Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. *European Food Research and Technology*, 244(11), 1921-1931. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3104-6>
- Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*, 7(4), 447-470. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021027>
- Bintsis, T., & Papademas, P. (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 113-120. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00054.x>
- Biolcati, F., Ferrocino, I., Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2020). Short communication: High-throughput sequencing approach to investigate Italian artisanal cheese production. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 10015-10021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18208>
- Boix-Amorós, A., Martinez-Costa, C., Querol, A., Collado, M. C., & Mira, A. (2017). Multiple Approaches Detect the Presence of Fungi in Human Breastmilk

- Samples from Healthy Mothers. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13270-x>
- Bottari, B., Levante, A., Bancalari, E., Sforza, S., Bottesini, C., Prandi, B., De Filippis, F., Ercolini, D., Nocetti, M., & Gatti, M. (2020). The Interrelationship Between Microbiota and Peptides During Ripening as a Driver for Parmigiano Reggiano Cheese Quality. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581658. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581658>
- Buehler, A. J., Evanowski, R. L., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2017). Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 8814-8825. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12635>
- Cafarchia, C., Gasser, R. B., Figueredo, L. A., Latrofa, M. S., & Otranto, D. (2011). Advances in the identification of *Malassezia*. *Molecular and Cellular Probes*, 25(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.12.003>
- Cakmakci, S., Dagdemir, E., Hayaloglu, A. A., Gurses, M., & Gundogdu, E. (2008). Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 293-299. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9470-z>
- Camargo, A. C., Costa, E. A., Fusieger, A., Freitas, R. de, Nero, L. A., & Carvalho, A. F. de. (2021). Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing. *Food Research International*, 139, 109803. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109803>
- Campagnollo, F. B., Pedrosa, G. T. S., Kamimura, B. A., Furtado, M. M., Baptista, R. C., Nascimento, H. M., Alvarenga, V. O., Magnani, M., & Sant’Ana, A. S. (2022). Growth potential of three strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in Frescal and semi-hard artisanal Minas microcheeses: Impact of the addition of lactic acid bacteria with antimicrobial activity. *LWT*, 158, 113169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113169>
- Campos, G. Z., Lacorte, G. A., Jurkiewicz, C., Hoffmann, C., Landgraf, M., Gombossy de Melo Franco, B. D., & Pinto, U. M. (2021). Microbiological characteristics of canastra cheese during manufacturing and ripening. *Food Control*, 121, 107598. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107598>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>
- Carpino, S., Mallia, S., Terra, S. L., Melilli, C., Licitra, G., Acree, T. E., Barbano, D. M., & Soest, P. J. V. (2004). Composition and Aroma Compounds of Ragusano Cheese: Native Pasture and Total Mixed Rations*. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 816-830. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73226-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73226-9)
- Carvajal-Moreno, M., Vargas-Ortiz, M., Hernández-Camarillo, E., Ruiz-Velasco, S., & Rojo-Callejas, F. (2019). Presence of unreported carcinogens, Aflatoxins and their hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca

- cheese from Mexico City. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.046>
- Castellanos-Rozo, J., Pérez Pulido, R., Grande, M. J., Lucas, R., & Gálvez, A. (2020). Analysis of the Bacterial Diversity of Paipa Cheese (a Traditional Raw Cow's Milk Cheese from Colombia) by High-Throughput Sequencing. *Microorganisms*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020218>
- Cazzolla Gatti, R., Amoroso, N., & Monaco, A. (2020). Estimating and comparing biodiversity with a single universal metric. *Ecological Modelling*, 424, 109020. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109020>
- Celik, S., & Turkoglu, H. (2007). Ripening of traditional Örgü cheese manufactured with raw or pasteurized milk: Composition and biochemical properties. *International Journal of Dairy Technology*, 60(4), 253-258. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00344.x>
- Ceugniet, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., & Drider, D. (2017). Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of "Tomme d'Orchies" cheese during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034>
- Choi, J., Lee, S. I., Rackerby, B., Goddik, L., Frojen, R., Ha, S.-D., Kim, J. H., & Park, S. H. (2020). Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 4026-4042. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>
- Chombo-Morales, P., Kirchmayr, M., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E., & Villanueva-Rodríguez, S. (2016). Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 1153-1161. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.044>
- Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods*, 11(15), 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
- Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2023). Distinct Bacterial Communities in São Jorge Cheese with Protected Designation of Origin (PDO). *Foods*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/foods12050990>
- Colombo, A. L., Padovan, A. C. B., & Chaves, G. M. (2011). Current Knowledge of Trichosporon spp. And Trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 682-700. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11>
- Criste, A., Copolovici, L., Copolovici, D., Kovacs, M., Madden, R. H., Corcionivoschi, N., Gundogdu, O., Berchez, M., & Urcan, A. C. (2020). Determination of changes in the microbial and chemical composition of Țaga cheese during maturation. *PLoS ONE*, 15(12), e0242824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242824>
- De Freitas, I., Pinon, N., Berdagué, J.-L., Tournayre, P., Lortal, S., & Thierry, A. (2008). Kluyveromyces lactis but Not Pichia fermentans Used as Adjunct Culture Modifies the Olfactory Profiles of Cantalet Cheese. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 531-543. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0136>

- De la Rosa-Alcaraz, M. de los Á., Ortiz-Estrada, Á. M., Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2020). Poro de Tabasco cheese: Chemical composition and microbiological quality during its artisanal manufacturing process. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3025-3037. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17363>
- De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2014). Microbial Ecology Dynamics Reveal a Succession in the Core Microbiota Involved in the Ripening of Pasta Filata Caciocavallo Pugliese Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 6243-6255. <https://doi.org/10.1128/AEM.02097-14>
- Delbès, C., Ali-Mandjee, L., & Montel, M.-C. (2007). Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1882-1891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01716-06>
- Didelot, S., Bordenave-Juchereau, S., Rosenfeld, E., Piot, J.-M., & Sannier, F. (2006). Peptides released from acid goat whey by a yeast-lactobacillus association isolated from cheese microflora. *Journal of Dairy Research*, 73(2), 163-170. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001512>
- Dimov, S. G., Gyurova, A., Zagorchev, L., Dimitrov, T., Georgieva-Miteva, D., & Peykov, S. (2021). NGS-Based Metagenomic Study of Four Traditional Bulgarian Green Cheeses from Tcherni Vit. *LWT*, 152, 112278. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112278>
- Dinika, I., Nurhadi, B., Masruchin, N., Utama, G. L., & Roostita, L. B. (2019). The Roles of *Candida tropicalis* Toward Peptide and Amino Acid Changes in Cheese Whey Fermentation. *International Journal of Technology*, 10, 1533. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v10i8.3661>
- Dreier, M., Meola, M., Berthoud, H., Shani, N., Wechsler, D., & Junier, P. (2022). High-throughput qPCR and 16S rRNA gene amplicon sequencing as complementary methods for the investigation of the cheese microbiota. *BMC Microbiology*, 22(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02451-y>
- Dugat-Bony, E., Sarthou, A.-S., Perello, M.-C., de Revel, G., Bonnarme, P., & Helinck, S. (2016). The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2502-2511. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10502>
- Durães-Carvalho, R., Souza, A. R., Martins, L. M., Sprogis, A. C. S., Bispo, J. A. C., Bonafe, C. F. S., & Yano, T. (2012). Effect of High Hydrostatic Pressure on *Aeromonas hydrophila* AH 191 Growth in Milk. *Journal of Food Science*, 77(8), M417-M424. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02819.x>
- Erhardt, M. M., Oliveira, W. de C., Fröder, H., Marques, P. H., Oliveira, M. B. P., & Richards, N. S. P. dos S. (2023). Lactic Bacteria in Artisanal Cheese: Characterization through Metagenomics. *Fermentation*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010041>
- Erkmen, O., & Bozoglu, F. (2016). Food Microbiology: Principles into Practice 2 Volumes. En *Food Microbiology: Principles into Practice* (p. 458). <https://doi.org/10.1002/9781119237860>

- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, 57, 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.004>
- Franco, I., Bargiela, V., & Tovar, C. A. (2023). Effect of Vacuum Packaging on the Biochemical, Viscoelastic, and Sensory Properties of a Spanish Cheese during Chilled Storage. *Foods*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/foods2071381>
- Frétin, M., Gérard, A., Ferlay, A., Martin, B., Buchin, S., Theil, S., Rifa, E., Loux, V., Rué, O., Chassard, C., & Delbès, C. (2022). Integration of Multiomic Data to Characterize the Influence of Milk Fat Composition on Cantal-Type Cheese Microbiota. *Microorganisms*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020334>
- Gaitanis, G., Velegraki, A., Alexopoulos, E. C., Kapsanaki-Gotsi, E., Zisova, L., Ran, Y., Zhang, H., Arsenis, G., Bassukas, I. D., & Faergemann, J. (2009). *Malassezia furfur* fingerprints as possible markers for human phylogeography. *The ISME Journal*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.112>
- Gandhi, A., & Shah, N. P. (2016). Salt Reduction in a Model High-Salt Akawi Cheese: Effects on Bacterial Activity, pH, Moisture, Potential Bioactive Peptides, Amino Acids, and Growth of Human Colon Cells. *Journal of Food Science*, 81(4), H991-H1000. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13260>
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms*, 5(3), 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>
- Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Marchand, P., Blanc, P., Jeantet, R., & Jan, G. (2019). Review: Adaptation of Beneficial Propionibacteria, Lactobacilli, and Bifidobacteria Improves Tolerance Toward Technological and Digestive Stresses. *Frontiers in Microbiology*, 10, 841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00841>
- Giannino, M. L., Buffoni, J. N., Massone, E., & Feligini, M. (2011). Internal Transcribed Spacer as a Target to Assess Yeast Biodiversity in Italian Taleggio PDO Cheese. *Journal of Food Science*, 76(7), M511-M514. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02288.x>
- Giannino, M. L., Marzotto, M., Dellaglio, F., & Feligini, M. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.022>
- Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P. F., & De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>
- Gonçalves, B. L., Muaz, K., Coppa, C. F. S. C., Rosim, R. E., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F., & Corassin, C. H. (2020). Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in

- Frescal cheese. *Food Research International*, 136, 109604. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109604>
- González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, Á. M., De la Rosa-Alcaraz, M. de los Á., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3250-3262. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>
- Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Phaeoacremonium: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*, 119(9), 759-783. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.004>
- Guizani, N., Al-Attabi, Z., Kasapis, S., & Mahgoub Gaafar, O. (2006). Ripening Profile of Semi-Hard Standard Goat Cheese Made From Pasteurized Milk. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 523-532. <https://doi.org/10.1080/10550490600596262>
- Hammad, A. M., Moustafa, A.-E. H., Mansour, M. M., Fahmy, B. M., Hamada, M. G., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2018). Molecular and Phenotypic Analysis of Hemolytic Aeromonas Strains Isolated from Food in Egypt Revealed Clinically Important Multidrug Resistance and Virulence Profiles. *Journal of Food Protection*, 81(6), 1015-1021. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-360>
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2013). Identification and Partial Characterization of Antilisterial Compounds Produced by Dairy Yeasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(1), 8-17. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9109-8>
- Hayaloglu, A. A., Cakmakci, S., Brechany, E. Y., Deegan, K. C., & McSweeney, P. L. H. (2007). Microbiology, Biochemistry, and Volatile Composition of Tulum Cheese Ripened in Goat's Skin or Plastic Bags. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1102-1121. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71597-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71597-7)
- Hélias, A., Mirade, P.-S., & Corrieu, G. (2007). Modeling of Camembert-Type Cheese Mass Loss in a Ripening Chamber: Main Biological and Physical Phenomena. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 5324-5333. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0272>
- Hugo, C. J., Segers, P., Hoste, B., Vancanneyt, M., & Kersters, K. (2003). Chryseobacterium joostei sp. Nov., isolated from the dairy environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 771-777. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02232-0>
- Ianni, A., Bennato, F., Martino, C., Grotta, L., & Martino, G. (2020). Volatile Flavor Compounds in Cheese as Affected by Ruminant Diet. *Molecules*, 25(3), 461. <https://doi.org/10.3390/molecules25030461>
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12), 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature*

- Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kamilari, E., Tsaltas, D., Stanton, C., & Ross, R. P. (2022). Metataxonomic Mapping of the Microbial Diversity of Irish and Eastern Mediterranean Cheeses. *Foods*, 11(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/foods11162483>
- Kondrotiene, K., Zavistanaviciute, P., Aksomaitiene, J., Novoslavskij, A., & Malakauskas, M. (2024). Lactococcus lactis in Dairy Fermentation—Health-Promoting and Probiotic Properties. *Fermentation*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010016>
- Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(8), 640-654. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.05.005>
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology*, 92(5), 455-468. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>
- Levak, S., Kalit, S., Dolenčić Špehar, I., Radeljević, B., Rako, A., & Tudor Kalit, M. (2023). The influence of ripening of semi-hard goat cheese in oil on its physicochemical composition and sensory properties. *Journal of Dairy Science*, 106(12), 8493-8503. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23533>
- Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., Lê, S., Mounier, J., Valence, F., & Coton, E. (2018). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01787>
- Lioliou, K., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., & Robinson, R. K. (2001). Changes in the microflora of manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 54(3), 100-106. <https://doi.org/10.1046/j.1364-727x.2001.00017.x>
- Liu, W., Zhang, R., Shu, R., Yu, J., Li, H., Long, H., Jin, S., Li, S., Hu, Q., Yao, F., Zhou, C., Huang, Q., Hu, X., Chen, M., Hu, W., Wang, Q., Fang, S., & Wu, Q. (2020). Study of the Relationship between Microbiome and Colorectal Cancer Susceptibility Using 16SrRNA Sequencing. *BioMed Research International*, 2020, 7828392. <https://doi.org/10.1155/2020/7828392>
- Macrogen, (2024). Recuperado 11 de abril de 2024, de <https://www.macrogen-europe.com/service/identification-services>
- Marino, M., Dubsky de Wittenau, G., Saccà, E., Cattonaro, F., Spadotto, A., Innocente, N., Radovic, S., Piasentier, E., & Marroni, F. (2019). Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, 79, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.007>
- Méndez-Romero, J. I., Reyes-Díaz, R., Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Sayago-Ayerdi, S. G., Gómez-Gil, B., & González-

- Córdova, A. F. (2021). Artisanal Fresco cheese from Sonora: Physicochemical composition, microbial quality, and bacterial characterization by high-throughput sequencing. *International Journal of Dairy Technology*, 74(2), 359-370. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12751>
- Moeini, H., Nahvi, I., & Tavassoli, M. (2004). Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(3), 06-07.
- Moreira, R. V., Costa, M. P., Frasco, B. S., Sobral, V. S., Cabral, C. C., Rodrigues, B. L., Mano, S. B., & Conte-Junior, C. A. (2019). Effect of ripening time on bacteriological and physicochemical goat milk cheese characteristics. *Food Science and Biotechnology*, 29(4), 459-467. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00682-w>
- Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2019). Metataxonomic comparison between internal transcribed spacer and 26S ribosomal large subunit (LSU) rDNA gene. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.010>
- Murugesan, S., Reyes-Mata, M. P., Nirmalkar, K., Chavez-Carbajal, A., Juárez-Hernández, J. I., Torres-Gómez, R. E., Piña-Escobedo, A., Maya, O., Hoyo-Vadillo, C., Ramos-Ramírez, E. G., Salazar-Montoya, J. A., & García-Mena, J. (2018). Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Research International*, 113, 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.023>
- Nath, R., Sargiary, P., Borkakoty, B., & Parida, P. (2018). Cutaneotrichosporon (Trichosporon) debeurmannianum: A Rare Yeast Isolated from Blood and Urine Samples. *Mycopathologia*, 183(3), 585-590. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0231-8>
- Nazar, R. N. (2003). 8 - Ribosome Biogenesis in Yeast: rRNA Processing and Quality Control. En D. K. Arora & G. G. Khachatourians (Eds.), *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 3, pp. 161-185). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(03\)80011-4](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(03)80011-4)
- Nes, I. F., Diep, D. B., & Holo, H. (2007). Bacteriocin Diversity in Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1189-1198. <https://doi.org/10.128/JB.01254-06>
- NOM-113-SSA1-1994: Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. | InforMEA. (s. f.). Recuperado 4 de diciembre de 2020, de <https://www.informea.org/es/node/168627>
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. (s. f.). Recuperado 4 de diciembre de 2020, de <http://www.salud.gob.mx/unidadades/cdi/nom/092ssa14.html>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. - PDF Descargar libre. (s. f.). Recuperado 4 de diciembre de 2020, de <https://docplayer.es/23912713-Norma-oficial-mexicana-nom-111-ssa1-1994-bienes-y-servicios-metodo-para-la-cuenta-de-mohos-y-levaduras-en-alimentos.html>

- Noy, M. L., Abdolrasouli, A., Borman, A. M., Fraser, M., Francis, N., Moore, L. S. P., & Merika, E. E. (2020). Cutaneotrichosporon (Trichosporon) debeurmannianum associated with a subcutaneous mycotic cyst successfully treated with voriconazole. *Clinical and Experimental Dermatology*, 45(2), 250-253. <https://doi.org/10.1111/ced.14037>
- Oh, J.-H., Vinay-Lara, E., McMinn, R., Glass, K. A., Johnson, M. E., & Steele, J. L. (2014). Evaluation of NaCl, pH, and lactic acid on the growth of Shiga toxin-producing Escherichia coli in a liquid Cheddar cheese extract. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6671-6679. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7946>
- Onywera, H., & Meiring, T. L. (2020). Comparative analyses of Ion Torrent V4 and Illumina V3-V4 16S rRNA gene metabarcoding methods for characterization of cervical microbiota: Taxonomic and functional profiling. *Scientific African*, 7, e00278. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00278>
- Öztürk, H., & Akın, N. (2018). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 38, 674-682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Öztürk, H. İ., & Akın, N. (2021). Effect of ripening time on peptide dynamics and bioactive peptide composition in Tulum cheese. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 3832-3852. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19494>
- Park, W., Yoo, J., Oh, S., Ham, J., Jeong, S., & Kim, Y. (2019). Microbiological Characteristics of Gouda Cheese Manufactured with Pasteurized and Raw Milk during Ripening Using Next Generation Sequencing. *Food Science of Animal Resources*, 39(4), 585-600. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e49>
- Pavlatou, C., Nikolaou, A., Prapa, I., Tegopoulos, K., Plessas, S., Grigoriou, M. E., Bezirtzoglou, E., & Kourkoutas, Y. (2023). Effect of Immobilized *Pediococcus acidilactici* ORE5 Cells on Pistachio Nuts on the Functional Regulation of the Novel Katiki Domokou-Type Cheese Microbiome. *Applied Sciences*, 13(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/app13148047>
- Pfister, A. S., & Kühn, M. (2018). Chapter Four—Of Wnts and Ribosomes. En J. Larraín & G. Olivares (Eds.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 153, pp. 131-155). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.006>
- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kežar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 5, 199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00199>
- Porcellato, D., & Skeie, S. B. (2016). Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese. *International Dairy Journal*, 61, 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.05.005>
- Powell, I. B., Broome, M. C., & Limsowtin, G. K. Y. (2011). Cheese | Starter Cultures: General Aspects. En J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 552-558). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00066-2>

- Prasad, N., & Alvarez, V. B. (1999). Effect of Salt and Chymosin on the Physico-Chemical Properties of Feta Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1061-1067. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75327-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75327-0)
- Qian, M. C., & Burbank, H. M. (2007). Hard Italian cheeses: Parmigiano-reggiano and grana-padano. En *Improving the Flavour of Cheese* (pp. 421-443). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845693053.4.421>
- Quijada, N. M., Schmitz-Esser, S., Zwirzitz, B., Guse, C., Strachan, C. R., Wagner, M., Wetzels, S. U., Selberherr, E., & Dzieciol, M. (2020). Austrian Raw-Milk Hard-Cheese Ripening Involves Successional Dynamics of Non-Inoculated Bacteria and Fungi. *Foods*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods9121851>
- Rangel-Ortega, S. del C., Campos-Múzquiz, L. G., Charles-Rodriguez, A. V., Chávez-González, M. L., Palomo-Ligas, L., Contreras-Esquivel, J. C., Solanilla-Duque, J. F., Flores-Gallegos, A. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2023). Biological control of pathogens in artisanal cheeses. *International Dairy Journal*, 140, 105612. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105612>
- Rashtchi, P., Bazmi, A., Noshirvani, N., & Moosavy, M. H. (2021). Comparison of the microbial, physicochemical, and sensorial properties of raw and pasteurized Lighvan cheeses during ripening time. *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5527-5535. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2511>
- Rios, E. A., Ramos-Pereira, J., Santos, J. A., López-Díaz, T. M., Otero, A., & Rodríguez-Calleja, J. M. (2020). Behaviour of Non-O157 STEC and Atypical EPEC during the Manufacturing and Ripening of Raw Milk Cheese. *Foods*, 9(9), 1215. <https://doi.org/10.3390/foods9091215>
- Robertson, E. B., & Willett, J. L. E. (2023). Streptococcus mutans inhibits the growth of Enterococcus via the non-ribosomal cyclic peptide mutanobactin. *bioRxiv*, 2023.09.12.557362. <https://doi.org/10.1101/2023.09.12.557362>
- Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
- Rodríguez-Pinilla, J., Márquez, G., Tabla, R., Ramírez, R., & Delgado, F. J. (2015). Microbiological and lipolytic changes in high-pressure-treated raw milk cheeses during refrigerated storage. *Dairy Science & Technology*, 95(4), 425-436. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0219-4>
- Romero-Castillo, P. A., Leyva-Ruelas, G., & Cruz-Castillo, J. G. (2009). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SANITARIA DE QUESOS CREMA TROPICAL MEXICANO DE LA REGIÓN DE TONALÁ, CHIAPAS*. 8(1), 9.
- Rué, O., Coton, M., Dugat-Bony, E., Howell, K., Irlinger, F., Legras, J.-L., Loux, V., Michel-Maynier, E., Mounier, J., Neuveglise, C., & Sicard, D. (2023). *Comparison of metabarcoding taxonomic markers to describe fungal communities in fermented foods*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.13.523754>
- SAGARPA, 2013. La tradición no se vende, se hereda y se conserva REGLAS DE USO. Marca Colectiva QUESO CREMA DE CHIAPAS - PDF Free

- Download. (s. f.). <https://docplayer.es/29387300-Chiapas-centenario-la-tradicion-no-se-vende-se-hereda-y-se-conserva-reglas-de-uso-marca-colectiva-queso-crema-de-chiapas.html>
- Salazar, J. K., Carstens, C. K., Ramachandran, P., Shazer, A. G., Narula, S. S., Reed, E., Ottesen, A., & Schill, K. M. (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiology*, 18(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1323-4>
- Sánchez-Gamboa, C., Hicks-Pérez, L., Gutiérrez-Méndez, N., Heredia, N., García, S., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Microbiological Changes during Ripening of Chihuahua Cheese Manufactured with Raw Milk and Its Seasonal Variations. *Foods*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods7090153>
- Santamarina-García, G., Amores, G., Hernández, I., Morán, L., Barrón, L. J. R., & Virto, M. (2023). Relationship between the dynamics of volatile aroma compounds and microbial succession during the ripening of raw ewe milk-derived Idiazabal cheese. *Current Research in Food Science*, 6, 100425. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100425>
- Saxer, S., Schwenninger, S. M., & Lacroix, C. (2013). Characterization of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 314-320. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.016>
- Secchi, G., Amalfitano, N., Carafa, I., Franciosi, E., Gallo, L., Schiavon, S., Sturaro, E., Tagliapietra, F., & Bittante, G. (2023). Milk metagenomics and cheese-making properties as affected by indoor farming and summer highland grazing. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 96-116. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22449>
- Sørensen, L. M., Gori, K., Petersen, M. A., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2011). Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *International Dairy Journal*, 21(12), 970-978. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.005>
- Spanemberg, A., Ramos, J. P., Leoncini, O., Alves, S. H., & Valente, P. (2018). High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37(2), 133. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16239>
- Spatz, M., & Richard, M. L. (2020). Overview of the Potential Role of *Malassezia* in Gut Health and Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00201>
- Spyrelli, E. D., Stamatiou, A., Tassou, C. C., Nychas, G.-J. E., & Doulgeraki, A. I. (2020). Microbiological and Metagenomic Analysis to Assess the Effect of Container Material on the Microbiota of Feta Cheese during Ripening. *Fermentation*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010012>
- Sulaiman, I. M., Jacobs, E., Simpson, S., & Kerdahi, K. (2014). Molecular Identification of Isolated Fungi from Unopened Containers of Greek Yogurt by DNA Sequencing of Internal Transcribed Spacer Region. *Pathogens*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030499>

- Tabla, R., Gómez, A., Simancas, A., Rebollo, J. E., Molina, F., & Roa, I. (2016). Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity. *Small Ruminant Research*, 145, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.008>
- Tamime Y., A., N.I. Barclay, M., Amarowicz, R., & McNulty, D. (1999). Kishk—A dried fermented milk / cereal mixture. 1 Composition of gross components, carbohydrates, organic acids and fatty acids. *Le Lait*, 79(3), 317-330.
- The Galaxy Community. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W345-W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Thierry, A., Valence, F., Deutsch, S.-M., Even, S., Falentin, H., Le Loir, Y., Jan, G., & Gagnaire, V. (2015). Strain-to-strain differences within lactic and propionic acid bacteria species strongly impact the properties of cheese—A review. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 895-918. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0267-9>
- Tidona, F., Zago, M., Carminati, D., & Giraffa, G. (2022). The Reduction of Salt in Different Cheese Categories: Recent Advances and Future Challenges. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.859694>
- Turri, F., Cremonesi, P., Battelli, G., Severgnini, M., Brasca, M., Gandini, G., & Pizzi, F. (2021). High biodiversity in a limited mountain area revealed in the traditional production of Historic Rebel cheese by an integrated microbiota-lipidomic approach. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89959-x>
- Tzora, A., Nelli, A., Voidarou, C., Fthenakis, G., Rozos, G., Theodorides, G., Bonos, E., & Skoufos, I. (2021). Microbiota “Fingerprint” of Greek Feta Cheese through Ripening. *Applied Sciences*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/app11125631>
- Vasek, O. M., Leblanc, J. G., Fusco, A., & Savoy De Giori, G. (2008). Chemical composition and microbial evaluation of Argentinean Corrientes cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 222-228. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00414.x>
- Viljoen, B. C., Knox, A. M., Jager, P. H. D., & Lourens-Hattingh, A. (2003). *Development of Yeast Populations during Processing and Ripening of Blue Veined Cheese*.
- Villega de Gante, A., Escoto, F.C., Vargas, A.C., & Campos, M. (2014). Atlas de los quesos mexicanos genuinos. ReseachGate.https://www.researchgate.net/publication/314205827_Atlas_de_los_Quesos_Mexicanos_Genuinos
- Wemmenhove, E., Wells-Bennik, M. H. J., Stara, A., Van Hooijdonk, A. C. M., & Zwietering, M. H. (2016). How NaCl and water content determine water activity during ripening of Gouda cheese, and the predicted effect on inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5192-5201. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10523>
- Wilster, G. H., Price, W. V., Morris, A. J., Goss, E. F., & Sanders, G. P. (1940). Determination of Fat, Moisture, and Salt in Soft Cheese. *Journal of Dairy*

- Science*, 23(3), 197-200. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(40\)95511-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(40)95511-4)
- Xia, Y. (2020). Chapter Eleven—Correlation and association analyses in microbiome study integrating multiomics in health and disease. En J. Sun (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 171, pp. 309-491). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.04.003>
- Xiao, J., Chen, Y., Li, J., Shi, X., Deng, L., & Wang, B. (2020). Evaluation of the Effect of Auxiliary Starter Yeasts With Enzyme Activities on Kazak Cheese Quality and Flavor. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.614208>
- Yalcin, S., Senses, S., & Ozbas, Y. (2017). Enzymatic characterization of yeast strains originated from traditional Mihalic cheese. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6, 1152-1156. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.5.1152-1156>
- Yin, L., Wan, Y.-D., Pan, X.-T., Zhou, C.-Y., Lin, N., Ma, C.-T., Yao, J., Su, Z., Wan, C., Yu, Y.-W., & Zhu, R.-X. (2019). Association Between Gut Bacterial Diversity and Mortality in Septic Shock Patients: A Cohort Study. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 7376-7382. <https://doi.org/10.12659/MS M.916808>
- Yoo, I. Y., Heo, W., Kwon, J. A., Lee, M., & Park, Y.-J. (2022). Identification of the rare yeast *Cutaneotrichosporon* (*Trichosporon*) *debeurmannianum* from diabetic foot infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(12), e24785. <https://doi.org/10.1002/jcla.24785>
- Yoon, Y., Lee, S., & Choi, K.-H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>
- Yurt, M. N. Z., Ersoy Omeroglu, E., Tasbasi, B. B., Acar, E. E., Altunbas, O., Ozalp, V. C., & Sudagidan, M. (2023). Bacterial and fungal microbiota of mould-ripened cheese produced in Konya. *International Journal of Dairy Technology*, 76(3), 627-637. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12944>
- Zajác, P., Čurlej, J., Čapla, J., Benešová, L., & Jakabová, S. (2023). Composition of Ewe's Lump cheese during the production season. *Cogent Food & Agriculture*, 9(1), 2243105. <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2243105>
- Zhang, K., Jia, M., Guo, Z., Li, Y., Li, B., & Li, X. (2021). Evaluation of bacterial diversity of traditional cheese in Tarbagatay Prefecture, China, and its correlation with cheese quality. *Food Science & Nutrition*, 9(6), 3155-3164. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2275>
- Zhang, L., Zhang, L., & Xu, Y. (2020). Effects of *Tetragenococcus halophilus* and *Candida versatilis* on the production of aroma-active and umami-taste compounds during soy sauce fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2782-2790. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10310>
- Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence

of Yeasts in Cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.703284>

4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIINFLAMATORIA EN EXTRACTOS DE QUESO CREMA DE CHIAPAS.

4.1. Resumen

Durante la hidrólisis de las proteínas de la leche y productos lácteos, se ha demostrado que se generan péptidos con actividades biológicas. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de extractos de queso Crema de Chiapas durante tres tiempos de maduración (T1 = 13, T2 = 47 y T3 = 81 días) utilizando un método espectroscópico. Los extractos de queso en los tiempos T1 y T2 tuvieron los valores más altos de actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* ATCC3309 (39.38 y 50.94 %, respectivamente). Por otro lado, los extractos de queso en los tiempos T1 y T2 no tuvieron actividad antimicrobiana, pero en T3 fue de 13.18 % para *Escherichia coli* K12. Los extractos de queso inhibieron el crecimiento de *Micrococcus luteus* CDBBB1018 en T2 y T3 (15.35 y 11.86 %, respectivamente). Por otro lado, los extractos de queso presentaron actividad antiinflamatoria en T1 de 44.83, T2 de 543 y para el T3 fue de 576.33 µg/mL de equivalentes de DS. Los extractos acuosos son fuente potencial de compuestos con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Palabras clave: queso, actividad biológica, tiempo, quesería.

ANTIMICROBIAL AND ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY IN EXTRACTS OF CHIAPAS CREAM CHEESE.

Abstract

During the hydrolysis of milk proteins and dairy products, it has been demonstrated that peptides with biological activities are generated. The objective of this work was to determine the antimicrobial and antiinflammatory activity of Crema de Chiapas cheese extracts during three ripening times (T1 = 13, T2 = 47 and T3 = 81 days) using a spectroscopic method. The cheese extracts at times T1 and T2 had the highest values of antimicrobial activity against *Listeria innocua* ATCC3309 (39.38 and 50.94 %, respectively). On the other hand, cheese extracts at times T1 and T2 had no antimicrobial activity, but at T3 it was 13.18 % for *Escherichia coli* K12. Cheese extracts inhibited the growth of *Micrococcus luteus* CDBBB1018 at T2 and T3 (15.35 and 11.86 %, respectively). On the other hand, cheese extracts showed anti-inflammatory activity at T1 of 44.83, T2 of 543 and for T3 was 576.33 µg/mL of DS equivalents. Aqueous extracts are potential source of compounds with antimicrobial and anti-inflammatory activity.

Key words: cheese, biological activity, time, cheesemaking.

4.3. Introducción

En México la producción de queso se concentra en las regiones lecheras de Jalisco, Guanajuato, Chihuahua y Chiapas (USDA, 2024). El consumo anual per cápita de quesos artesanales elaborados en México oscila entre 2.1 y 6 kg/año (González-Córdova et al., 2016). El queso Crema de Chiapas se elabora a partir de leche cruda y los pasos para su elaboración son: reposo de la leche cruda, adición de cuajo, reposo de la cuajada, corte de la cuajada y reposo, salado y empacado (Villegas et al., 2015). Adicional a lo anterior, el queso Crema de Chiapas ha sido estudiado y se han reportado bioactividades tales como: actividad antioxidante (Aguilar-Toalá et al., 2022), actividad antimicrobiana (Wong-Villarreal et al., 2021), actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y antioxidante (González-González et al., 2019).

Durante la maduración del queso ocurren procesos como la glucólisis, lipólisis y proteólisis. Luo et al., (2023) han reportado que las bacterias ácido lácticas (BAL) en la glucólisis produjeron principalmente energía en forma de ATP y NADH, y subproductos tales como ácidos orgánicos, alcoholes y gases. En la lipólisis en queso se han generado precursores de compuestos aromáticos tales como: ésteres, metil cetonas, lactonas y alcoholes secundarios (Thierry et al., 2017; Viana de Souza y Silva Dias, 2017). Barampouti et al., (2021) y Zhang et al., (2023) encontraron que la hidrólisis de proteínas rompe los enlaces peptídicos y libera péptidos que contienen de 2 a 50 aminoácidos. Los péptidos liberados en quesos han originado notas de sabores dulces debido a la presencia de aminoácidos tales como: Trp, Leu, Phe, His, Ile y Val (Bassoli et al., 2014; Temussi, 2012); el sabor amargo que también se ha reportado, se debe a la acumulación de péptidos hidrofóbicos cortos (McSweeney, 2007). Los péptidos obtenidos a partir de lácteos han demostrado tener diversas bioactividades tales como: antihipertensiva, antitrombótica, anticolesterolémica, antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria (Tagliazucchi et al., 2019), inmunomoduladora (Rangel et al., 2023) y antiobesogénica (Iwaniak & Mogut, 2020), por mencionar algunas.

Murray et al., (2022) han estimado que en el 2019 la resistencia antimicrobiana provocó 4.95 millones de muertes, el uso inadecuado de medicamentos ha originado este tipo de resistencia (Salam et al., 2023), debido a que las bacterias tienen facilidad de compartir su ADN con otras bacterias, lo cual puede ocurrir por transferencia vertical de generación en generación y transferencia horizontal de genes (Tao et al., 2022a). Esto ocurre, mediante tres mecanismos: transformación con ADN libre; transducción por bacteriófagos; y conjugación que involucra plásmidos y elementos conjugativos integrativos (Liu et al., 2022). Por lo anterior, el descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas es importante; Xuan et al., (2023) reportó péptidos antimicrobianos con una actividad de amplio espectro que fueron efectivos contra bacterias gram negativas y no produjeron resistencia a estos, debido a que los péptidos tienen múltiples mecanismos de acción, con lo cual se reduce la probabilidad de que las bacterias adquirieran múltiples mutaciones, al mismo tiempo. Browne et al., (2020) reportaron que los péptidos antimicrobianos actuaron sobre componentes de la membrana celular, conservados evolutivamente, que requieren de múltiples mutaciones a lo largo del tiempo, para adquirir la adaptación.

Por otra parte, la muerte celular y la inflamación están interconectadas (Tao et al., 2022b), durante este proceso inflamatorio ocurre la necrosis, principalmente por la desnaturalización de proteínas (Miller & Zachary, 2017). Los péptidos liberados en leche fermentada han demostrado tener actividad antiinflamatoria (Aguilar-Toalá et al., 2017) y se han descubierto veintitrés secuencias de estos péptidos (Nielsen et al., 2023). Es por esto, que el presente trabajo tiene como objetivo conocer la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria en los diferentes tiempos de maduración del Queso Crema de Chiapas.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Actividades biológicas

4.4.1.1. Obtención de extractos

Los extractos se obtuvieron de quesos de dos queserías, Queso Vaquero® y Queso Santa Cruz® durante tres tiempos de maduración T1 = 13, T2 = 47 y T3

= 81 d, con tres repeticiones cada uno (n = 18 unidades experimentales) para actividad antiinflamatoria; para actividad antimicrobiana se usaron dos repeticiones (n = 12 unidades experimentales).

Las bioactividades se determinaron en los extractos acuosos de cada una de las muestras, los cuales se extrajeron como lo describe Torres-Salas et al., (2020) con modificaciones. Muestras de 250 g de queso se homogeneizaron con 750 mL de agua destilada utilizando una licuadora (Osterizer, N L, México) durante 5 min, la mezcla se incubó a 40 °C en una parrilla (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) con agitación de 150 rpm, durante 60 min. De acuerdo a las recomendaciones de Meira et al. (2012) y Pontonio et al. (2021) se realizaron dos centrifugaciones, utilizando una centrífuga 5810 R (Eppendorf, NJ, EE. UU) a 8000×g durante 15 min a 4 °C; entre centrifugaciones, se filtró la fase acuosa a través de una capa de algodón estéril. El pH del sobrenadante o fase acuosa de la primera centrifugación se ajustó a 4.5, adicionando NaOH 1 M y HCl 1 M. Después de la segunda centrifugación, el sobrenadante se filtró por gravedad usando papel filtro grado 589/3 a 4 °C. Posteriormente, los extractos se almacenaron a -20°C (Rizzello et al., 2005).

4.4.1.2. Actividad antiinflamatoria

La concentración de proteína total se determinó en el extracto acuoso mediante el método de Bradford (1976); para la preparación del reactivo de Bradford se disolvieron 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU) en 50 mL de etanol, a esta solución se le añadieron 100 mL de ácido fosfórico al 85 % (p/v) y finalmente se aforó con agua destilada a un volumen final de 1 L. En cada pozo de la microplaca se colocaron 10 µL de muestra y 190 µL del reactivo de Bradford, después de 5 min se midió absorbancia a 595 nm en un SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). El blanco consistió en mezclar extracto acuoso con agua destilada. Se preparó una curva con albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU) utilizando concentraciones de 0.05-0.45 mg/mL, bajo las mismas condiciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron en mg/mL de BSA.

La determinación de la actividad antiinflamatoria se realizó con los extractos que fueron filtrados a través de papel Whatman No. 42, de acuerdo a la metodología descrita por Aguilar-Toalá et al., (2017). Se mezclaron 25 µL de albúmina (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU), 350 µL de tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.2 y concentración de 0.1 M, y 250 µL de muestra (extracto acuoso). Para el control, la muestra se sustituyó por PBS. La mezcla se pre-incubó a 37 °C durante 15 min, enseguida la proteína contenida en la mezcla de reacción se sometió a condiciones desnaturalizantes, manteniendo la mezcla de reacción a 70 °C durante 5 min. Después, la muestra se enfrió en baño de hielo durante 5 min y se registró la densidad óptica a 600 nm usando un equipo SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). Se preparó una curva estándar de nueve puntos (0, 200, 400, 600, 1000, 1200, 1600, 1800 y 2000 µg/mL) usando diclofenaco sódico (DS) contenido en tabletas de ariflam de 100 mg (Anexo 1a).

4.4.1.3. Actividad antimicrobiana

Cepas de *Escherichia coli* K12 (Minnesota, EE. UU.), *Listeria innocua* ATCC3309 (Universidad Nacional Autónoma de México, México) y *Micrococcus luteus* CDBBB1018 (Instituto Politécnico Nacional, México) fueron reactivadas con tres subcultivos en tubos de 10 mL para cepas de *Listeria* spp y *Escherichia* spp tal como lo recomendó Heredia-Castro et al., (2015) y para la tercera cepa como lo mencionaron Rodríguez-Figueroa et al., (2013) y Aguilar-Toalá et al., (2019). Los medios utilizados fueron los descritos por Torres-Salas et al., (2021), *E. coli* K12 se cultivó en caldo nutritivo (Bioxon, Becton Dickinson de México, S. A. de C. V), *L. innocua* ATCC3309 se inoculó en caldo nutritivo, enriquecido con 2.5 g/L de glucosa, 5 g/L de cloruro de sodio y 15 g/L de peptona de caseína (Bioxon, Becton Dickinson de México, S. A. de C. V) y *M. luteus* CDBBB1018 se sembró en cde infusión cerebro corazón (Bioxon, Becton Dickinson de México, S. A. de C. V). Las cepas se subcultivaron tres veces en una incubadora (Felisa, Feligneo, S.A de C.V) a 37 °C, *E. coli* K12 se resembró a las 24, 24 y 8 h, *M. luteus* CDBBB1018 y *L. innocua* ATCC3309 a las 24, 24 y 4 h, las cepas de *E. coli* y *L. innocua* contenían 1 x10⁸ UFC/mL y *M. luteus* tenía 1 x10⁷ UFC/mL.

En los extractos acuosos, se eliminó el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos neutralizándolos con NaOH 1M (Sezer y Güven, 2009). El efecto del peróxido de hidrógeno se inhibió adicionando 0.1 mg/mL de catalasa de hígado de bovino (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU) y se incubó a 25 °C durante 90 min. Posteriormente, la catalasa se inactivó calentando el extracto a 60 °C durante 10 min (Sezer y Güven, 2009). Por otro lado, el efecto antimicrobiano debido a proteínas se suprimió agregando una disolución de 0.1 mg/mL de proteinasa K de *Tritirachium album* (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU.) a las alícuotas procedentes de la neutralización del pH y de la eliminación de peróxido; se incubó a 37 °C durante 2 h y se inactivó calentando los extractos a 60 °C durante 10 min. Posteriormente, se mezclaron 100 µL de cada uno de los extractos tratados con 100 µL de cada cultivo de cepa en la etapa de crecimiento en fase exponencial, en una microplaca se incubaron durante 3 h a 37 °C y se midió la absorbancia a 600 nm (Pritchard et al., 2010). La actividad antimicrobiana se calculó con la siguiente Ecuación (2):

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = 100 - \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{..... Ecuación (2)}$$

Donde:

A= Absorbancia a 600 nm después de 3 h de incubación de la cepa con los tratamientos por separado en la microplaca.

B= Absorbancia a 600 nm del control (cepa en medio de cultivo) a las 3 h de incubación.

4.5. Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov a los datos, y al no seguir una distribución normal (datos no mostrados), se utilizó la prueba de Kruskal Wallis empleada para determinar diferencia entre más de dos muestras (Theodorsson-Norheim, 1986). Esta prueba es la versión no paramétrica del ANOVA de una vía (McKight & Najab, 2010), y para las diferencias entre

queserías se utilizó la prueba de Mann-Whitney que es la versión no paramétrica de una prueba t-Student (Xia, 2020), con un $\alpha = 0.05$. El programa utilizado fue XLSTAT 2023 (Lumivero, Nueva York, EE. UU.).

4.6. Resultados y discusión

4.6.1. Actividad antimicrobiana de extractos de queso Crema de Chiapas para *Listeria innocua* ATCC3309

Los valores promedios de las actividades antimicrobianas de los extractos de queso para *L. innocua* ATCC3309 fueron para el T1 de 39.38 %, T2 de 50.94 % y para el T3 fue de cero. La comparación de medias de las actividades antimicrobianas de los extractos de queso para *L. innocua* mostró que el extracto de queso obtenido en el T3 tuvo la menor actividad antimicrobiana ($p < 0.05$) y las mayores actividades ($p < 0.05$) se encontraron en los tiempos T1 y T2 como se observa en el cuadro 6. Sin embargo, en el estudio realizado por Torres-Salas et al., (2021) en queso añejo de Zacazonapan el tiempo con 0 d de maduración presentó la mayor actividad antimicrobiana contra *L. innocua* ATCC3309 con 8.76 %. Los extractos de quesillo y Queso Doble Crema de Colombia (Durango-Zuleta et al., 2022), extractos de queso Canestrato Pugliese y queso Caprino del Piemonte (Rizzello et al. 2005) inhibieron el crecimiento de *L. innocua*. Por otro lado, Aguilar-Toalá et al., (2022) reportaron en Queso Crema de Chiapas la presencia de péptidos derivados de lactoferrina, estas moléculas se han identificado como antimicrobianas por Bruni et al., (2016) y Gruden & Poklar Ulrih, (2021). Wong-Villarreal et al., (2021) han reportado que cepas específicas de *Lactobacillus* spp aisladas de queso Crema de Chiapas tuvieron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC19115. Durante la maduración del queso la hidrólisis de la caseína es producida por proteasas y peptidasas de la leche, cultivo iniciador, cuajo, microorganismos que se adquieren del ambiente, fabricación y maduración (Banihashemi et al., 2020; Fox, 1989) por mencionar algunas.

En este estudio se observó que la actividad antimicrobiana disminuyó en el último tiempo de maduración. Rizzello et al., (2005) informaron que la actividad

antimicrobiana disminuyó a medida que transcurrió el tiempo de maduración, esto debido a que una proteólisis intensa puede causar la ruptura de secuencias biológicamente activas. Demers-Mathieu et al. (2013) encontraron que el extracto enriquecido con péptidos aniónicos obtenidos a partir de proteínas de suero de leche disminuyó el crecimiento de *L. innocua* a los 7 d y *L. monocytogenes* a los 19 d debido a una mayor hidrólisis.

Cuadro 6. Comparaciones múltiples por pares para las actividades antimicrobianas en extractos de queso para *L. innocua* ATCC3309 a diferentes tiempos de maduración.

TIEMPO (d)	Media de rangos
81	2.500a
13	7.500b
47	9.500b ^z

^z= Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas.

4.6.2. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos contra *Escherichia coli* K12

Las actividades antimicrobianas de los extractos de queso para *E. coli* K12 no mostraron diferencias significativas en los tres tiempos de maduración. En los tiempos T1 y T2 la actividad antimicrobiana fue de 0 %, mientras que en el T3 se encontró una actividad antimicrobiana de 13.18 %. Torres-Salas et al., (2021) reportaron que la cepa de *E. coli* K12 fue inhibida por el extracto de queso Zacazonapan de 30 d de maduración (7.16 %). Aguilar-Toalá et al., (2017) reportaron que el extracto obtenido de leche fermentada con la cepa de *Lactobacillus* 26 tuvo la mayor inhibición de crecimiento (44.68 %) de *E. coli*. Por otro lado, Pritchard et al. (2010), encontraron que los péptidos obtenidos de extractos de queso Cheddar mayores a 10 kDa tuvieron el mayor porcentaje de inhibición (20 %) contra *E. coli*; Fialho et al. (2018) encontraron en extractos de queso Mineiro, seis péptidos con actividad antimicrobiana contra *E. coli* a lo largo de la maduración (9, 23 y 30 días) y contenían principalmente prolina. Finalmente, la inhibición del crecimiento de *E. coli* ha sido reportada para extractos de queso

Gouda y Mozzarella (Théolier et al., 2014), extracto de queso Coalho (Silva et al., 2012) y extracto de queso Koopeh (Banihashemi et al., 2020).

4.6.3. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos contra *Micrococcus luteus* CDBBB1018

Las actividades antimicrobianas de los extractos de queso para *M. luteus* CDBBB1018 mostraron diferencias ($p < 0.05$) en los tres tiempos de maduración, formándose dos grupos. En los tiempos T1 y T3, los extractos de queso tuvieron la menor actividad antimicrobiana para *M. luteus* ($p < 0.05$) y las mayores actividades ($p < 0.05$) se encontraron en los tiempos T2 y T3, como se observa en el cuadro 7. En el estudio realizado por Torres-Salas et al., (2021) reportaron que los extractos de queso Zacazonapan tuvieron valores de porcentaje de inhibición para *M. luteus* en el tiempo de 30 d de 20.22 % y para 180 d de 20.54 %.

Cuadro 7. Comparaciones múltiples por pares para las actividades antimicrobianas en extractos de queso para *M. luteus* CDBBB1018 a diferentes tiempos de maduración.

Tiempo (d)	Media de rangos
13	3.500a
81	7.000ab
47	9.000b ^z

^z= Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas.

Las cepas de *L. innocua* ATCC3309 y *M. luteus* CDBBB1018 son gram positivas y *E. coli* K12 es una cepa gram negativa, las cuales tuvieron mayor resistencia antimicrobiana Saxena et al., (2023) y Zhou et al., (2023), debido a que en la membrana externa se encontraron purinas que crearon canales pequeños en la membrana y permitieron el transporte pasivo de moléculas hidrófilas con una masa molecular >600 Da, como aminoácidos y azúcares. Por otro lado, Rohde, (2024) reportaron que las cepas gram positivas tienen una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano con carga negativa que

interacciona con los péptidos catiónicos. Malanovic & Lohner, (2016) informaron que los péptidos antimicrobianos catiónicos se unen a ácidos lipoteicoicos y otros componentes cargados negativamente.

4.6.4. Comparación entre queserías de la actividad microbiana del queso crema de Chiapas

En los Cuadros 8, 9 y 10 se muestran los estadísticos U para las pruebas de Mann-Whitney y sus respectivas significancias, para la actividad antimicrobiana de los extractos de queso aplicadas a las tres cepas estudiadas. Las actividades antimicrobianas de extractos de queso no mostraron diferencias significativas entre queserías (Vaquero® y Santa Cruz®) cuando se adicionan por separado cepas de *L. innocua* ATCC3309, *E. coli* K12 y *M. luteus* CDBBB1018. No hay estudios que relacionen quesería con actividad antimicrobiana. Sin embargo, el resultado puede deberse a la proximidad geográfica de las queserías; el proceso de elaboración tiene poca variación y las características fisicoquímicas de la leche podrían ser muy similares. Keyf et al., (2023) han reportado que, en queso blanco de Turquía, el potencial de las bioactividades tales como: antioxidante, inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, inhibición de la actividad α -amilasa y α -glucosidasa pueden variar dependiendo de la región de producción. Por otro lado, Helal & Tagliazucchi, (2023) han informado que la hidrólisis de proteínas es diferente entre tipos de quesos debido a factores tales como: tecnología utilizada, condiciones de elaboración, tiempo de maduración y bacterias presentes, lo cual puede producir diferentes péptidos.

Cuadro 8. Prueba de Mann-Whitney para actividad antimicrobiana para *Listeria innocua* ATCC3309 entre queserías.

U	18
Valor esperado	18
valor-p (bilateral)	0.948 ^z

^z= $p \leq 0.05$ indica diferencia estadística entre las medianas.

Cuadro 9. Prueba de Mann-Whitney para actividad antimicrobiana para *Escherichia coli* K12 entre queserías.

U	12
Valor esperado	18
valor-p (bilateral)	0.455 ^z

^z= p≤0.05 indica diferencia estadística entre las medianas.

Cuadro 10. Prueba de Mann-Whitney para actividad antimicrobiana para encontrar diferencia antimicrobiana entre los extractos de queso entre quesería cuando se adiciona *Micrococcus luteus* CDBBB1018.

U	22
Valor esperado	18
valor-p (bilateral)	0.545 ^z

^z= p≤0.05 indica diferencia estadística entre las medianas.

4.7. Análisis de datos de actividad antiinflamatoria

Los valores promedios de las actividades antiinflamatorias en los tres diferentes tiempos de maduración fueron: para T1 de 44.83, T2 de 543 y para T3 fue de 576.33 µg/mL de equivalentes de DS. La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencia ($p < 0.05$) en las actividades antiinflamatorias de los extractos de queso para los diferentes tiempos, formándose dos grupos. El T1 y el T2 tuvieron la menor actividad antiinflamatoria ($p < 0.05$) y las mayores actividades ($p < 0.05$) se encontraron en los tiempos T2 y el T3, como se observa en el cuadro 11. Aguilar-Toalá et al., (2017) reportaron que los extractos de leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus* spp., presentaron valores de actividad antiinflamatoria entre 559.61 a 1759.43 µg/mL de equivalentes de DS; una vez que el extracto fue ultrafiltrado, las fracciones <3 kDa tuvieron una actividad antiinflamatoria entre 650 a 2112.3 µg/mL de equivalentes de DS. Los mismos autores señalan que la actividad fue debida a que los péptidos derivados de productos lácteos al unirse a la albúmina de huevo le confirieron un efecto protector contra el calor y pH, evitando que se alterara la estructura terciaria, al modificarse los puentes disulfuro.

Cuadro 11. Comparaciones múltiples por pares de la actividad antiinflamatoria a diferentes tiempos de maduración del Queso Crema de Chiapas.

Tiempo (d)	Media de rangos
13	4.417a
47	11.250ab
81	12.833b ^z

^z= Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas.

La actividad antiinflamatoria en queso Crema de Chiapas aumentó con la maduración. No hay información publicada para la actividad antiinflamatoria de extractos de cualquier queso fresco o madurado con la técnica espectroscópica que se utilizó en este estudio. Sin embargo, Helal et al., (2023) descubrieron que en queso Ras el número de péptidos identificados disminuyó con el tiempo, a los 30 d se reportaron 905 péptidos y a los 180 d se encontraron 756 péptidos; los péptidos más abundantes a lo largo del tiempo de maduración fueron los provenientes de β -caseína y α_{s1} -caseína. Por otro lado, Öztürk et al., (2022) encontraron que durante la maduración del queso Tulum, los péptidos liberados de α_s -caseína y β -caseína disminuyeron; y los péptidos de k-caseína permanecieron estables.

Por otro lado, las actividades biológicas de péptidos hidrolizados de caseína de queso dependen de las bacterias presentes en la maduración del queso. Solieri et al., (2020) distinguieron 44 péptidos en queso Parmigiano Reggiano, que se originaron por bacterias ácido lácticas (BAL). El género *Lactobacillus* es el más común en la producción de péptidos (Hafeez et al., 2014) debido a que contiene más de una proteinasa de la pared celular (CEP), las cuales son preproproteinases de ~ 2000 aminoácidos de 6 a 8 dominios funcionales (Solieri et al., 2022). Sharma et al., (2020) encontraron en *Lactobacillus* cuatro parálogos de PrtH (1,2,3 y 4); sin embargo, pueden existir otras variantes debido a que se han identificado 60 genes pertenecientes a la CEP. Por otro lado, Broadbent et al., (2011) mencionaron que las variaciones en la actividad de peptidasas y

metabolismo de aminoácidos en cepas de *Lactobacillus* se atribuyen a una combinación de mutaciones y polimorfismos que afectan el nivel de expresión genética, especificidad o actividad de las enzimas (Broadbent et al., 2011). Por ello, los resultados serán diferentes dependiendo del tipo de queso.

Los estudios reportados, hasta ahora, en la literatura se han enfocado principalmente en la actividad antiinflamatoria de cepas específicas en productos lácteos. *Streptococcus thermophilus* utilizada para la fabricación de productos fermentados como yogur y queso tiene actividad antiinflamatoria a través de la modulación de mediadores proinflamatorios (Allouche et al., 2022). *Lactobacillus helveticus* aislada de quesos italianos (Zago et al., 2021) y *Propionibacterium freudenreichii*, un iniciador lácteo de queso tipo suizo, tuvieron actividad antiinflamatoria en líneas celulares (Deutsch et al., 2017).

La actividad antiinflamatoria entre el Queso Vaquero® y Queso Santa Cruz® no tuvo diferencia ($p > 0.05$) como se muestra en el Cuadro 12. Los resultados en queso Crema de Chiapas pueden deberse a la poca variación en los procesos de elaboración entre queserías y a su proximidad geográfica, como ya se mencionó anteriormente. También Moreno-Indias et al., (2009) determinaron que en suero de queso elaborado industrialmente y en granjas queseras no se encontraron diferencias en β y α lactoglobulina, relacionadas con actividad antiinflamatoria (Yamaguchi et al., 2014; Bamdad et al., 2017). Por otro lado, la alimentación del ganado modifica a los microorganismos del rumen y a la síntesis de proteínas en la glándula mamaria (Alothman et al., 2019; Lima et al., 2023). La cantidad y abundancia de las BAL presentes en las queserías varían durante la elaboración y maduración del queso, lo cual afectará la cantidad y tipo de péptidos (Korena et al., 2023).

Cuadro 12. Prueba de Mann-Whitney para actividad antiinflamatoria entre queserías.

U	23.500
Valor esperado	40.500
valor-p (bilateral)	0.140 ^z

^z= $p \leq 0.05$ indica diferencia estadística entre las medianas.

4.8. Conclusiones

Los extractos de queso Crema de Chiapas mostraron actividad antimicrobiana para cepas de *L. innocua* ATCC3309 y *M. luteus* CDBBB1018. Sin embargo, la inhibición del crecimiento microbiano por los extractos de queso dependió del tiempo de maduración, presentándose las mayores inhibiciones a los 47 d. Por otro lado, la actividad antiinflamatoria fue mayor a los 47 y 81 d de maduración. Entre queserías no se observaron diferencias en las actividades antimicrobianas y antiinflamatorias. El queso crema de Chiapas es una fuente de péptidos bioactivos que debe ser explorada. Sin embargo, se necesitan más estudios donde se puedan identificar los mecanismos de acción de los péptidos, obtener información sobre la relación estructura-bioactividad empleando técnicas como la resonancia magnética nuclear; y finalmente, la actividad biológica de los péptidos deberá validarse con estudios *in vivo*.

4.9. Literatura citada

- Aguilar-Toalá, J. E., Astiazarán-García, H., Estrada-Montoya, M. C., García, H. S., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2019). Modulatory Effect of the Intracellular Content of *Lactobacillus casei* CRL 431 Against the Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress in Rats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 470-477. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9433-8>
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846>
- Aguilar-Toalá, J. E., Torres-Llanez, M. J., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2022). Antioxidant capacity and identification of radical scavenging peptides from Crema de Chiapas, Fresco and Cocido cheeses. *Journal of Food Science and Technology*, 59(7), 2705-2713. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05291-2>
- Allouche, R., Genay, M., Dary-Mouro, A., Hafeez, Z., & Miclo, L. (2022). Cell Proteins Obtained by Peptic Shaving of Two Phenotypically Different Strains of *Streptococcus thermophilus* as a Source of Anti-Inflammatory Peptides. *Nutrients*, 14(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/nu14224777>
- Alothman, M., Hogan, S. A., Hennessy, D., Dillon, P., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M., Tobin, J., Fenelon, M. A., & O'Callaghan, T. F. (2019). The "Grass-Fed" Milk Story: Understanding the Impact of Pasture Feeding on

- the Composition and Quality of Bovine Milk. *Foods*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/foods8080350>
- Bamdad, F., Bark, S., Kwon, C. H., Suh, J.-W., & Sunwoo, H. (2017). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Peptides Released from β -Lactoglobulin by High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Hydrolysis. *Molecules*, 22(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/molecules22060949>
- Banihashemi, S. A., Nikoo, M., Ghasempour, Z., & Ehsani, A. (2020). Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101798. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798>
- Barampouti, E. M., Mai, S., Moustakas, K., Malamis, D., & Loizidou, M. (2021). CHAPTER 3—Status and perspectives of agricultural residues in a circular and resource-efficient context. En V. Tyagi & K. Aboudi (Eds.), *Clean Energy and Resources Recovery* (pp. 49-102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85223-4.00018-X>
- Bassoli, A., Borgonovo, G., Caremoli, F., & Mancuso, G. (2014). The taste of D- and L-amino acids: In vitro binding assays with cloned human bitter (TAS2Rs) and sweet (TAS1R2/TAS1R3) receptors. *Food Chemistry*, 150, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.106>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Broadbent, J. R., Cai, H., Larsen, R. L., Hughes, J. E., Welker, D. L., De Carvalho, V. G., Tompkins, T. A., Ardö, Y., Vogensen, F., De Lorentiis, A., Gatti, M., Neviani, E., & Steele, J. L. (2011). Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4313-4328. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4068>
- Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M. D., Black, D. S., Walsh, W. R., & Kumar, N. (2020). A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
- Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraudo, L., Corona, A., & Dosio, F. (2016). Antimicrobial Activity of Lactoferrin-Related Peptides and Applications in Human and Veterinary Medicine. *Molecules*, 21(6), 752. <https://doi.org/10.3390/molecules21060752>
- Demers-Mathieu, V., Gauthier, S. F., Britten, M., Fliss, I., Robitaille, G., & Jean, J. (2013). Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in Cheddar cheese by an anionic peptides-enriched extract from whey proteins. *International Dairy Journal*, 32(1), 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.008>
- Deutsch, S.-M., Mariadassou, M., Nicolas, P., Parayre, S., Le Guellec, R., Chuat, V., Peton, V., Le Maréchal, C., Burati, J., Loux, V., Briard-Bion, V., Jardin, J., Plé, C., Foligné, B., Jan, G., & Falentin, H. (2017). Identification of proteins involved in the anti-inflammatory properties of *Propionibacterium*

- freudenreichii* by means of a multi-strain study. *Scientific Reports*, 7, 46409. <https://doi.org/10.1038/srep46409>
- Durango-Zuleta, M. M., Fuentes-Vanegas, M., Sepúlveda-Valencia, J. U., & Moreno Herrera, C. X. (2022). Isolation, identification, and antimicrobial activity of lactic acid bacteria associated with two traditional Colombian types of cheese: Quesillo and double-cream cheese. *LWT*, 171, 114119. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114119>
- Fialho, T. L., Carrijo, L. C., Magalhães Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., Piccoli, R. H., & de Abreu, L. R. (2018). Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*, 107, 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.009>
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening1. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379-1400. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8)
- González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, Á. M., De la Rosa-Alcaraz, M. de los Á., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3250-3262. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>
- González-González, C. R., Machado, J., Correia, S., McCartney, A. L., Stephen Elmore, J., & Jauregi, P. (2019). Highly proteolytic bacteria from semi-ripened Chiapas cheese elicit angiotensin-I converting enzyme inhibition and antioxidant activity. *LWT*, 111, 449-456. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.039>
- Gruden, Š., & Poklar Ulrih, N. (2021). Diverse Mechanisms of Antimicrobial Activities of Lactoferrins, Lactoferricins, and Other Lactoferrin-Derived Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/ijms222011264>
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., & Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.002>
- Helal, A., Cattivelli, A., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2023). Effect of Ripening and In Vitro Digestion on Bioactive Peptides Profile in Ras Cheese and Their Biological Activities. *Biology*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biology12070948>
- Helal, A., & Tagliazucchi, D. (2023). Peptidomics Profile, Bioactive Peptides Identification and Biological Activities of Six Different Cheese Varieties. *Biology*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/biology12010078>
- Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. Isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8285-8293. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10104>

- Iwaniak, A., & Mogut, D. (2020). Metabolic Syndrome-Preventive Peptides Derived from Milk Proteins and Their Presence in Cheeses: A Review. *Applied Sciences*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/app10082772>
- Keyf, P., Uğurlu, Ö., Erkin, Ö. C., Aydemir, L. Y., & Erbay, Z. (2023). Bioactive potential of ripened white cheeses manufactured in different geographical regions of Turkey. *Journal of Food Science*, 88(11), 4731-4744. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16793>
- Korecna, K., Krzyzankova, M., Florianova, M., Karasova, D., Babak, V., Strakova, N., & Juricova, H. (2023). Microbial Succession in the Cheese Ripening Process—Competition of the Starter Cultures and the Microbiota of the Cheese Plant Environment. *Microorganisms*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071735>
- Lima, J., Ingabire, W., Roehe, R., & Dewhurst, R. J. (2023). Estimating Microbial Protein Synthesis in the Rumen—Can ‘Omics’ Methods Provide New Insights into a Long-Standing Question? *Veterinary Sciences*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/vetsci10120679>
- Liu, G., Thomsen, L. E., & Olsen, J. E. (2022). Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: A mini-review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 556-567. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab450>
- Luo, Q., Ding, N., Liu, Y., Zhang, H., Fang, Y., & Yin, L. (2023). Metabolic Engineering of Microorganisms to Produce Pyruvate and Derived Compounds. *Molecules*, 28(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/molecules28031418>
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals*, 9(3), 59. <https://doi.org/10.3390/ph9030059>
- McKnight, P. E., & Najab, J. (2010). Kruskal-Wallis Test. En *The Corsini Encyclopedia of Psychology* (pp. 1-1). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0491>
- McSweeney, P. L. H. (2007). 1—Cheese manufacture and ripening and their influence on cheese flavour. En B. C. Weimer (Ed.), *Improving the Flavour of Cheese* (pp. 1-25). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845693053.1>
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
- Miller, M. A., & Zachary, J. F. (2017). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 2-43.e19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1>
- Moreno-Indias, I., Castro, N., Morales-de-laNuez, A., Sánchez-Macías, D., Assunção, P., Capote, J., & Argüello, A. (2009). Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition1. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4792-4796. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2215>

- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nielsen, S. D.-H., Liang, N., Rathish, H., Kim, B. J., Lueangsakulthai, J., Koh, J., Qu, Y., Schulz, H.-J., & Dallas, D. C. (2023). Bioactive milk peptides: An updated comprehensive overview and database. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1-20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2240396>
- Öztürk, H. İ., Oraç, A., & Akin, N. (2022). Characterization of bioactive peptides derived from goatskin Tulum cheese of the Ereğli region at different stages of ripening. *Food Research International*, 162, 112124. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112124>
- Pontonio, E., Montemurro, M., De Gennaro, G. V., Miceli, V., & Rizzello, C. G. (2021). Antihypertensive Peptides from Ultrafiltration and Fermentation of the Ricotta Cheese Exhausted Whey: Design and Characterization of a Functional Ricotta Cheese. *Foods*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/foods10112573>
- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545-1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rangel, A. H. do N., Bezerra, D. A. F. V. de A., Sales, D. C., Araújo, E. de O. M., Lucena, L. M. de, Porto, A. L. F., Vêras, Í. V. U. M., Lacerda, A. F., Ribeiro, C. V. D. M., & Anaya, K. (2023). An Overview of the Occurrence of Bioactive Peptides in Different Types of Cheeses. *Foods*, 12(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/foods12234261>
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348-2360. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72913-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1)
- Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Astiazaran-García, H., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2013). Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4094-4099. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6014>
- Rohde, M. (2024). Chapter 3—Bacterial ultrastructure. En Y.-W. Tang, M. Y. Hindiyeh, D. Liu, A. Sails, P. Spearman, & J.-R. Zhang (Eds.), *Molecular Medical Microbiology (Third Edition)* (pp. 23-43). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00163-5>
- Salam, Md. A., Al-Amin, Md. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*, 11(13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>

- Saxena, D., Maitra, R., Bormon, R., Czekanska, M., Meiers, J., Titz, A., Verma, S., & Chopra, S. (2023). Tackling the outer membrane: Facilitating compound entry into Gram-negative bacterial pathogens. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 1(1), 1-22. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00016-1>
- Sezer, Ç., & Güven, A. (2009). Investigation of Bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars (Turkey)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TR2010001733>
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040106>
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., Cavalcanti, M. T. H., & Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135(3), 1533-1538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058>
- Solieri, L., Baldaccini, A., Martini, S., Bianchi, A., Pizzamiglio, V., & Tagliazucchi, D. (2020). Peptide Profiling and Biological Activities of 12-Month Ripened Parmigiano Reggiano Cheese. *Biology*, 9(7), 170. <https://doi.org/10.3390/biology9070170>
- Solieri, L., Sola, L., Vaccalluzzo, A., Randazzo, C. L., Martini, S., & Tagliazucchi, D. (2022). Characterization of Cell-Envelope Proteinases from Two *Lactocaseibacillus casei* Strains Isolated from Parmigiano Reggiano Cheese. *Biology*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/biology11010139>
- Tagliazucchi, D., Martini, S., & Solieri, L. (2019). Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Fermentation*, 5(4), 96. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040096>
- Tao, S., Chen, H., Li, N., Wang, T., & Liang, W. (2022a). The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2022, 3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>
- Tao, Y., Murakami, Y., Vavvas, D. G., & Sonoda, K.-H. (2022b). Necroptosis and Neuroinflammation in Retinal Degeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2022.911430>
- Temussi, P. A. (2012). The good taste of peptides: PEPTIDES TASTE. *Journal of Peptide Science*, 18(2), 73-82. <https://doi.org/10.1002/psc.1428>
- Theodorsson-Norheim, E. (1986). Kruskal-Wallis test: BASIC computer program to perform nonparametric one-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several independent samples. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 23(1), 57-62. [https://doi.org/10.1016/0169-2607\(86\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0169-2607(86)90081-7)
- Théolier, J., Hammami, R., Fliss, I., & Jean, J. (2014). Antibacterial and antifungal activity of water-soluble extracts from Mozzarella, Gouda, Swiss, and

- Cheddar commercial cheeses produced in Canada. *Dairy Science & Technology*, 94(5), 427-438. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0170-9>
- Thierry, A., Collins, Y. F., Abeijón Mukdsi, M. C., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G., & Spinnler, H. E. (2017). Chapter 17—Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese BT - Cheese (Fourth edition). En *Cheese* (Fourth Edi). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4/00017-X>
- Torres-Salas, V., Hernández-Rodríguez, B. E., Hernández-Montes, A., Castillo, E., Zuleta-Prada, H., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Solid-state NMR spectroscopy for disentangling structural and motional features of lyophilized ripened cheese water-soluble extracts related to antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 334, 127603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127603>
- USDA (2024) *Mexico: Dairy and Products Semi-annual | USDA Foreign Agricultural Service*. Recuperado 19 de febrero de 2024, de <https://fas.usda.gov/data/mexico-dairy-and-products-semi-annual-7>
- Villegas de Gante A., Moreno, O. L., & Escoto, F. C. (2015). Valorización de los acompañamiento y gastronomía. Editorial del Colegio de Postgraduados.
- Viana de Souza, J., & Silva Dias, F. (2017). Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 13, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.003>
- Wong-Villarreal, A., Corzo-González, H., Hernández-Núñez, E., González-Sánchez, A., & Giacomán-Vallejos, G. (2021). Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México. *CienciaUAT*, 144-155. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1368>
- Xia, Y. (2020). Chapter Eleven—Correlation and association analyses in microbiome study integrating multiomics in health and disease. En J. Sun (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 171, pp. 309-491). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.04.003>
- Xuan, J., Feng, W., Wang, J., Wang, R., Zhang, B., Bo, L., Chen, Z.-S., Yang, H., & Sun, L. (2023). Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resistance Updates*, 68, 100954. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100954>
- Yamaguchi, M., Takai, S., Hosono, A., & Seki, T. (2014). Bovine milk-derived α -lactalbumin inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sodium sulfate-treated mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(4), 672-679. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.890034>
- Zago, M., Massimiliano, L., Bonvini, B., Penna, G., Giraffa, G., & Rescigno, M. (2021). Functional characterization and immunomodulatory properties of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Italian hard cheeses. *PLoS ONE*, 16(1), e0245903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245903>
- Zhang, J., Liu, Y., Jiang, L., Zhao, T., Su, G., & Zhao, M. (2023). Exploring the Release of Elastin Peptides Generated from Enzymatic Hydrolysis of

Bovine Elastin via Peptide Mapping. *Molecules*, 28(22), 7534.
<https://doi.org/10.3390/molecules28227534>

Zhou, G., Wang, Q., Wang, Y., Wen, X., Peng, H., Peng, R., Shi, Q., Xie, X., & Li, L. (2023). Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microorganisms*, 11(7), Article 7.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071690>

5. METABOLÓMICA BASADA EN RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE QUESOS CREMA DE CHIAPAS.

5.1. Resumen

En el presente estudio se implementó un modelo discriminante para diferenciar quesos -con denominación “Queso Crema de Chiapas”- producidos en diferentes tiempos de maduración y obtenidos de dos proveedurías (Vaquero y Santa Cruz.), por metabolómica basada en resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis estadísticos multivariados. El conjunto de datos consistió en dos matrices metabolómicas: i) selección de señales dentro de todo el rango de desplazamientos químicos ($\delta^1\text{H}$) de los espectros de hidrógeno a una dimensión (1D- ^1H RMN) y ii) selección de señales únicamente de la región de hidrógenos aromáticos entre 6-9 ppm de $\delta^1\text{H}$. El análisis de datos se realizó mediante métodos estadísticos multivariados no supervisados por análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminantes supervisados por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y análisis discriminante de estructuras latentes por proyecciones ortogonales (OPLS-DA). También se obtuvieron dendogramas entre variables, análisis por clusters (grupos) jerárquicos (HCA) y gráficas de variable que influye en la proyección (VIP) utilizando MetaboAnalyst. Se encontró que los modelos PLS-DA y OPLS-DA donde se utilizó la región aromática con respecto a tiempo de maduración y quesería fueron muy discriminantes. Se encontraron 15 desplazamientos químicos discriminantes por gráfica de VIP en tres tiempos de maduración T1 = 13, T2 = 47 y T3 = 81 días. Los desplazamientos más discriminantes para queso Crema de Chiapas en la maduración cuando se utilizaron todos los desplazamientos químicos: 3.21, 3.20, 1.74 y 1.75 ppm y cuando se usó la región aromática 7.28, 6.75, 7.26 y 7.27 ppm. Por otro lado, los desplazamientos químicos que contribuyeron a separar queserías cuando se utilizó todo el rango de desplazamientos correspondieron a 3.06, 3.54, 2.78 y 2.77 ppm y cuando se empleó la región aromática fueron 7.20, 7.20, 6.74 y 7.07 ppm. En el T1 donde se utilizó la región aromática y en queso Vaquero se encontraron una mayor concentración de metabolitos.

Palabras clave: quesos madurados, resonancia magnética nuclear, análisis estadísticos multivariados.

METABOLOMICS BASED ON NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE OF CREAM CHEESES FROM CHIAPAS.

Abstract

In the present study, a discriminant model was implemented to differentiate cheeses -with the denomination “Queso Crema de Chiapas”- produced at different maturation times and obtained from two different suppliers, by metabolomics based on nuclear magnetic resonance (NMR) and multivariate statistical analysis. The data set consisted of two metabolomic matrices: i) selection of signals within the entire range of chemical shifts ($\delta^1\text{H}$) of the one-dimensional hydrogen spectra (1D- ^1H NMR) and ii) selection of signals only from the region of aromatic hydrogens between 6-9 ppm from $\delta^1\text{H}$. Data analysis was performed using unsupervised multivariate statistical methods by principal component analysis (PCA) and supervised partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and latent structure discriminant analysis by orthogonal projections (OPLS-DA). Inter-variate dendograms, hierarchical cluster analysis (HCA) and projection-influencing variable (VIP) plots were also obtained using MetaboAnalyst. PLS-DA and OPLS-DA models where the aromatic region was used with respect to ripening time and cheesemaking were found to be highly discriminant. Fifteen discriminant chemical shifts per VIP plot were found at three ripening times T1 = 13, T2 = 47 and T3 = 81 days. The most discriminating shifts for Queso Crema de Chiapas at ripening when all chemical shifts were used were 3.21, 3.20, 1.74 and 1.75 ppm and when the aromatic region was used 7.28, 6.75, 7.26 and 7.27 ppm. On the other hand, the chemical shifts that contributed to separate cheeses when the whole range of shifts was used corresponded to 3.06, 3.54, 2.78 and 2.77 ppm and when the aromatic region was used were 7.20, 7.20, 6.74 and 7.07 ppm. A higher concentration of metabolites was found in T1 where the aromatic region was used and in Vaquero cheese.

Key words: matured cheeses, nuclear magnetic resonance, multivariate statistical analysis.

5.3. Introducción

La metabolómica en alimentos consiste en el estudio del metaboloma que se compone de moléculas <1500 Da (Wu et al., 2022; Danzi et al., 2023) entre las que se encuentran compuestos que contribuyen sensorialmente a los alimentos tales como: carbohidratos, ácidos orgánicos, lípidos, péptidos, aminoácidos (Selamat et al., 2021) y compuestos volátiles (Wu et al., 2022); así como otros compuestos que demeritan la calidad del alimento tales como: toxinas, hormonas, pesticidas o residuos de medicamentos (Wu et al., 2022).

Los extractos de queso para la determinación de diferentes bioactividades tales como: antimicrobiana (Torres-Salas et al., 2021), antioxidante y actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (Meira et al., 2012), han sido liofilizados y posteriormente rehidratados para evitar que los péptidos se desestabilicen debido a factores tales como: pH, temperatura, exposición a las radiaciones UV y presencia de proteasas (Tortorella et al., 2023). Una solución a esta problemática ha sido la liofilización de proteínas debido a que les proporciona mayor estabilidad a la desnaturalización y precipitación (Emami et al., 2018). Sin embargo, la congelación y deshidratación pueden provocar alteración de la estructura de las proteínas (Emami et al., 2018). Para evitar lo anterior, se propone el estudio de bioactividades en el extracto acuoso utilizando resonancia magnética nuclear (RMN).

El espectrómetro de RMN se compone de un imán superconductor que genera un campo magnético, una sonda de muestra, un transmisor de radiofrecuencia, un receptor y una computadora para el control del instrumento y el procesamiento de datos (Bai, 2016). El flujo de trabajo de la metabolómica con RMN tiene una fase preanalítica que consiste en la recolección y preparación de muestras, adquisición de datos y procesamiento de datos (Huang et al., 2022) utilizando diferentes plataformas; para el análisis no supervisado se utiliza el PCA y para el supervisado el PLS-DA y el OPLS-DA (Corsaro et al., 2022).

La metabolómica utilizando RMN ha contribuido a conocer la composición de extractos de queso. En queso tipo Camembert reportaron señales con ^1H RMN

del agua, grasa y caseína durante la maduración (Kharbanda et al., 2023). La ^1H RMN se ha utilizado para diferenciar queso Parmigiano Reggiano (Cavallini et al., 2023) y queso Graviere (Ralli & Spyros, 2023) por región de origen. Kandasamy et al., (2020) encontraron en once tipos de quesos 29 metabolitos en los tiempos de maduración de 3 y 6 meses. En queso Fiore Sardo se observó que los cultivos iniciadores producen un perfil metabolómico diferente (Piras et al., 2013). Diferenciaron la movilidad de péptidos antimicrobianos a lo largo del tiempo de maduración (Torres-Salas et al., 2021). El presente trabajo tiene como objetivo generar modelos discriminantes de extractos de queso en base al tiempo de maduración y a la quesería, con la finalidad de identificar los desplazamientos que son más discriminantes.

5.4. Materiales y métodos

5.4.1. Obtención de extractos

Los extractos se obtuvieron de quesos de dos queserías Queso Vaquero® y Queso Santa Cruz® durante tres tiempos de maduración T1 = 13, T2 = 47 y T3 = 81 días (d), con tres repeticiones cada uno (n = 18). La metodología utilizada para la extracción fue la descrita por Torres-Salas et al., (2020) con modificaciones. 250 g de queso se homogeneizaron con 750 mL de agua destilada utilizando una licuadora (Osterizer, N L, México) durante 5 min, la mezcla se incubó a 40 °C en una parrilla (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) con agitación de 150 rpm, durante 60 min. De acuerdo a las recomendaciones de Meira et al. (2012) y Pontonio et al. (2021) se realizaron dos centrifugaciones, utilizando una centrifuga 5810 R (Eppendorf, NJ, EE. UU) a 8000×g durante 15 min a 4 °C, entre centrifugaciones se filtró la fase acuosa a través de una capa de algodón estéril. El pH del sobrenadante o fase acuosa de la primera centrifugación se ajustó a pH de 4.5, adicionando NaOH 1 M y HCl 1 M. Después de la segunda centrifugación el sobrenadante se filtró por gravedad usando papel filtro grado 589/3 a 4 °C. Posteriormente, los extractos se almacenaron a -20°C (Rizzello et al., 2005).

5.4.2. Adquisición ^1H -NMR

Para todos los análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN), se utilizaron 540 microlitros de extracto de queso que fueron homogeneizados con 60 microlitros de agua deuterada (99.8 % de deuteración de átomos de ^2H) (CAS No. 7789-20-0) para tener una proporción de 90% solución acuosa por 10 % de D_2O . Todos los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance III HD de 600 MHz en frecuencia de observación de hidrógeno, equivalente a 14.1 Tesla de campo magnético.

Cada serie de experimentos RMN consistió en una primera adquisición de un espectro de hidrógeno a una dimensión estándar cuantitativo ($q\{^1\text{H}\}$ - RMN) con los siguientes parámetros: 4 transientes por adquisición, un tiempo de recuperación entre transientes de 10 segundos, un tiempo de adquisición de 2.75 segundos, una ventana espectral de 19.8 ppm (11904 Hz), un centro de ventana espectral de 6.175 ppm para producir un tiempo experimental de 53 segundos por cada espectro de referencia. De los experimentos cuantitativos de referencia $q\{^1\text{H}\}$ - RMN, se realizó un procedimiento de eliminación de señal de agua mediante un procesamiento “excitation sculpting” basado en la eliminación de señal de agua por una excitación selectiva de desfocalización de la señal de agua (Herbert-Pucheta et al., 2021; López-Aguilar et al., 2021). Los parámetros de adquisición de los espectros ^1H -RMN por desfocalización selectiva (en adelante mencionados como ^1H - RMN-ES) se enuncian a continuación: Ventana espectral de 19.8 ppm (11904 Hz), un centro de ventana espectral de 6.175 ppm, tiempo de adquisición por transiente de 2.75 segundos, un total de 64 transientes y un tiempo de recuperación de magnetización entre transientes de 10 segundos; con un tiempo experimental de 13 minutos con 30 segundos por cada experimento ^1H - RMN-ES. Cada muestra se analizó por triplicado para poder desarrollar los análisis estadísticos multivariados.

Las matrices RMN para los análisis estadísticos multivariados obtenidos a través de selección de señales en (1) todo el intervalo de desplazamiento químico o bien (2) de únicamente las señales dentro del rango de 6-9 ppm que comprenden

frecuencias ^1H de hidrógenos aromáticos se obtuvieron con el software NMRProcflow, versión 1.4.24 (Jacob et al., 2017).

5.4.3. Análisis estadístico

Se aplicó un pre-procesamiento de los datos que incluía la normalización por suma, la transformación (Log) y el autoescalado (centrado de la media dividido por la desviación estándar de cada variable). Las validaciones de los modelos PCA, PLS-DA y OPLS-DA se realizaron con 100 permutaciones por análisis. La fiabilidad del modelo, se evaluó con bondad de ajuste (R^2) y la bondad de la predicción (Q^2). Las regiones de Hotelling representadas por elipses en cada modelo definen un intervalo de confianza del 95%. Los datos se analizaron utilizando el software libre Metaboanalyst versión 5.0 (Pang et al., 2024).

5.5. Resultados y discusión

5.5.1. RMN para separar muestras por tiempo de maduración

La Figura 14A se construyó a partir de la matriz de señales de todo el rango de desplazamientos químicos, la región entre 0 y 15 ppm. El gráfico de PCA explicó el 63.5 % de la varianza total. Los componentes principales CP1 y CP2 explicaron el 39.8 % y 23.7 % de la variación, respectivamente. Por otro lado, en la Figura 14B, correspondiente al PCA a la región aromática que se encuentra entre 4.80 a 9 ppm, presentó una explicación de la variación total de los datos del 58.1 %. Los componentes CP1 y CP2 explicaron el 41.3 % y el 16.8 % de la variación, respectivamente. La separación entre tiempos de maduración $T1 = 13$, $T2 = 47$ y $T3 = 81$ d fue deficiente cuando se utilizaron todas las señales, debido a que no se observó una separación entre las elipses Hotelling con un nivel de confianza del 95 %. El modelo obtenido con la región aromática mostró tener una mejor explicación debido a que tiene una mejor distribución de las variables explicativas y representa el 58.1 % de la varianza explicada. El PCA no supervisado se utiliza generalmente para organizar la matriz de datos de RMN y para determinar correlaciones entre factores seleccionados y valores atípicos mediante la obtención de frecuencias ^1H discriminantes (López-Aguilar et al., 2021).

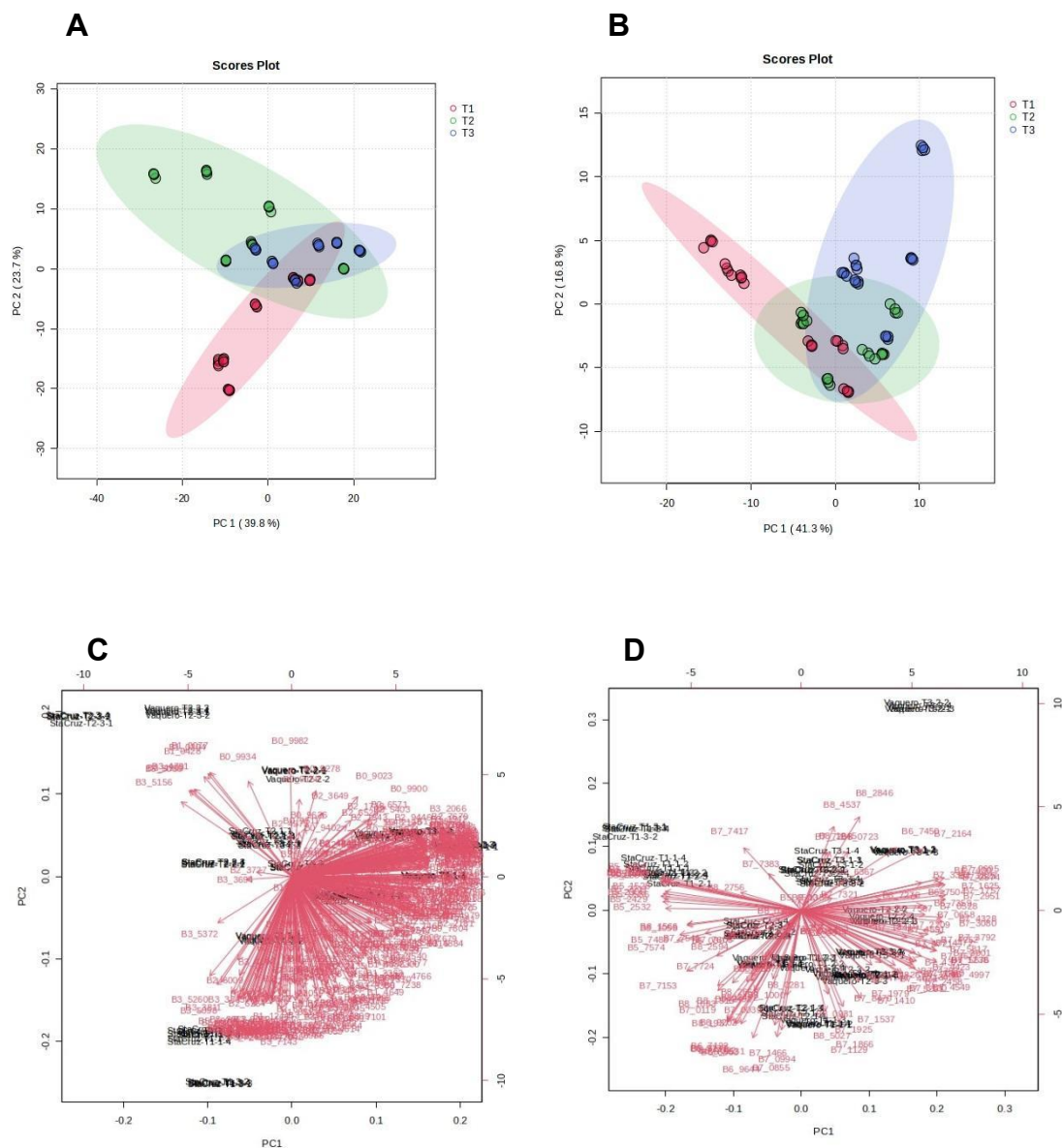


Figura 14. Proyecciones de componente principal no supervisado en la matriz seleccionando todas las regiones (A) y matriz donde se seleccionó la región aromática (B). Biplots de la matriz de datos sin selección de regiones (C) y matriz donde se seleccionó la región aromática (D).

En la Figura 14D se muestra que la matriz donde se utilizaron los compuestos aromáticos tuvo mejor dispersión de las variables explicativas con respecto a la matriz donde se usó la matriz completa sin selección de señales. La gráfica de biplots es considerada una regresión multivariada (Oyedele, 2021), un

comportamiento que se espera para muestras agrupadas es la dispersión (Greenacre, 2012).

El PLS-DA de la región completa Figura (15A) mostró discriminación en los tres tiempos de maduración analizados T1 = 13, T2 = 47 y T3 = 81 d; al analizar los gráficos de puntuación de la varianza total de 56 %, el CP1 y CP2 explican el 32.1 % y 23.9 %, respectivamente. Por otro lado, el PLS-DA de la región aromática proporcionó discriminaciones a lo largo del tiempo de maduración del Queso Crema de Chiapas (Figura 15B). Al analizar los gráficos de puntuación de la varianza total de 54.5 %, el CP1 y CP2 explican el 39.5 % y 15 %, respectivamente. La región aromática es altamente discriminante y tiene una aproximación a la varianza de la matriz con todas las regiones. La región aromática mediante $^1\text{HRMN}$ se ha usado en bebidas tales como: jugos (Herbert-Pucheta et al., 2021), vinos y mezcales (López-Aguilar et al., 2021) donde ha tenido un alto poder discriminante. Sin embargo, es conveniente realizar el análisis de diferentes regiones y elegir la más adecuada de acuerdo a la matriz alimentaria.

La RMN permitió la separación de quesos por tiempos de maduración y esto se puede identificar en parámetros tales como: varianza (%), capacidad predictiva total (Q^2) y capacidad predictiva del ajuste matemático (R^2). En la Figura 15C se observa que el modelo explica una varianza de 90 %, $Q^2=0.95$ y $R^2 = 0.95$. En la Figura 15D la explicación de la varianza total fue del 90 %, $Q^2=0.96$ y $R^2=0.97$ utilizando tres componentes principales. Lo anterior indica que, el modelo donde se utilizó la región aromática discrimina mejor que aquel que usa todas las regiones.

La diferencia en composición en el queso Crema de Chiapas a lo largo de la maduración, puede deberse a que ocurren cambios bioquímicos y modificaciones en la abundancia relativa de microorganismos, que dan como resultado el desarrollo del sabor y textura del queso (McSweeney, 2004). Diferentes rutas metabólicas se han identificado en los quesos durante la maduración,

principalmente lipólisis, proteólisis y metabolismo de lactosa, lactato y citrato (Ianni et al., 2020).

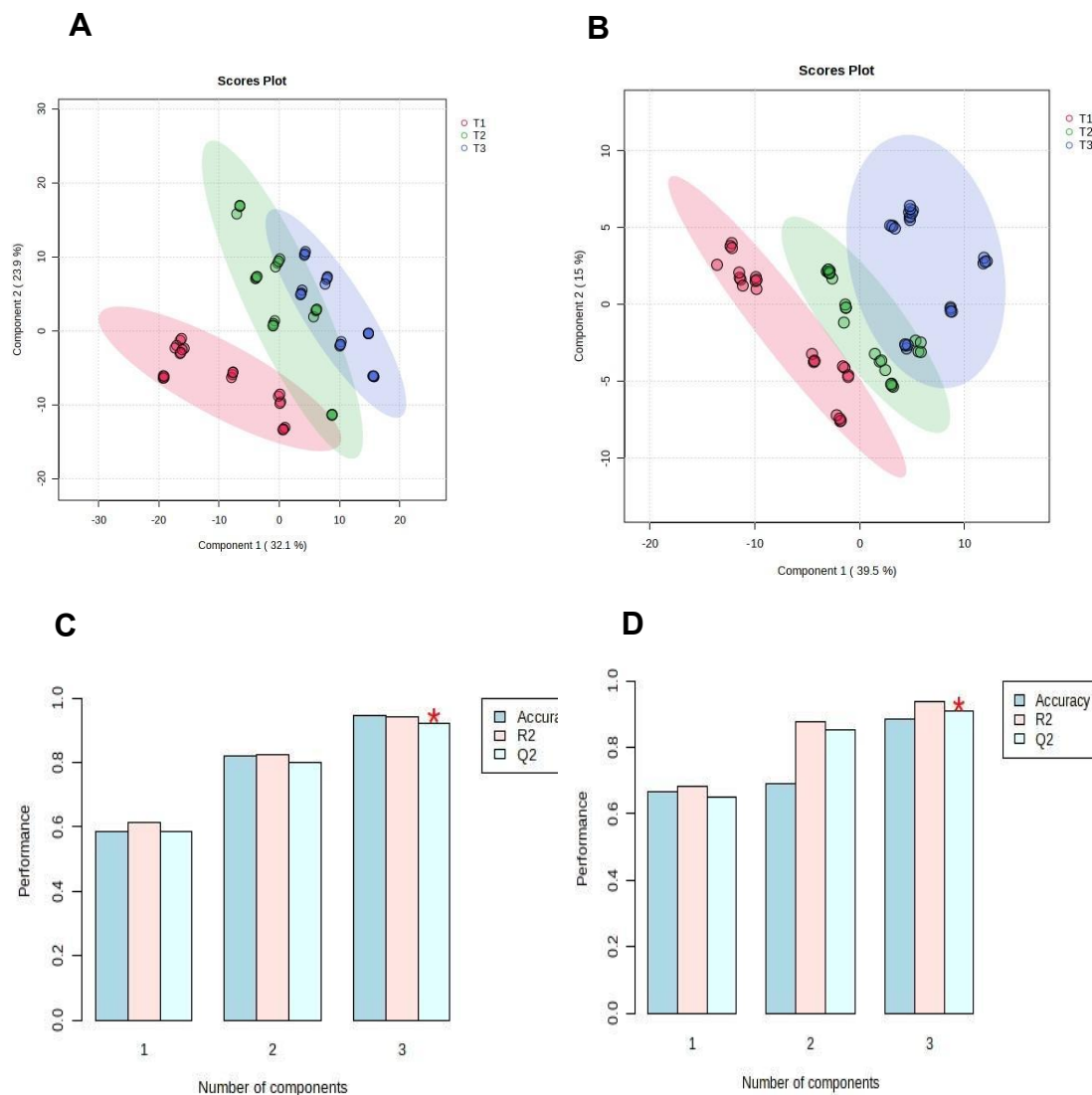


Figura 15. Proyecciones de PLS-DA (A) de la matriz donde se seleccionaron las señales dentro de todo el rango de desplazamientos químicos ($\delta^1\text{H}$) y PLS-DA (B) obtenida de la matriz donde se seleccionó la región aromática. Coeficientes $R^2\text{X}$, $R^2\text{Y}$ y Q^2 observados y con validación cruzada para PLS-DA (C y D, respectivamente).

En la gráfica de VIP Score Figura 16 se observan los desplazamientos químicos del lado izquierdo y los tiempos de maduración del lado derecho. Se identificaron 15 desplazamientos por $1\text{D-}^1\text{H}$ RMN. Las señales más discriminantes fueron: 3.21, 3.20, 1.74 y 1.75 ppm pertenecientes a la región alifática. Además, se observa que en T3 hay concentraciones más altas de compuestos. Esto puede

deberse a que durante la maduración ocurren procesos como, glucólisis, proteólisis y lipólisis donde se generan una gran cantidad de metabolitos. Por otro lado, la gráfica de VIP se construye a partir de la suma ponderada (varianza Y explicada en cada dimensión) de los cuadrados de las cargas PLS (Xia et al., 2009). Un factor que puede cambiar los desplazamientos químicos, que se presentan en la gráfica de VIP, es el método estadístico multivariado con el que se analizaron los datos (Kandasamy et al., 2020). Dado que, el PCA se obtiene a partir de la máxima varianza, mientras que el PLS-DA reduce la dimensionalidad a partir de variables identificadas previamente, (Ruiz-Pérez et al., 2020) y el OPLS-DA, se genera a partir de un modelo de regresión entre los datos multivariados y una variable de respuesta que tiene información de clase (Westerhuis et al., 2010).

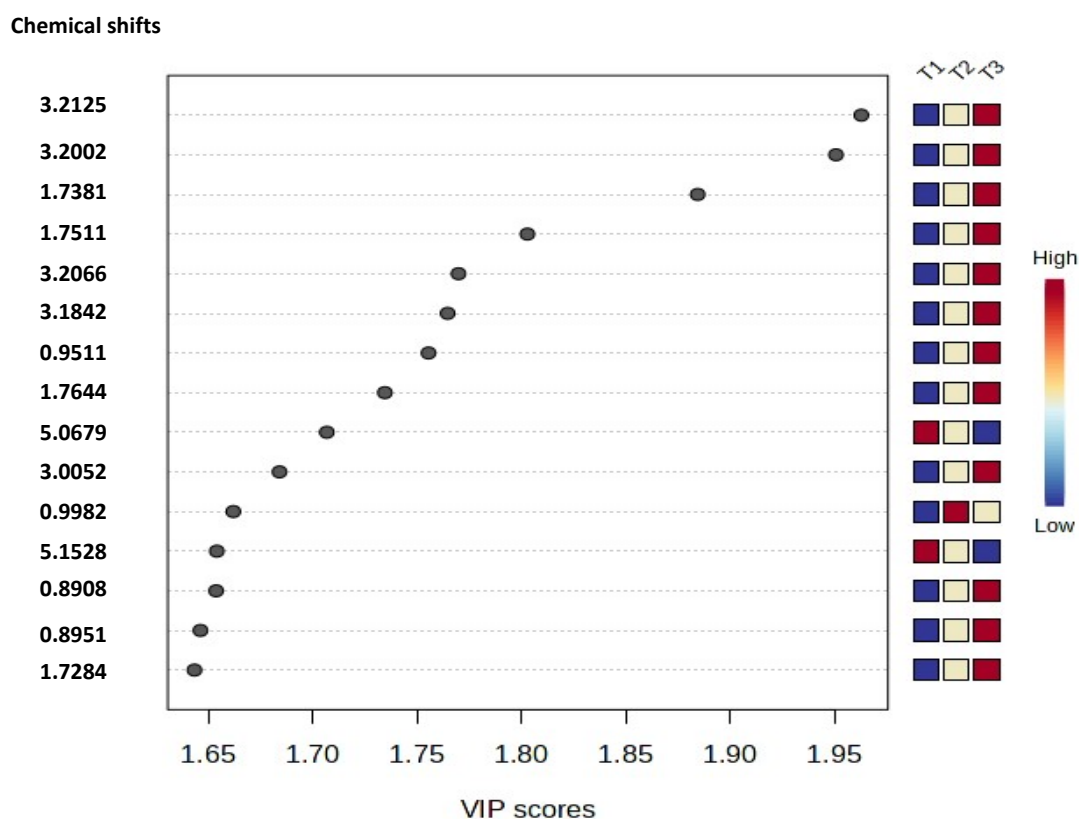


Figura 16. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA obtenida por la matriz donde se seleccionaron las señales dentro de todo el rango de desplazamientos químicos ($\delta^1\text{H}$). Los recuadros coloreados de la derecha indican las

concentraciones relativas del metabolito. En la izquierda se observan desplazamientos químicos de compuestos.

En la gráfica de proyección VIP de la Figura 17 se observan 15 compuestos, los desplazamientos más discriminantes son señales aromáticas de 7.28, 6.75, 7.26 y 7.27 ppm. La concentración más alta de algunos compuestos se encuentra en el T1 y las concentraciones más bajas en el T3. La disminución de la concentración de compuestos aromáticos se puede deber a que mediante el catabolismo de los aminoácidos se generan otros compuestos, como lo reportado por Smit et al., (2005) en donde los α -cetoácidos de la fenilalanina en queso pueden convertirse de forma no enzimática en compuestos aromáticos como benzaldehído y metiltio acetaldehído. Broadbent et al., (2004) encontraron que las aminotransferasas cuando utilizan triptófano, tirosina y fenilalanina pueden degradarse espontáneamente en una variedad de compuestos de mal sabor. Otro motivo puede ser que las bacterias ácido lácticas (BAL) con su sistema proteolítico convierten aminoácidos aromáticos a otros productos y bacterias que no producen aminoácidos esenciales absorban aminoácidos del medio ambiente (Smit et al., 2005) lo que se traduce en la disminución en la concentración de compuestos y los desplazamientos discriminantes se pueden modificar.

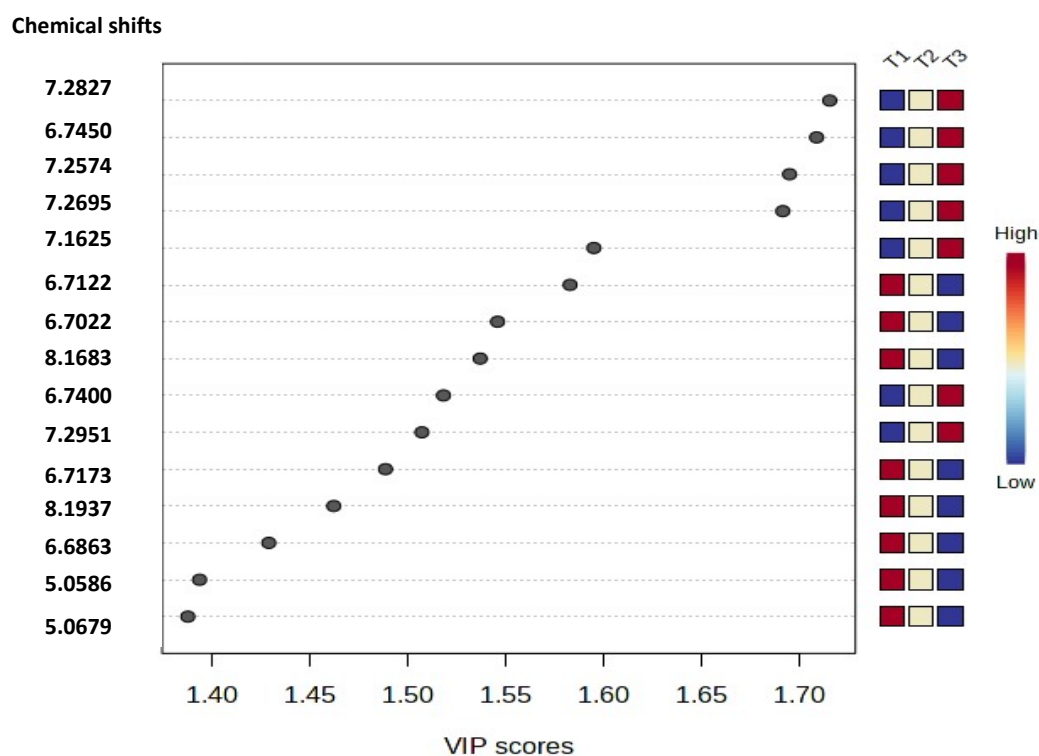


Figura 17. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA a partir de la región aromática. Los recuadros coloreados de la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito.

En el diagrama de árbol que se realizó con todas las regiones se observa la formación de cuatro grupos I, II, III, IV (Figura 18). En el grupo I se encuentran el queso Vaquero T1 y T2 y el queso Santa Cruz con los tiempos T2 y T3. El grupo II lo conforman las muestras de queso Vaquero y Santa Cruz en el T2, mientras que en el grupo III se encuentra al queso Santa Cruz en el T1 y en la aglomeración IV está el queso Vaquero en los T1, T2 y T3.

Por otro lado, en el diagrama de árbol donde se utilizó la región aromática se observa la formación de cuatro grupos principales I, II, III, IV (Figura 19). El primer grupo I se compone de queso Santa Cruz en el T2 y T3. En el segundo grupo II se observa el queso Vaquero en los tiempos T1, T2 y T3. En el grupo III se encuentran el queso Vaquero en los tiempos T2 y T3. Finalmente, en el grupo cuatro se observa el queso Santa Cruz T1. Este diagrama mostró una mejor separación entre queserías en la matriz, donde se seleccionó la región aromática. La diferencia se debe a que se eliminan desplazamientos, haciendo una selección más fina.

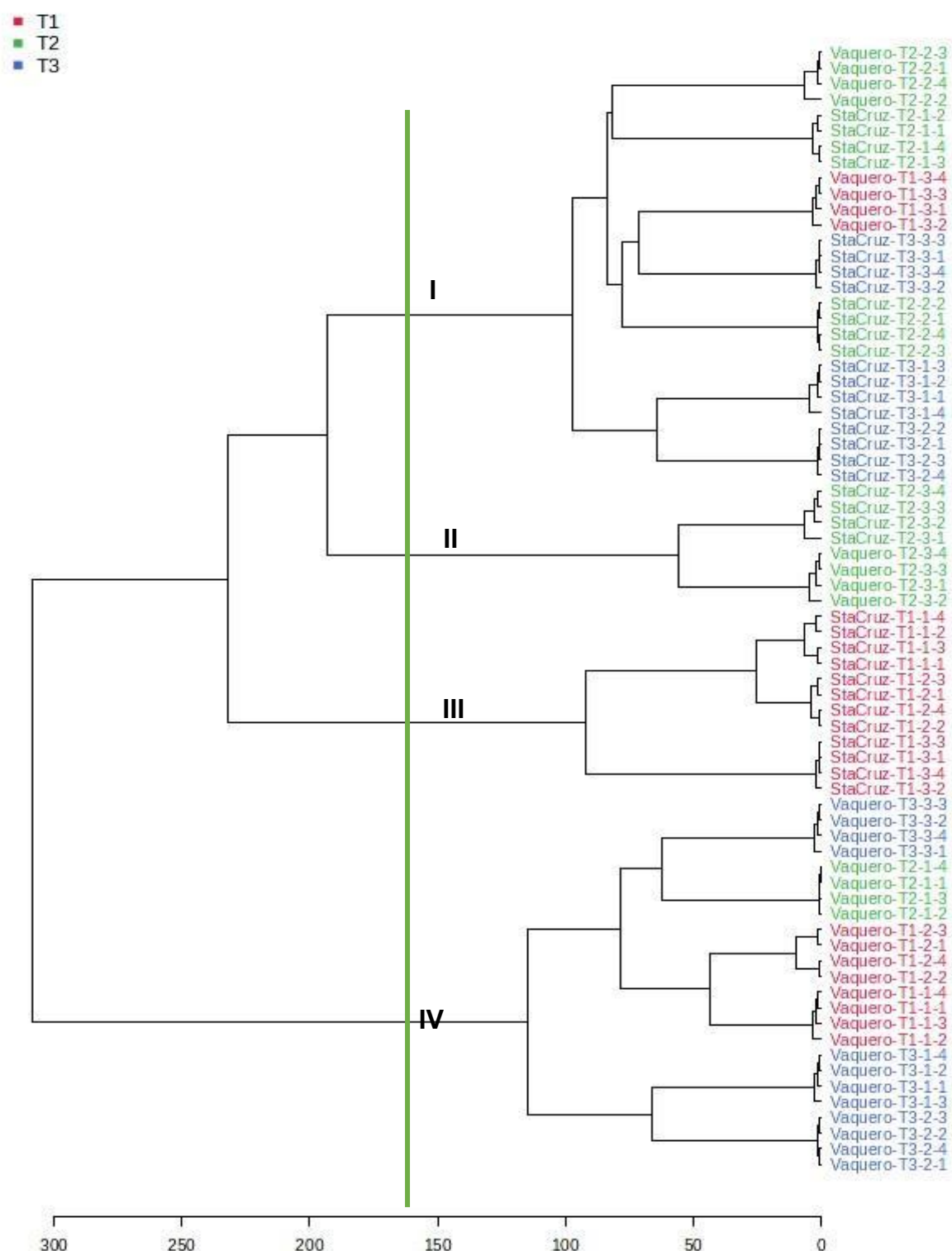


Figura 18. Diagrama de árbol para la matriz de datos completa.

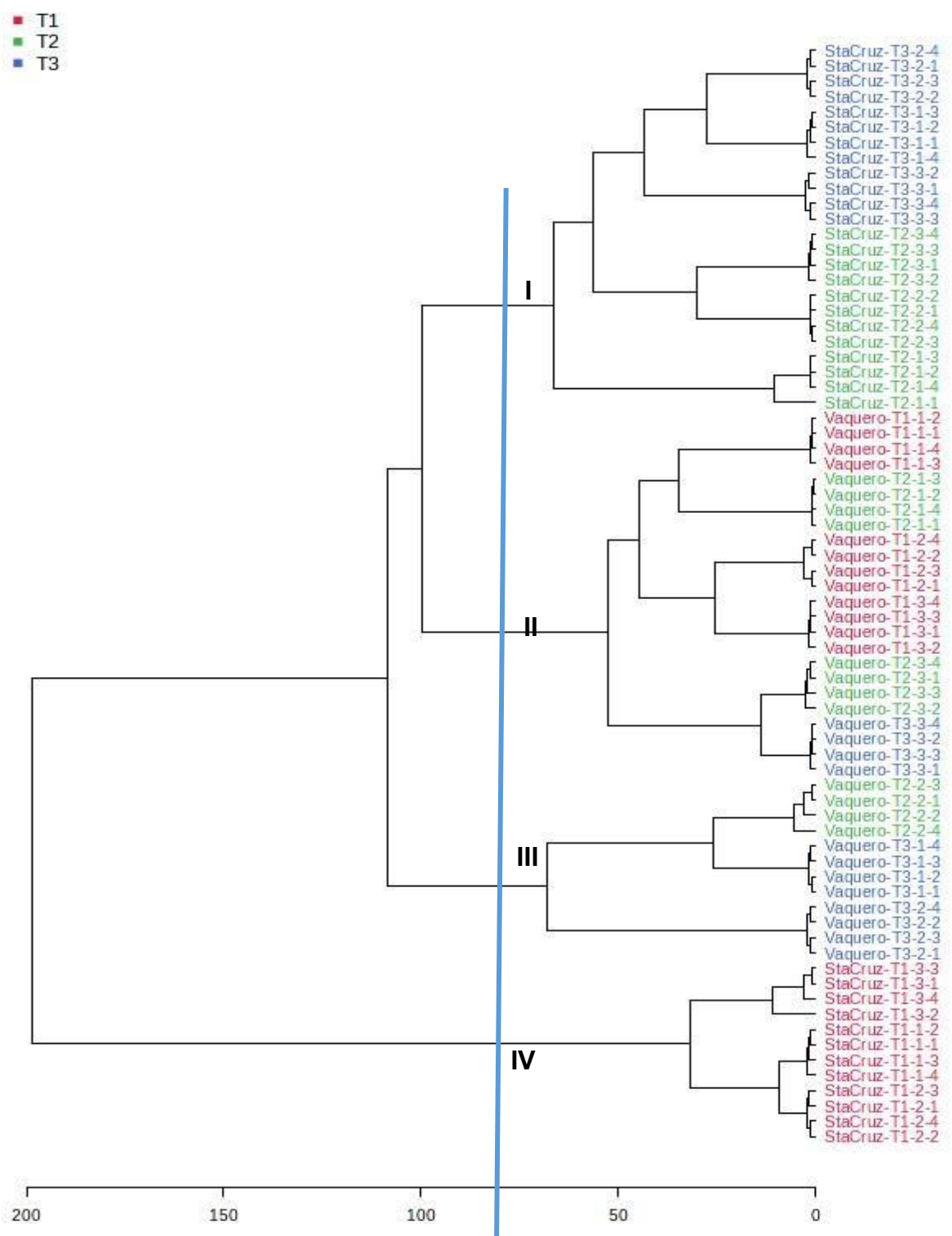


Figura 19. Diagrama de árbol para la región aromática.

Se observa que los cuatro grupos formados I, II, III y IV en el diagrama de árbol (Figura 18) contruidos a partir de la matriz de datos donde se seleccionaron todas las regiones, coincide con la distribución de las muestras en el mapa de calor (Figura 20), debido a que hacen la agrupación por distancia euclidiana y algoritmo de agrupación Ward D. Por otro lado, en el mapa de calor Figura 21 se muestra que hay una mayor variabilidad de compuestos y concentraciones más altas de metabolitos en el grupo IV en el T3, lo cual está asociado a los cambios metabólicos tales como: glucólisis, proteólisis y lipólisis durante la maduración. En el estudio realizado por Ralli & Spyros, (2023) reportaron que la proteólisis se ha relacionado positivamente con la maduración del queso.

En el mapa de calor Figura 21 se obtuvieron los mismos cuatro grupos I, II, III y IV formados en el diagrama de árbol (Figura 19). En los grupos II y III se observó mayor diversidad de compuestos y concentraciones más altas. En el grupo II en el T1 se encontró la mayor concentración de compuestos.

5.5.2. Resonancia magnética nuclear para separar muestras por quesería

El OPLS-DA de la región completa y aromática (Figura 22) mostró discriminación entre queso Santa Cruz y queso Vaquero. El OPLS-DA supervisado se llevó a cabo con validaciones cruzadas de Monte Carlo con 10 particiones de prueba por cada 100 permutaciones (Herbert-Pucheta et al., 2021). Los parámetros estadísticos OPLS-DA, R^2X , R^2Y y Q^2 definieron la calidad del modelo. En la Figura 22C la varianza fue de 94 %, $Q^2=0.93$ y $R^2X=0.69$ utilizando tres componentes principales. Por otro lado, cuando se utilizó la región aromática en la Figura 22D la varianza fue de 97 %, $Q^2=0.97$ y $R^2X=0.67$. Esto indica que el modelo donde se utilizó la región aromática discrimina mejor que cuando se utilizaron todas las regiones.

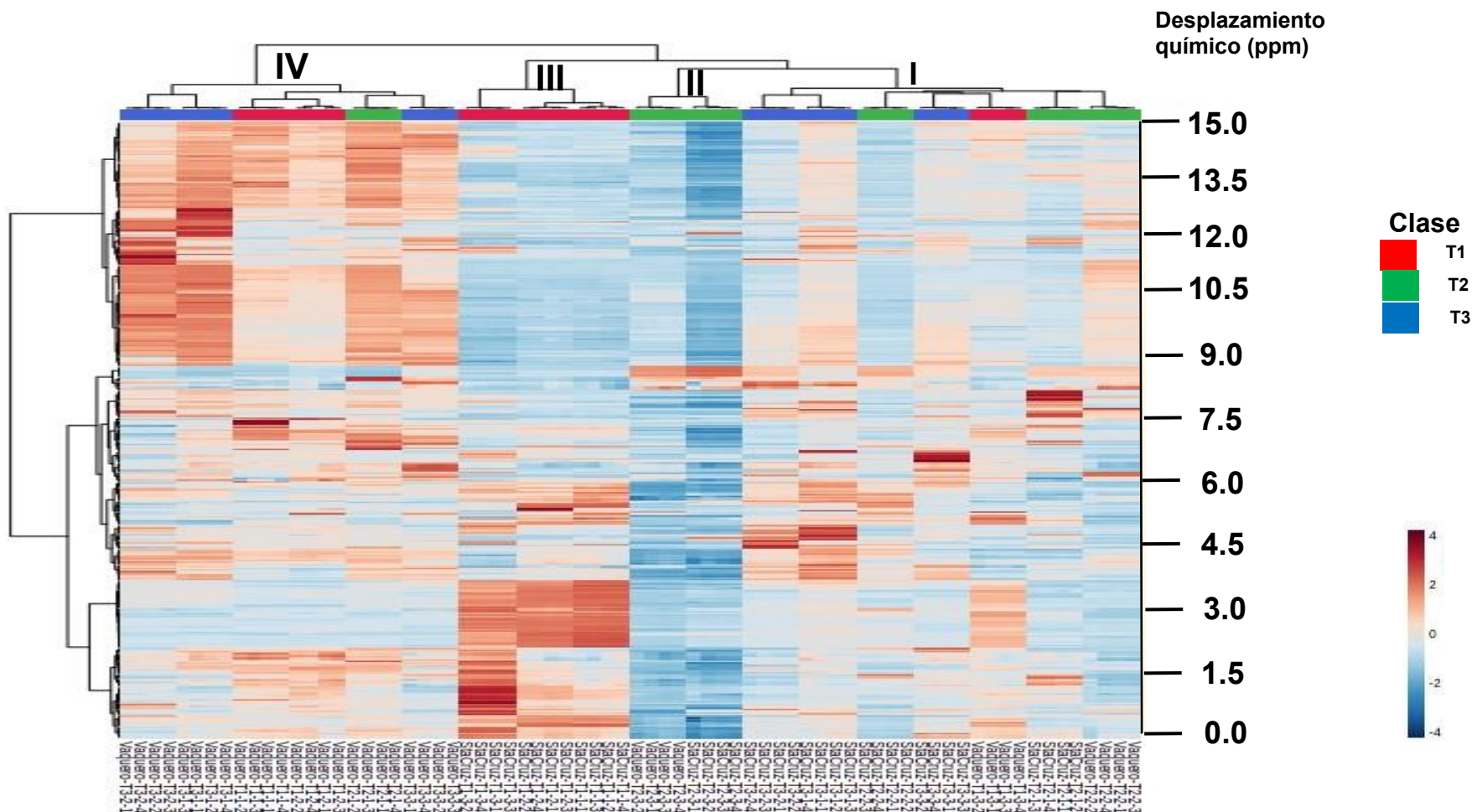


Figura 20. Diagrama de calor para la matriz de datos completa para extractos de queso Crema de Chiapas proveniente de dos queserías Vaquero y Santa Cruz durante tres tiempos de maduración (T1, T2 y T3).

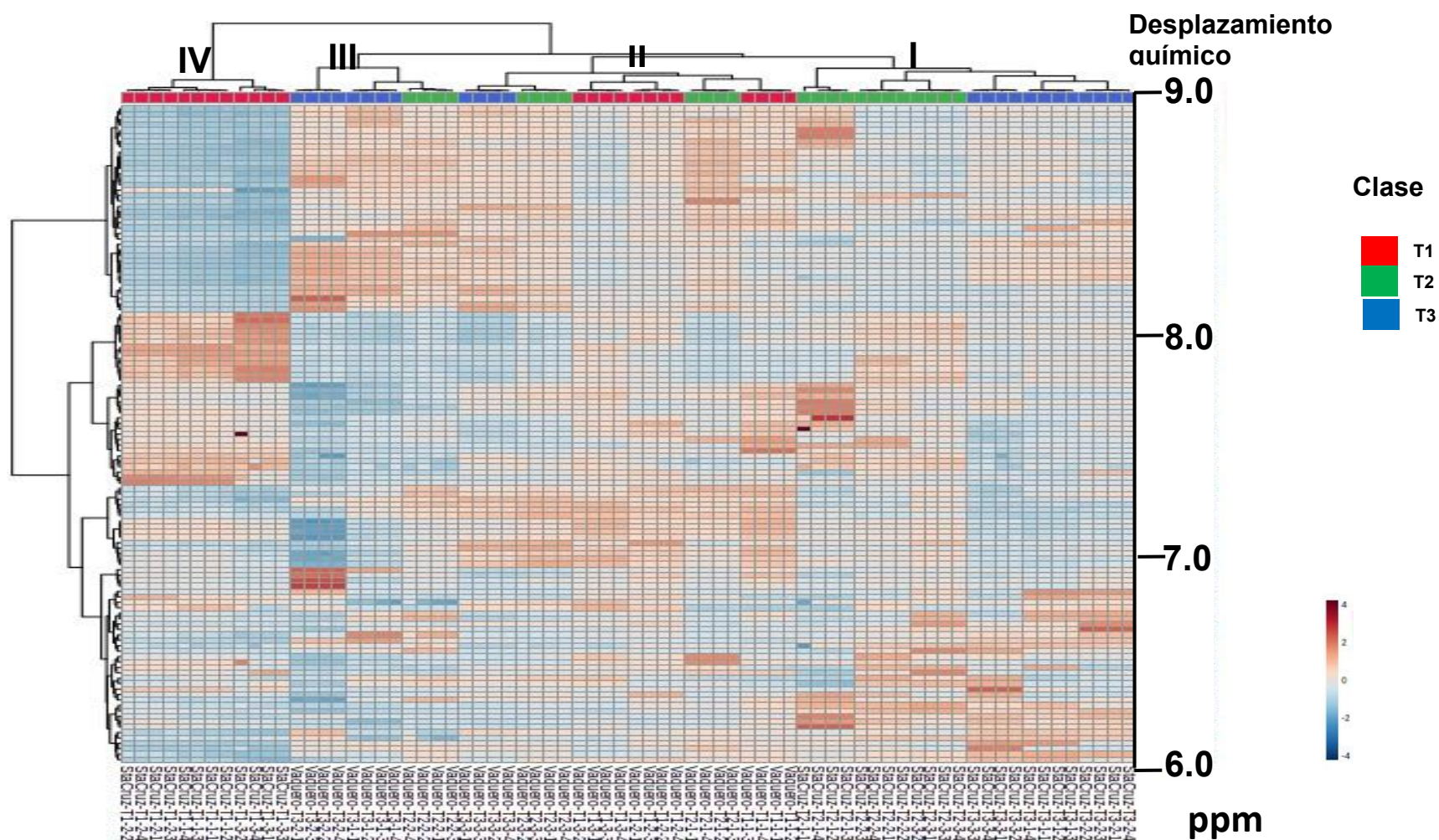


Figura 21. Diagrama de calor para la región aromática de extractos de queso Crema de Chiapas.

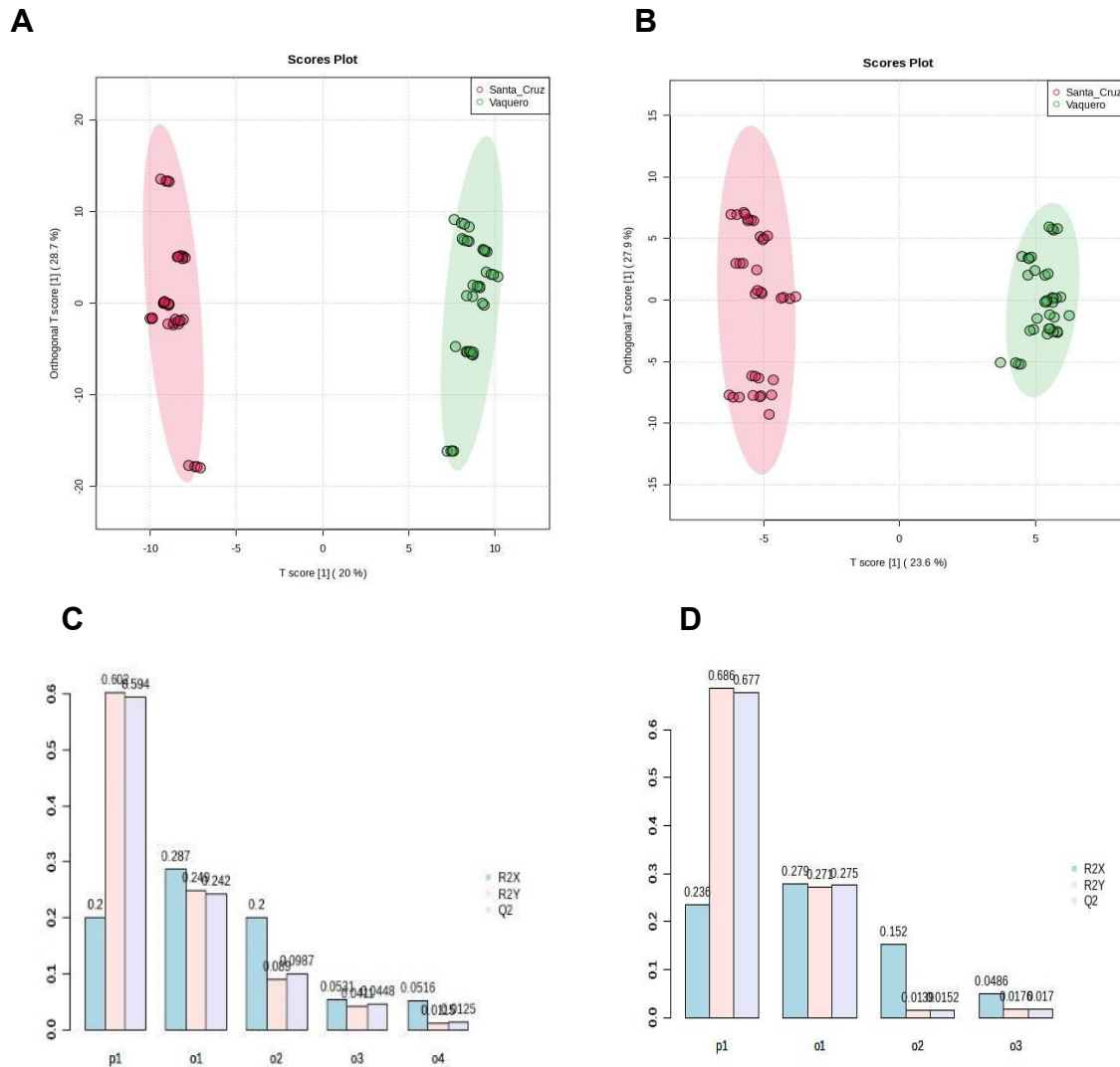


Figura 22. Gráfica OPLS-DA de la matriz donde se utilizó la región completa (A), gráfica OPLS-DA construida a partir de la matriz donde se seleccionó la región aromática (B). Para OPLS-DA, un análisis de permutación entre un componente predictivo (p1) y cuatro componentes ortogonales (o1, o2, o3 y o4) produjo los coeficientes R^2X , R^2Y y Q^2 observados y con validación cruzada (C y D).

En la gráfica de VIP (Figura 23) se observa que los desplazamientos químicos más discriminantes fueron 3.06, 3.54, 2.78 y 2.77 ppm. Del lado izquierdo se muestra que el queso Vaquero tiene una mayor cantidad de metabolitos. La diferencia entre queserías artesanales puede deberse a que el método de

producción no está estandarizado y puede variar incluso entre lotes de producción. Los aromas y sabores en queso cambian entre queserías debido al macro y microambiente (De la Rosa-Alcaraz et al., 2020). Diversos factores durante el proceso de elaboración pueden cambiar la cantidad y tipo de metabolitos en el queso, pasteurización o no de la leche, tiempo entre la recepción y procesamiento, tipo de cuajo utilizado, cantidad de sal, tiempo de maduración y condiciones del almacenamiento por mencionar algunos (Zheng et al., 2021).

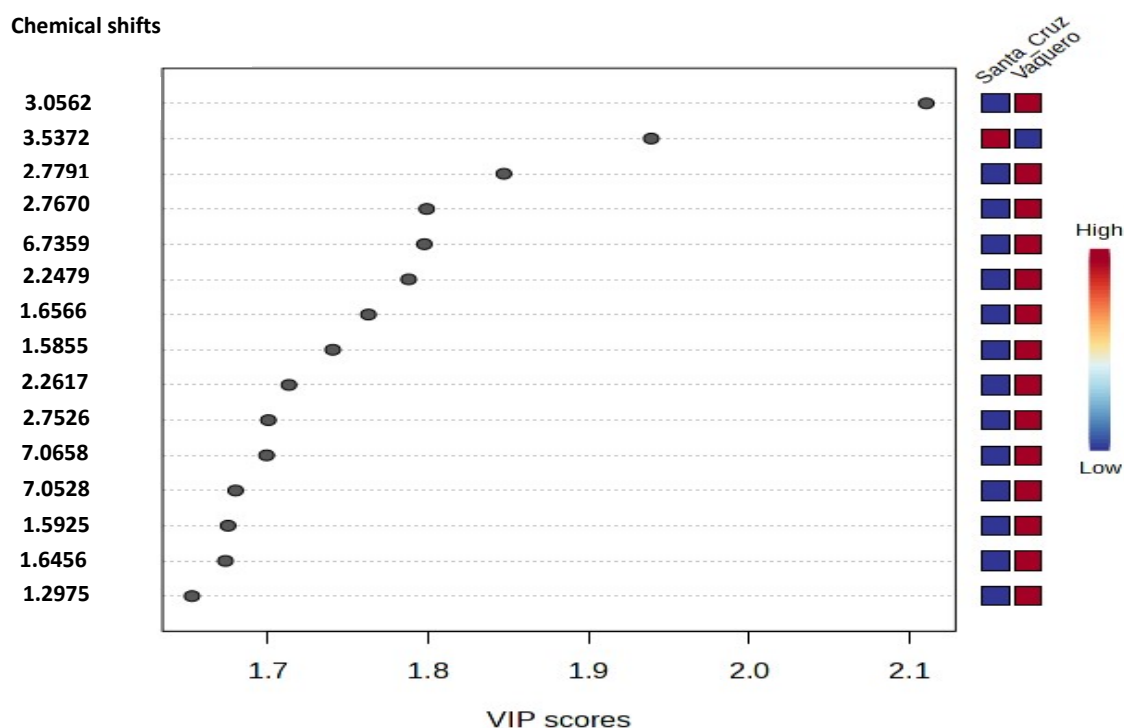


Figura 23. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA generada de la matriz donde se seleccionaron todas las regiones. Los recuadros coloreados de la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito.

En el gráfico de VIP (Figura 24) los desplazamientos más discriminantes fueron: 7.20, 7.20, 6.74 y 7.07 ppm. Son pocos estudios en queso que reportan la gráfica de VIPs, sin embargo, en quesos coreanos (Kandasamy et al., 2020), leche y queso Mozzarella con y sin denominación de origen (Salzano et al., 2020) se reportaron 15 desplazamientos discriminantes.

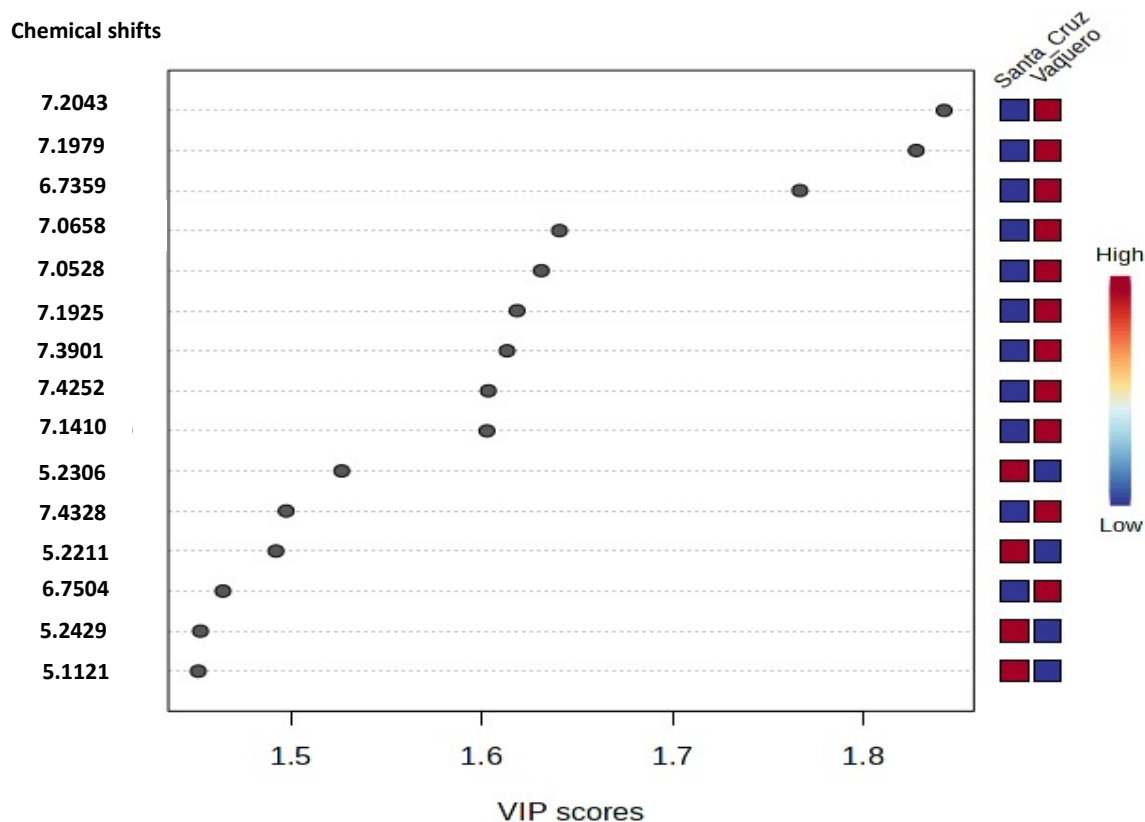


Figura 24. Gráfica de proyección VIP obtenida por PLS-DA originada a partir de la matriz con la región aromática. Los recuadros coloreados de la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito.

5.6. Conclusiones

De las matrices generadas, i) selección de señales dentro de todo el rango de desplazamientos químicos ($\delta^1\text{H}$) de los espectros de hidrógeno a una dimensión (1D- ^1H RMN) y ii) selección de señales únicamente de la región de hidrógenos aromáticos, esta última originó un mejor modelo discriminante para tiempos de maduración. La mejor capacidad predictiva, para separar quesos por proveedurías, correspondió al OPLS-DA que utilizó desplazamientos de la región aromática, mostrando valores de $Q^2=0.97$ y $R^2X=0.67$.

La metabolómica con RMN en estado líquido permitió obtener datos con un mínimo tratamiento de las muestras. El queso Crema de Chiapas presentó aminoácidos característicos de la maduración altamente discriminantes. Por otro

lado, la matriz generada con la región aromática muestra que en el T1 se encuentra la mayor concentración de metabolitos. Además, este estudio puede complementarse explorando las bioactividades del extracto de queso y con el uso de espectroscopia de RMN ordenada por difusión (DOSY-RMN) para determinar pesos moleculares de péptidos.

5.7. Literatura citada

- Bai, S. (2016). Nuclear Magnetic Resonance Instrumentation. En *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 1-26). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a6108.pub3>
- Broadbent, J. R., Gummalla, S., Hughes, J. E., Johnson, M. E., Rankin, S. A., & Drake, M. A. (2004). Overexpression of *Lactobacillus casei* d-Hydroxyisocaproic Acid Dehydrogenase in Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4814-4820. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4814-4820.2004>
- Cavallini, N., Strani, L., Becchi, P. P., Pizzamiglio, V., Michelini, S., Savorani, F., Cocchi, M., & Durante, C. (2023). Tracing the identity of Parmigiano Reggiano “Prodotto di Montagna—Progetto Territorio” cheese using NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1278, 341761. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341761>
- Corsaro, C., Vasi, S., Neri, F., Mezzasalma, A. M., Neri, G., & Fazio, E. (2022). NMR in Metabolomics: From Conventional Statistics to Machine Learning and Neural Network Approaches. *Applied Sciences*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/app12062824>
- Danzi, F., Pacchiana, R., Mafficini, A., Scupoli, M. T., Scarpa, A., Donadelli, M., & Fiore, A. (2023). To metabolomics and beyond: A technological portfolio to investigate cancer metabolism. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01380-0>
- De la Rosa-Alcaraz, M. de los Á., Ortiz-Estrada, Á. M., Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2020). Poro de Tabasco cheese: Chemical composition and microbiological quality during its artisanal manufacturing process. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3025-3037. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17363>
- Emami, F., Vatanara, A., Park, E. J., & Na, D. H. (2018). Drying Technologies for the Stability and Bioavailability of Biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030131>
- Greenacre, M. J. (2012). Biplots: The joy of singular value decomposition. *WIREs Computational Statistics*, 4(4), 399-406. <https://doi.org/10.1002/wics.1200>
- Herbert-Pucheta, J. E., Lozada-Ramírez, J. D., Ortega-Regules, A. E., Hernández, L. R., & Anaya de Parrodi, C. (2021). Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics with Double Pulsed-Field-Gradient Echo and Automatized Solvent Suppression Spectroscopy for Multivariate Data

- Matrix Applied in Novel Wine and Juice Discriminant Analysis. *Molecules*, 26(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules26144146>
- Huang, K., Thomas, N., Gooley, P. R., & Armstrong, C. W. (2022). Systematic Review of NMR-Based Metabolomics Practices in Human Disease Research. *Metabolites*, 12(10), 963. <https://doi.org/10.3390/metabo12100963>
- Ianni, A., Bennato, F., Martino, C., Grotta, L., & Martino, G. (2020). Volatile Flavor Compounds in Cheese as Affected by Ruminant Diet. *Molecules*, 25(3), 461. <https://doi.org/10.3390/molecules25030461>
- Jacob, D., Deborde, C., Lefebvre, M., Maucourt, M., & Moing, A. (2017). NMRProcFlow: A graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 13(4). <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1178-y>
- Kandasamy, S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H. B., Seol, K.-H., & Ham, J.-S. (2020). ¹H HRMAS-NMR based metabolic fingerprints for discrimination of cheeses based on sensory qualities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1446-1461. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.043>
- Kharbanda, Y., Mailhiot, S., Mankinen, O., Urbančzyk, M., & Telkki, V.-V. (2023). Monitoring cheese ripening by single-sided nuclear magnetic resonance. *Journal of Dairy Science*, 106(3), 1586-1595. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22458>
- López-Aguilar, R., Zuleta-Prada, H., Hernández-Montes, A., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Comparative NMR Metabolomics Profiling between Mexican Ancestral & Artisanal Mezcals and Industrialized Wines to Discriminate Geographical Origins, Agave Species or Grape Varieties and Manufacturing Processes as a Function of Their Quality Attributes. *Foods*, 10(1), 157. <https://doi.org/10.3390/foods10010157>
- McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
- Mohamed, H. M., Barzideh, Z., Siddiqi, M., & LaPointe, G. (2023). Taxonomy, Sequence Variance and Functional Profiling of the Microbial Community of Long-Ripened Cheddar Cheese Using Shotgun Metagenomics. *Microorganisms*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082052>
- Oyedele, O. F. (2021). Extension of biplot methodology to multivariate regression analysis. *Journal of Applied Statistics*, 48(10), 1816-1832. <https://doi.org/10.1080/02664763.2020.1779192>
- Pang, Z., Lu, Y., Zhou, G., Hui, F., Xu, L., Viau, C., Spigelman, A. F., MacDonald, P. E., Wishart, D. S., Li, S., & Xia, J. (2024). MetaboAnalyst 6.0: Towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, gkae253. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae253>

- Piras, C., Cesare Marincola, F., Savorani, F., Engelsen, S. B., Cosentino, S., Viale, S., & Pisano, M. B. (2013). A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chemistry*, 141(3), 2137-2147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.108>
- Pontonio, E., Montemurro, M., De Gennaro, G. V., Miceli, V., & Rizzello, C. G. (2021). Antihypertensive Peptides from Ultrafiltration and Fermentation of the Ricotta Cheese Exhausted Whey: Design and Characterization of a Functional Ricotta Cheese. *Foods*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/foods10112573>
- Ralli, E., & Spyros, A. (2023). A Study of Greek Graviera Cheese by NMR-Based Metabolomics. *Molecules*, 28(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules28145488>
- Rezaei, A., Alirezalu, K., Damirchi, S. A., Hesari, J., Papademas, P., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., & Yaghoubi, M. (2020). Effect of Pasteurization and Ripening Temperature on Chemical and Sensory Characteristics of Traditional Motal Cheese. *Fermentation*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040095>
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348-2360. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72913-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1)
- Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3310-7>
- Salzano, A., Manganiello, G., Neglia, G., Vinale, F., De Nicola, D., D'Occhio, M., & Campanile, G. (2020). A Preliminary Study on Metabolome Profiles of Buffalo Milk and Corresponding Mozzarella Cheese: Safeguarding the Authenticity and Traceability of Protected Status Buffalo Dairy Products. *Molecules*, 25(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules25020304>
- Selamat, J., Rozani, N. A. A., & Murugesu, S. (2021). Application of the Metabolomics Approach in Food Authentication. *Molecules*, 26(24), 7565. <https://doi.org/10.3390/molecules26247565>
- Smit, G., Smit, B., & Engels, W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591-610. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.002>
- Torres-Salas, V., Hernández-Rodríguez, B. E., Hernández-Montes, A., Castillo, E., Zuleta-Prada, H., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Solid-state NMR spectroscopy for disentangling structural and motional features of lyophilized ripened cheese water-soluble extracts related to antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 334, 127603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127603>
- Tortorella, A., Leone, L., Lombardi, A., Pizzo, E., Bosso, A., Winter, R., Petraccone, L., Del Vecchio, P., & Oliva, R. (2023). The impact of N-glycosylation on the properties of the antimicrobial peptide LL-III. *Scientific Reports*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29984-0>

- Westerhuis, J. A., van Velzen, E. J. J., Hoefsloot, H. C. J., & Smilde, A. K. (2010). Multivariate paired data analysis: Multilevel PLSDA versus OPLSDA. *Metabolomics*, 6(1), 119-128. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0185-z>
- Wu, W., Zhang, L., Zheng, X., Huang, Q., Farag, M. A., Zhu, R., & Zhao, C. (2022). Emerging applications of metabolomics in food science and future trends. *Food Chemistry: X*, 16, 100500. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100500>
- Xia, J., Psychogios, N., Young, N., & Wishart, D. S. (2009). MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server), W652-W660. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp356>
- Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.703284>

6. METABOLÓMICA NO DIRIGIDA DE INFRARROJO CERCANO CON ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE NO SUPERVISADO Y SUPERVISADO DE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS EN QUESOS

6.1. Resumen

El presente estudio propone un flujo de trabajo para el análisis estadístico multivariante (MSA) análisis de componentes principales (PCA) no supervisado y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) supervisado, para analizar datos de infrarrojo cercano (NIR) de quesos de diversos tipos y orígenes geográficos, con respecto a su perfil de ácidos grasos: El conjunto de datos incluyó (i) espectros NIR en bruto, (ii) primera derivada y (iii) espectros del infrarrojo cercano seleccionados en la primera derivada, dentro de una gama de longitudes de onda de $12500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ utilizando el modo de adquisición absorbancia. Las entradas de datos NIR se adaptaron por primera vez a un formato adecuado para el análisis de datos metabolómicos por MetaboAnalyst. Las regiones discriminantes para la primera matriz de datos fueron cinco. Para la segunda matriz, las regiones de números de onda discriminantes se redujeron a tres: de $10\ 000$ a 8000 cm^{-1} (-CH sobretono), 6000 a 5000 cm^{-1} (sobretono -C=O-) y de 5000 a 4000 cm^{-1} (sobretono -CH). Por último, para la tercera matriz sólo se encontraron dos regiones discriminantes de 6250 a 5500 cm^{-1} (-CH-) y de 4500 a 4000 cm^{-1} (-CH-). El PLS-DA se aplicó a la matriz con la primera derivada y mostró la mejor discriminación de las huellas dactilares de ácidos grasos saturados en los quesos entre los que se encontraron los ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), debido a que comparten la dimensionalidad de la puntuación con todos los quesos analizados y esto coincide con lo reportado en productos lácteos. La composición de ácidos grasos saturados de diversos quesos se puede determinar por NIR.

Palabras clave: Espectroscopia de infrarrojo cercano, metabolómica basada en NIR, quesos, metabolómica no dirigida, ácidos grasos saturados (AGS).

NEAR-INFRARED UNTARGETED METABOLOMICS WITH UNSUPERVISED AND SUPERVISED MULTIVARIATE STATICAL ANALYSIS OF FATTY ACID PROFILES IN CHEESES.

Abstract

This study proposes a workflow for multivariate statistical analysis (MSA) unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), to analyze near infrared (NIR) data of cheeses of various types and geographical origins, with respect to their NIR fatty acid profile: The data set included (i) raw NIR spectra, (ii) first derivative derivative and iii) selected near-infrared spectra in the first derivative, within a wavelength range of 12500-3600 cm^{-1} using the absorbance acquisition mode. The NIR data entries were adapted for the first time to a format suitable for metabolomic data analysis by MetaboAnalyst. The discriminant regions for the first data matrix were five. For the second matrix, the discriminant wavenumber regions were reduced to three: from 10000 to 8000 cm^{-1} (-CH overtone), 6000 to 5000 cm^{-1} (-C=O-overtone) and from 5000 to 4000 cm^{-1} (-CH overtone). Finally, for the third matrix, only two discriminating regions were found from 6250 to 5500 cm^{-1} (-CH-) and from 4500 to 4000 cm^{-1} (-CH-). PLS-DA was applied to the matrix with the first derivative and showed the best discrimination of saturated fatty acid fingerprints in cheeses among which lauric (C12:0), myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids were found, because they share the dimensionality of the score with all the cheeses analyzed and this coincides with what has been reported in dairy products. The saturated fatty acid composition of various cheeses can be determined by NIR.

Keywords: Near infrared spectroscopy, NIR-based metabolomics, cheeses, untargeted metabolomics, saturated fatty acids (SFAs).

6.3. Introducción

La metabolómica puede dividirse en metabolómica dirigida y no dirigida, la elección depende de los objetivos de la investigación, si se desea la identificación y/o cuantificación de compuestos específicos o la obtención de huellas holísticas representativas, construidas a partir de una firma metabólica de muestras definidas como matrices complejas, que proporcionen a su vez una visión general de los metabolitos expresados dentro de un sistema (Cubero-León et al., 2014). Las técnicas más utilizadas para obtener datos para estudios metabolómicos son la cromatografía acoplada con espectrometría de masas y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (Marshall & Powers, 2017). El flujo de trabajo de la metabolómica consiste en la obtención de una matriz de datos a partir de una medida instrumental, que tras el procesamiento de los datos (como correcciones de línea base, frecuencia, alineamientos, referencia y binnings), es adecuada para el análisis estadístico multivariante (por sus siglas en inglés multivariate statistical analysis MSA). La metabolómica no dirigida en matrices alimentarias comprende la obtención de la huella química holística y/o huellas dactilares relacionadas con su origen geográfico, variedad, calidad alimentaria, procesos de fabricación, impactos debidos a factores externos como el cambio climático, falsificaciones, entre otros (Cubero-León et al., 2014; Beleggia et al., 2011; Herbert-Pucheta et al., 2021).

Los análisis multivariantes utilizados en los estudios metabolómicos se basan generalmente en el análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés principal component analysis PCA) (Saccenti et al., 2014) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) (Kalivodová et al., 2015). El PCA es una técnica no supervisada para producir modelos de variables disminuidas con la máxima varianza (Gautam et al., 2015; Chong et al., 2019), separando las clases de acuerdo con el peso de las cargas resultantes, en el que las puntuaciones de carga más altas tienen una mayor contribución a la separación (Worley & Powers, 2013). En cambio, el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales supervisado (PLS-DA) extrae la información que puede predecir todas las posibles pertenencias a una clase a partir de

combinaciones lineales de la matriz de datos de entrada original con el uso de técnicas de regresión multivariante, mientras que las discriminaciones de clase de los datos originales y las etiquetas de clase permutadas mediante validaciones cruzadas (Pérez-Enciso & Tenenhaus, 2003; Herbert-Pucheta et al., 2021). Por último, en términos de metabolómica cuantitativa y cualitativa, estos últimos pueden subdividirse en métodos de reconocimiento supervisados, mientras que los supervisados, como PLS-DA, utilizan algoritmos entrenados para clasificar muestras a partir de datos de entrada, en grupos predefinidos. En modelos supervisados de reconocimiento de patrones, también reveló variables relacionadas con la separación entre grupos y cómo se comportan los grupos por factor discriminante analizado (Rodríguez-Otero et al., 1997). En los algoritmos de reconocimiento supervisado de patrones, se suelen utilizar métodos de remuestreo de validación cruzada para evaluar la predicción de un conjunto de datos independientes entrenados, frente a nuevos datos con un número óptimo de factores, señalando también sobreestimaciones y/o sesgos.

Los enfoques metabolómicos del infrarrojo cercano (por sus siglas en inglés, near infrared NIR) para quesos incluyen un modelo para procesos de envejecimiento y parámetros sensoriales seleccionados en quesos Cheddar con reflectancia NIR junto con regresión multivariante por mínimos cuadrados parciales (por sus siglas en inglés partial least squares PLS) de la matriz de datos NIR en bruto, derivatizada y con corrección de dispersión (Downey et al., 2005), el uso de PCA y PLS modificado (Manuelian, Currò, Penasa, et al., 2017) con validación cruzada de la matriz de datos de reflectancia NIR brutos para atributos visuales, de sabor, textura, aroma y olor en quesos españoles (González-Martín et al., 2011). Así como una matriz de datos combinada de reflexión difusa NIR con reflexión total atenuada en el infrarrojo medio, tratada con PCA y PLS modificado (Manuelian, Currò, Penasa, et al., 2017) total atenuada, tratada con PCA y análisis discriminante lineal (por sus siglas en inglés linear discriminant analysis LDA) como modelo quimiométrico para discriminar el queso Suizo, alemán, francés (Bretagne y Savoie), austriaco y finlandés. Hasta donde se sabe, la mayoría de las referencias aquí mencionadas, no discuten extensamente los detalles para

construir matrices discriminantes de datos infrarrojos, para el análisis estadístico multivariado. Además, para el análisis estadístico multivariante (no) supervisado con resultados de pre-procesamiento y postprocesamiento contruidos en formatos universales como la familia de formatos estándar de la IUPAC de la Comisión Mixta Atómica y Molecular para el intercambio de datos espectrales, conocido como JCAMP-DX.

La presencia de ácidos grasos saturados (AGS) o insaturados (AGI) dentro de la leche cruda afectará a la textura de cualquier queso producido. Los quesos más blandos se relacionan con un mayor grado de insaturación en los ácidos grasos. Por el contrario, los quesos más duros se asocian con un mayor contenido de AGS de tamaño medio. La presencia de este tipo de AGS se asocian con un aumento de los riesgos cardiovasculares, de obesidad y de algunos tipos de cáncer, principalmente debido a la presencia de ácidos grasos C12:0 (láurico), C14:0 (mirístico) y C16:0 (palmítico), considerados peligrosos para la salud humana en contenidos elevados (González-Martín et al., 2020).

Los ácidos grasos más comunes en los quesos son C10:0 (ácido cáprico), C14:0, C16:0, C18:0 (ácido esteárico), y C18:1 cis (ácido oléico); la leche de rumiantes se compone del 60 al 70 % de ácidos saturados, el 20-30 % son ácidos grasos monoinsaturados, y los ácidos palmítico y oléico, respectivamente, son los AGS y AGI más abundantes en dichas matrices lácteas (Szumacher-Strabel et al., 2011; Markiewicz-Kęszycka et al., 2013). Además, existen diferencias en el contenido de AGS de cadena media en la leche de vaca, cabra y oveja, mientras que la leche de cabra y oveja presentan mayores contenidos de C12:0, C10:0 y C8:0, respecto a la leche de vaca, por lo que sus proporciones en leche se miden como prueba analítica de falsificación en productos de cabra adulterados con leche de vaca (Markiewicz-Kęszycka et al., 2013). Por último, como se ha demostrado en trabajos anteriores (González-Martín et al., 2011), los perfiles de ácidos grasos de los quesos analizados con quimiometría basada en NIR sirven como huella dactilar para discriminar el origen estacional (estacionalidad invernal o estival), mientras que los contenidos de ácidos grasos específicos observados

varían en función del régimen de alimentación de los rumiantes, que afecta directamente al perfil de ácidos grasos de la leche (González-Martín et al., 2011; Collomb et al., 2008).

Una de las técnicas más utilizadas para la identificación de ácidos grasos en productos lácteos es la cromatografía de gases. Sin embargo, su aplicación conlleva algunos desafíos, como la selección adecuada del método de derivatización (Hewavitharana et al., 2020), así como la optimización de los parámetros cromatográficos clásicos relacionados con la fase como la selectividad para una separación precisa de los ácidos grasos relevantes (Amores & Virto, 2019), entre otros. En consecuencia, métodos como la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR) representan una excelente alternativa en términos de no requerir una preparación exhaustiva o incluso nula de la muestra y, además, no es invasiva. Con la técnica NIR, es sencillo identificar e incluso se pueden cuantificar parcialmente los ácidos grasos saturados, presentes en los quesos en cantidades importantes, a diferencia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que son más difíciles de detectar (Lobos-Ortega et al., 2021) con un análisis no invasivo.

El presente trabajo introduce un enfoque metabolómico para construir perfiles de ácidos grasos no dirigidos en un conjunto de quesos regionales mexicanos, estadounidenses e italianos, con tres matrices de datos diferentes: i) espectros NIR en bruto, ii) intervalo NIR de primera derivada y iii) entradas de datos de absorbancia de intervalos NIR de primera derivada seleccionada, tratados con algoritmos PCA no supervisados y PLS-DA supervisados, entrenados para comparar los perfiles de ácidos grasos de los quesos con un conjunto de ocho estándares de ácidos grasos en estado líquido y sólido. El presente modelo detalla el procedimiento para obtener tres entradas de datos de absorbancia NIR, mientras que los datos brutos de adquisición NIR se exportaron de un formato de instrumento local (Bruker OPUS: "0File format), a un formato universal JCAMP-DX[<https://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/JcampConverter/index.html>], que permite producir un formato editable de valores separados por comas

(csv) de matrices NIR, legible para ser enviado a la plataforma de análisis estadístico multivariante de fácil manejo MetaboAnalyst 5.0, como forma alternativa de obtener huellas digitales holísticas de metabolómica NIR de libre acceso, evitando la necesidad de disponer imperativamente de un costoso software de metabolómica.

6.4. Materiales y métodos

6.4.1. Quesos y materiales

Se adquirieron un total de doce muestras de quesos en diferentes mercados locales, nueve fueron quesos artesanales mexicanos, dos quesos producidos en los Estados Unidos de América, y uno producido en Italia. Siete muestras artesanales de seis orígenes geográficos mexicanos (Chiapas, San Luis Potosí, Oaxaca, Hidalgo, Jalisco y Estado de México) se obtuvieron del Mercado de San Juan 19°25'48" N, 99°8'40.92" O, ubicado en la Ciudad de México:

- I-Q₁= Queso de bola de Ocosingo (Chiapas, México), analizando la composición de la corteza (Q_{1A}) y del núcleo del queso (Q_{1B}).
- II- Q₂= Santa Cruz® y Q₃= Vaquero® (Chiapas, México). Dos quesos con denominación local "Queso Crema de Chiapas".
- III- Q₄= Queso Adobera. Un queso de San Luis Potosí, México.
- IV-Q₅= Quesillo de Oaxaca es un queso artesanal con origen en Oaxaca, México.
- V-Queso de origen geográfico Hidalgo, México, aquí etiquetado como Q₆= Queso tipo Oaxaca.
- VI-Q₇=Queso Cotija, procedente de "El Mesón del queso Cotija ®" (Jalisco, México).
- VII- Queso Zacazonapan con Q₈=15 días de maduración, y Q₉=30 días de maduración (Estado de México).

Los quesos producidos en Estados Unidos de América fueron Q₁₀=Queso Cheddar, Tillamook® y Q₁₁=Queso Camembert, Président®. Por último, el queso italiano suministrado por Kirkland® se etiquetó como Q₁₂=Queso Grana Padano.

Se adquirieron siete estándares de ácidos grasos en Sigma Aldrich® (Steinheim, Alemania): S₁=ácido butírico (C4:0; n.º CAS 107-92-6), S₂=ácido hexanoico (C6:0; n.º CAS 142-62-1), S₃=ácido octanoico (C8:0; n.º CAS 124-07-2), S₄=ácido decanoico (C10:0; n.º CAS 334-48-5), S₅=ácido dodecanoico (C12:0; n.º CAS 143-07-7), S₆=ácido mirístico (C14:0; n.º CAS 544-63-8), S₇=ácido palmítico (C16:0; n.º CAS 57-10-3).

6.4.2. Detalles de la adquisición de la absorbancia en el NIR

Se colocó un gramo de queso rallado en un vial de vidrio con paso óptico constante para maximizar su superficie de contacto. Los barridos de absorbancia en el infrarrojo cercano se realizaron con un espectrofotómetro Bruker Optics (Rosenheim, Alemania) de analizador polivalente que barría una longitud de onda entre 830 y 2500 nm, con un intervalo de 2.5 nm (números de onda entre 12000 y 4000 cm⁻¹). Las rutinas de adquisición se realizaron para todas las muestras en el modo de absorbancia con 64 barridos tanto para los blancos como para las colecciones de muestras. Todas las adquisiciones y la exportación de datos al formato universal JCAMP-DX se llevaron a cabo utilizando el programa OPUS 7.8. Posteriormente, todos los datos se convirtieron a un formato de valores separados por comas (CSV), utilizando el script conversor de archivos JCAMP-DX a CSV que se encuentra en el siguiente enlace:<https://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/JcampConverter/index.html>. Los resultados de los scripts conversores JCAMP-DX se extrajeron y pegaron en hojas de cálculo Excel en formato CSV. Los espectros NIR de todos los estándares en estado líquido (ácido butírico, ácido hexanoico, ácido octanoico y ácido decanoico) se ajustaron a la línea de base con respecto a los intervalos de absorción NIR de los quesos en estado sólido utilizando un factor de corrección estándar. Las matrices de datos de absorbancia NIR de la primera derivada se obtuvieron a partir de los datos brutos con Microsoft Excel. Se obtuvieron entradas de datos de

absorbancia de tramos NIR seleccionados en primera derivada (matriz de datos NIR C, Figura 27) a partir de la matriz de datos NIR B, poniendo a cero todas las regiones de frecuencia NIR que se identificaron como entradas no relevantes a tener en cuenta para el análisis estadístico multivariante (por sus siglas en inglés multivariate statistical analysis MSA). Los archivos CSV individuales se organizaron primero en un formato de entrada de dos variables (mz / into) adecuado para el software MetaboAnalyst 5.0. Cada dato bruto NIR y el primer triplicado derivado se guardaron en carpetas definidas por su factor discriminante (tipo de queso/ tipo de estándar). Todos los conjuntos de variables se dispusieron a su vez en un formato zip adecuado como entradas estándar del análisis estadístico Metaboanalyst 5.0.

6.4.3. Análisis estadístico

El MSA de las matrices de datos brutos NIR y de primera derivada se realizó mediante análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés principal component analysis PCA) no supervisado y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el software MetaboAnalyst 5.0. Se aplicó un pre-procesamiento de los datos que incluía la normalización por suma (para ajustar las diferencias entre las muestras), la transformación (Log) y el autoescalado (centrado de la media dividido por la desviación estándar de cada variable) para eliminar cualquier posible variación durante la fase experimental, con el fin de hacer que las características fueran lo más comparables posible (Shenk & Westerhaus, 1991; Madalozzo et al., 2015; Chong et al., 2019). Las validaciones de los modelos PLS-DA se realizaron con 100 permutaciones por análisis. La fiabilidad de cada clasificación por modelo, se evaluó en términos de bondad de ajuste (R^2) y la bondad de la predicción (Q^2). Las regiones Hotelling T2 representadas por elipses en los gráficos de puntuación de cada modelo definen un intervalo de confianza del 95 %.

6.5. Resultados y discusión

El Cuadro 13 resume las huellas NIR esperadas para los ácidos grasos en los quesos, según la literatura reciente.

Cuadro 13. Señales de vibraciones de ácidos grasos.

Modo vibración	Longitud de onda (cm⁻¹)	Longitud de onda (cm⁻¹)	Autor
C-H	8331, 7140, 5712, 4327, 4273	1200, 1400, 1750, 2310, 2340	Shenk & Westerhaus, (1991)
Vibraciones de la grasa C-H	4295-4805	2030-2080	Šašić & Ozaki, (2000)
C-H combinación de bandas	4327- 4273	2310-23340	Shenk & Westerhaus, (1991)
C-H primer sobretono	5812-5681	1720-1760	Shenk & Westerhaus, (1991)
C-H ácidos saturados	5681	1760	Šašić & Ozaki, 2000)
CH₂ segundo sobretono	8262	1210	Davies, (1993)
=C-H (cis)	5951, 4651-4563	1680, 2150-2190	Garrido-Varo et al., (1998)
=C-H(C18:1)	5797	1725	Hourant et al., (2000)
C=O(estiramiento) ácidos y esteres	5666-5778	1765-1730	Subramanian et al., (2011)

La Figura 25 muestra los datos brutos de infrarrojo cercano de doce quesos Q₁ a Q₁₂ (Figura 25B, ver Materiales y métodos, sección 6.2.1) elaborados con leche de vaca, así como de los siete estándares AGS S₁ a S₇ (Figura 25A, ver Materiales y métodos, sección 6.2.1), recogidas con los mismos parámetros de adquisición (Materiales y métodos, sección 6.2.2), las regiones NIR más representativas para el análisis de quesos obtenidas de la literatura (Shenk & Westerhaus, 1991; Subramanian et al., 2011). Las señales corresponden a la grasa (8000 a 9000, 5400 a 6000, y 4000 a 4500 cm⁻¹) y a la humedad (6000 a 8000 y 4500 a 5400) cm⁻¹ de acuerdo con los datos NIR reportados anteriormente en quesos elaborados a partir de leche de diferentes rumiantes (leche de vaca, oveja y cabra), estaciones (verano e invierno) y tiempos de maduración (de 0 a 6 meses) (González-Martín et al., 2011; Lobos-Ortega et al., 2021; Shenk & Westerhaus, 1991; Ayvaz et al., 2021).

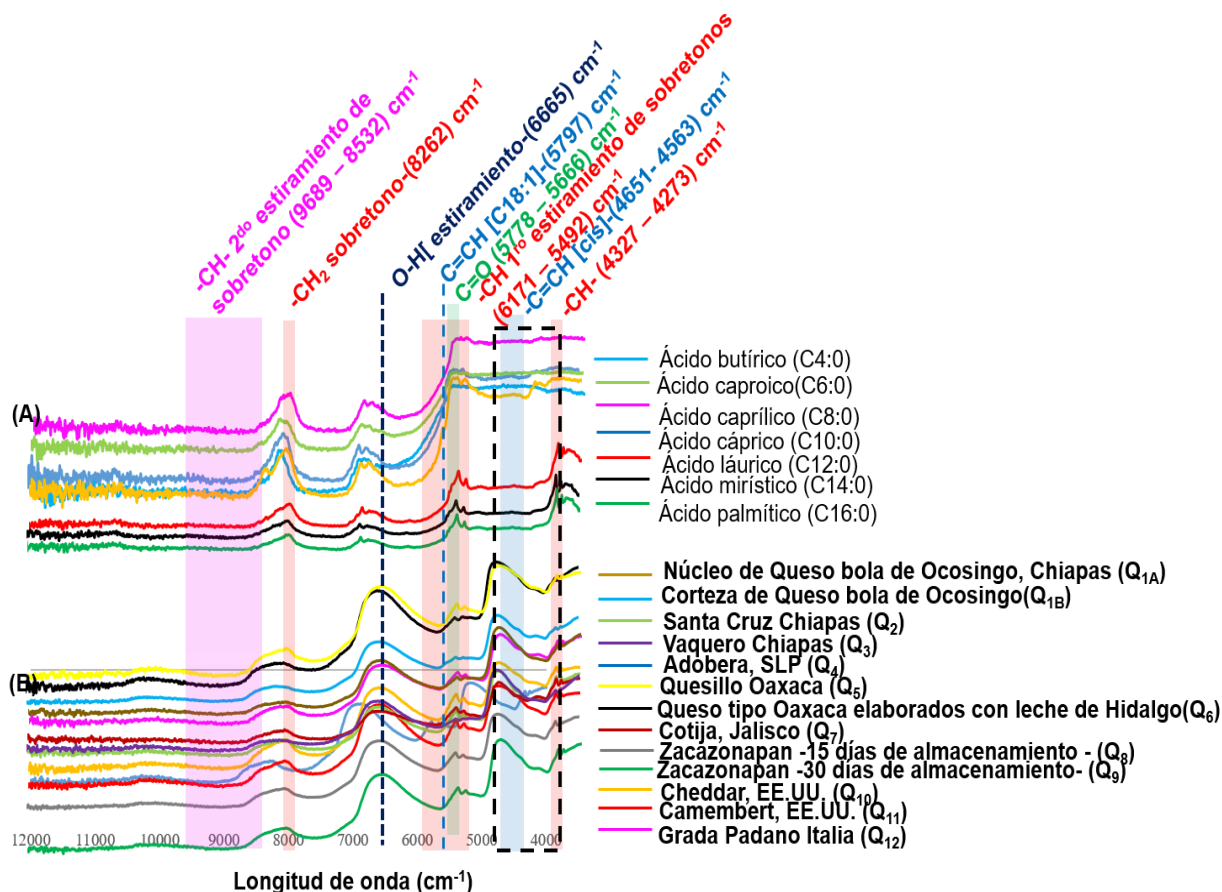


Figura 25. A) Espectros de infrarrojo cercano de patrones de ácidos grasos S₁ a S₇. B) Espectros infrarrojo cercano de los quesos Q₁ a Q₁₂.

Curto et al., (2020) identificaron cuatro señales NIR (8264.46, 6896.55, 5780.35, 5181.35 cm⁻¹) relevantes para discriminar el procesado, la estacionalidad (invierno y verano) y el tipo de formulación (0 a 100 % de leche cruda de vaca, oveja y cabra) en quesos españoles. En el presente estudio, se utilizó un rango de longitudes de onda de 4000 a 10000 cm⁻¹, lo que permitió la identificación de un gran número de señales, tal como un estudio previo reportado por Bittante et al., (2022).

La Figura 25A muestra dentro de los gráficos NIR elaborados a partir de la matriz de datos brutos, tres señales estrechas específicas asociadas a (C4:0 a C16:0)

AGS, observadas para los siete estándares AGS: 8262 cm^{-1} (sobretono $-\text{CH}_2$), 6665 ($-\text{OH}$ - estiramiento), 5666-5778 $\text{C}=\text{O}$ en ácidos grasos.

Paralelamente, para todos los quesos analizados de Q_1 a Q_{12} , la Figura 25B muestra señales de 4000 a 4500 cm^{-1} y 5500 a 6100 cm^{-1} , respectivamente asociadas a la vibración $-\text{CH}-$ y a la vibración $\text{C}=\text{O}$ en combinación con los CH -grupos de primer sobretono.

La Figura 26 muestra la matriz de datos NIR A de los quesos Q_1 a Q_{12} , con sus respectivas réplicas de adquisición utilizadas como entradas de datos para los análisis PCA y PLS-DA. Se utilizaron rangos de longitud de onda NIR idénticos para el post-procesamiento de la matriz de datos NIR A en la matriz de datos NIR B (Figura 26) y la matriz de datos NIR C (Figura 28).

La resolución de los espectros en bruto de la matriz de datos NIR A se mejoró mediante un post-procesado de span de la primera derivada, aunque con la pérdida intrínseca de la relación señal-ruido (Bou-Orm et al., 2020). Para productos lácteos, Lobos-Ortega et al., (2021) reportan diferentes tratamientos de los datos, como la aplicación de la segunda derivada para generar un modelo que discrimina quesos de diferentes especies (leche de vaca, oveja y cabra) en base a su composición en ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, en el modelo descrito por Zhao et al., (2023), diseñado para detectar ácidos grasos en leche de vaca mediante la técnica infrarrojo medio (por sus siglas en inglés mid-infrared MIR), se utilizaron cinco algoritmos de pre-procesado de datos, revelando las ventajas de utilizar rutinas de post-procesado de primera y segunda derivada, con una R^2 que indica una alta fiabilidad.

Además, Pereira et al., (2019) utilizaron rutinas de post-procesamiento MIR de primera y segunda derivadas como modelos capaces de discriminar la mantequilla elaborada con grasa de leche, respecto a la mantequilla adulterada con grasa de soja, encontrando discriminación entre mantequilla auténtica y falsificada mediante el modelo de ácidos grasos propuesto, con valores

aceptables de error cuadrático medio (RMSE), error relativo de predicción (RE %) y (R^2) cuando los espectros MIR se post-procesaron con rutinas de primera y segunda derivadas.

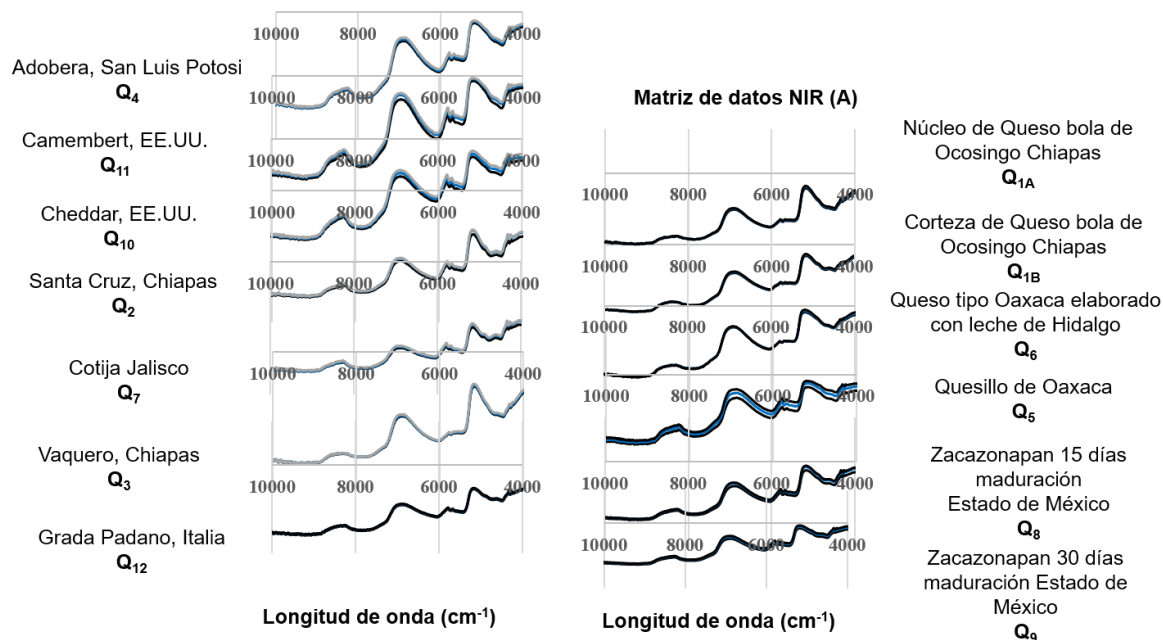


Figura 26. Espectros crudos de absorbancia NIR adquiridos por triplicado, del conjunto completo de quesos Q_1 a Q_{12} analizados, denominada "matriz de datos NIR A" (véanse los materiales y métodos).

Para el presente estudio, la aplicación de una rutina de primera derivada para producir datos NIR de la matriz de datos NIR B a partir de la matriz de datos NIR A, se observan tres regiones discriminantes principales: 8000 a 10000 (sobretono -CH-), 5000 a 6000 (modo de vibración C=O) y 4000 a 5000 cm^{-1} (vibración -CH-), como se destaca en la Figura 27. Las señales coinciden con las tres regiones señaladas por Ayvaz et al., (2021) para los ácidos grasos del queso Ezine.

Respecto al modo de adquisición en función del tipo de muestra, los datos NIR de los dos quesos rallados Q_1 - Q_{12} (Figuras 25-28), de los estándares de estado líquido S_1 a S_4 y de los estándares de estado sólido S_5 a S_7 (Figuras 25 y 29), se realizaron en modo de absorbancia. Confirmándose con espectros NIR de productos lácteos equivalentes adquiridos en el modo de reflectancia (Sørensen

et al., 2021; Ikehata, 2021), al igual que informes anteriores que describen modos de adquisición de reflectancia NIR para quesos frescos liofilizados rallados (Lucas et al., 2008), rebanada de queso (Soto-Barajas et al., 2013; González-Martín et al., 2020; Lobos-Ortega et al., 2021) y extractos de grasa de queso (González-Martín et al., 2020) para predecir los ácidos grasos en todos los casos. Otros informes han utilizado la adquisición de datos del modo de transmitancia en quesos molidos, para generar modelos predictivos de ácidos grasos (Manuelian, Currò, Penasa, et al., 2017). El método de transmitancia se utiliza normalmente para materiales líquidos o sistemas sólidos con capas finas (Mishra et al., 2020; Manuelian, Currò, Visentin, et al., 2017). La precisión del modo de adquisición de absorbancia NIR aquí utilizado para analizar el par de quesos rallados Q_1 - Q_{12} y los estándares S_1 a S_7 , también se han encontrado otros quesos que utilizan modos de adquisición de reflectancia-transmitancia (Manuelian, Currò, Visentin, et al., 2017) o transflectancia (Núñez-Sánchez et al., 2016) con NIR.

Hasta donde se sabe, pocos informes describen métodos fáciles y directos para la selección de longitudes de onda variables "binning de datos" Zhong et al., (2023) de espectros del infrarrojo cercano para realizar análisis multivariantes. A continuación, se presenta una alternativa sencilla de datos NIR:

1. Las frecuencias relevantes de los espectros NIR se dejan como en la entrada bruta.
2. Las frecuencias que no deban tenerse en cuenta en los datos MSA post-procesados simplemente se eliminan de los datos NIR brutos, poniendo a cero las regiones de frecuencias que no se tienen en cuenta dentro de una selección de longitud de onda variable de una matriz de datos NIR no puesta a cero.

La Figura 27 muestra la matriz de datos NIR C de los quesos Q_1 a Q_{12} , obtenida a partir de la matriz de datos NIR B (Figura 27), puesta a cero de las regiones de frecuencia no relevantes. Con una mayor resolución espectral, se aprecian tres

rangos de frecuencias principales respectivamente en: 9700 - 8265 cm^{-1} , 6661 - 4655 cm^{-1} y 4327 - 4003 cm^{-1} .

Estos rangos de números de onda NIR corresponden a los sobretonos y a los modos de vibración principales de los ácidos grasos, lo que concuerda plenamente con informes anteriores que utilizaron espectroscopia NIR para identificar AGS de cadena media C6:0 a C16:0 -principalmente ácido palmítico en productos elaborados con leche de vaca de los 5780.3–5665.7 cm^{-1} -C=O- modo de vibración carboxílico (González-Martín et al., 2020); un modelo de perfil de ácidos grasos para distinguir los orígenes geográficos de los quesos de Coalho, principalmente a partir de los modos de vibración 5882.3 – 5404.4 cm^{-1} (Oyedele, 2021); sobretonos -CH- respectivamente en 8403.3 y 5847.9 cm^{-1} procedentes de un estudio sobre el queso Ricotta (Madalozzo et al., 2015) y de un modelo aplicado en quesos Abondance y Tomme de Savoie encontraron modos de vibración clave =C(sp²)-H y -OH- en 4664.2 cm^{-1} y 6666.6 cm^{-1} respectivamente (Lucas et al., 2008).

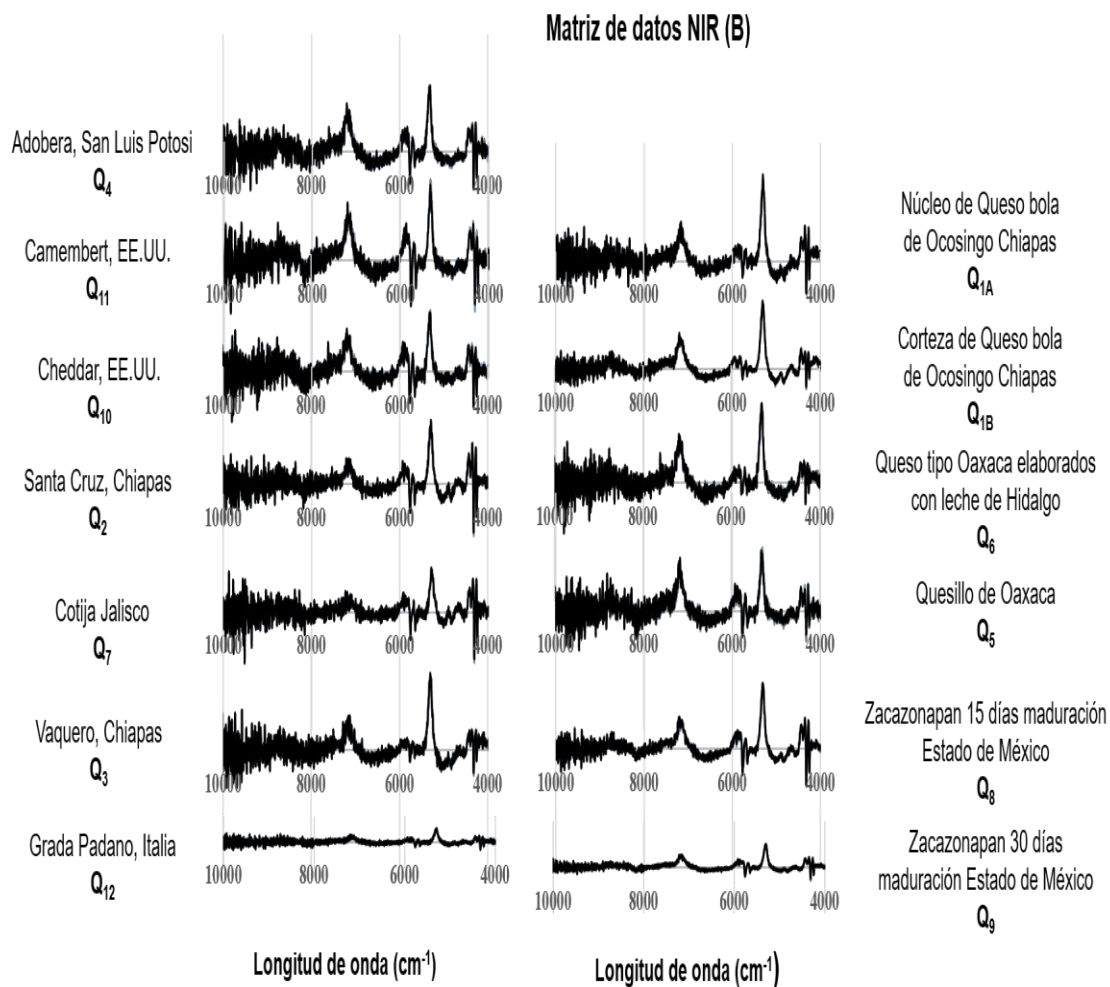


Figura 27. Espectros post-procesados de absorbancia NIR de primera derivada adquiridos por triplicado, del conjunto completo de quesos analizados, denominado "matriz de datos NIR B".

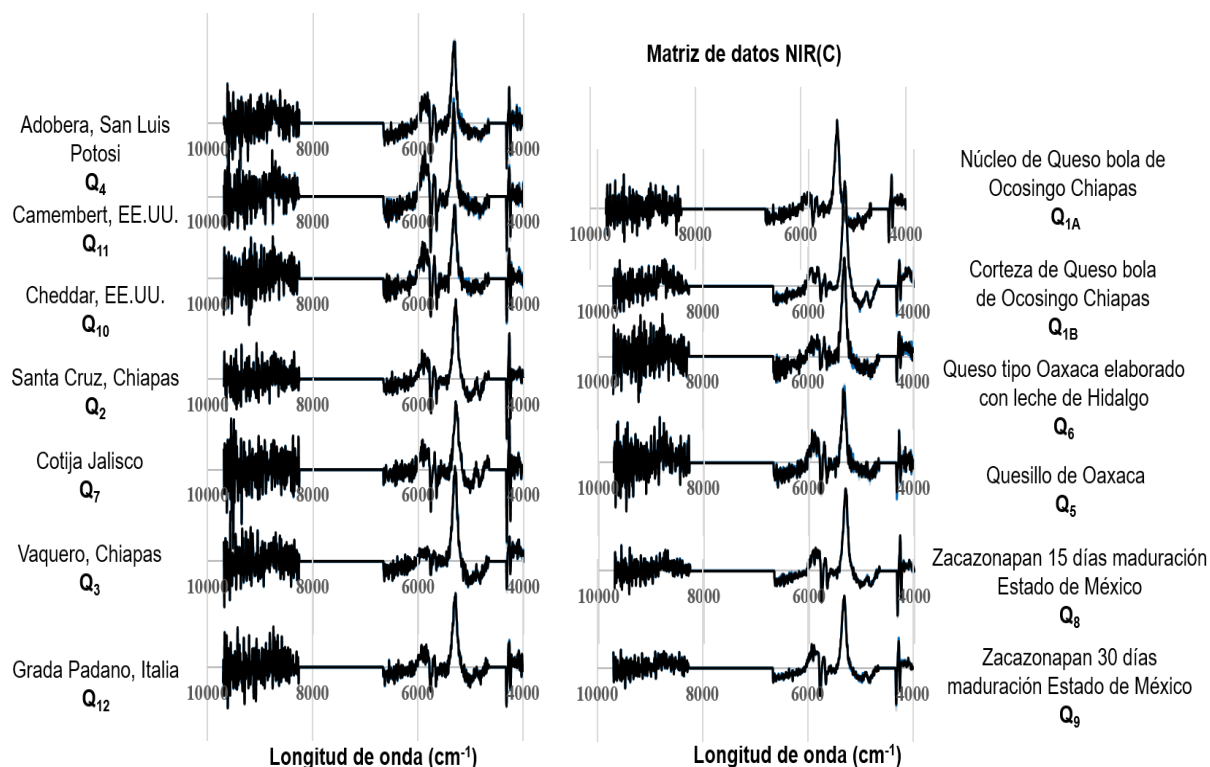


Figura 28. Espectros de absorbancia de rangos NIR seleccionados por primera derivada, adquiridos por triplicado, del conjunto completo de quesos analizados, denominado "matriz de datos NIR C".

La Figura 29 presenta la matriz de datos NIR A, B y C de siete estándares de ácidos grasos S_1 =ácido butírico (C4:0), S_2 =ácido hexanoico (C6:0), S_3 =ácido octanoico (C8:0), S_4 =ácido decanoico (C10:0), S_5 =ácido dodecanoico (C12:0), S_6 =ácido mirístico (C14:0) y S_7 =ácido palmítico (C16:0). Las frecuencias relevantes esperadas de las que se ha informado en otros lugares, asociadas a los modos de vibración AGS incluyen: 4327 y 4273 cm^{-1} (-CH-primer sobretono), 5492 y 6171 cm^{-1} (-CH-), 5666 y 5797 cm^{-1} (C=O), 6665 cm^{-1} (-OH-), 8262 cm^{-1} (-CH₂) y 8532 - 9689 (-CH- segundo sobretono) (González-Martín et al., 2020; Silva et al., 2021).

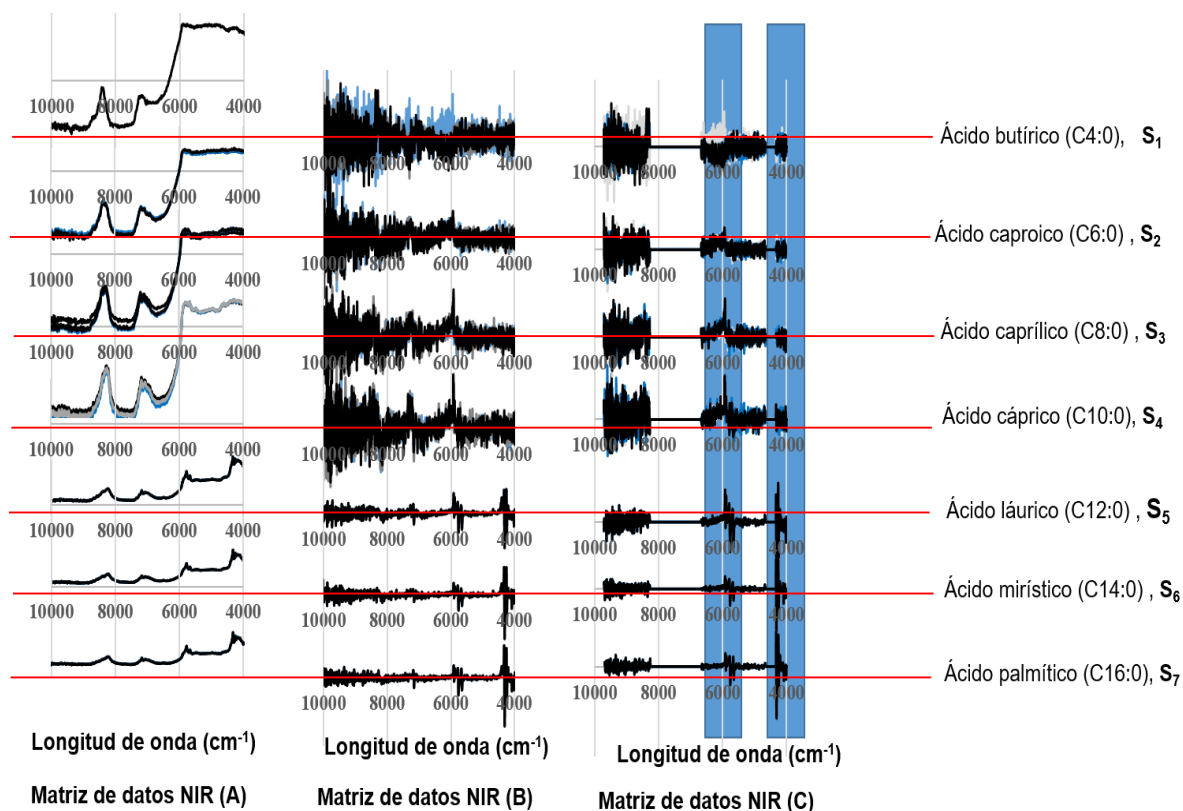


Figura 29. NIR de los estándares de ácidos grasos S_1 a S_7 (A) datos de absorbancia brutos. (B) Espectros NIR de primera derivada post-procesados y (C) post-procesado primera derivada NIR con intervalos seleccionados.

La Figura 30 presenta el flujo de trabajo para llevar a cabo matrices de datos de cada matriz NIR A, B y C como entradas para el análisis estadístico multivariante PCA y PLS-DA realizado con el software de análisis de datos metabolómicos MetaboAnalyst 5.0 (vide infra). En primer lugar, todas las adquisiciones NIR se exportaron desde el programa Bruker OPUS 7.8, formato del instrumento, a un formato estándar IUPAC universal del Comité Conjunto sobre Datos Físicos Atómicos y Moleculares (Joint Committee on Atomic and Molecular Physical Data JCAMP-DX). Posteriormente, todos los datos se convirtieron a un formato de valores separados por comas (CSV), utilizando el script conversor de archivos JCAMP-DX a CSV del departamento de quimioinformática de la Escuela Politécnica Federal de Suiza, disponible en la siguiente página web: <https://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/JcampConverter/index.html>. Los resultados de los scripts de conversión JCAMP-DX se copian y pegan en

hojas de cálculo Excel en formato editable de valores separados por comas (csv). Los archivos (csv) se organizaron primero en un formato de entrada de dos variables (variable "mz" para números de onda / variable "into" para absorbancias [matriz de datos A], Δ Absorbancias [matriz de datos B] y Δ^2 Absorbancias [matriz de datos C]) adecuado para el software MetaboAnalyst 5.0. La Figura 30 muestra el ejemplo de esta matriz de dos variables (número de onda / absorbancias [Δ^2]) trazada para la matriz de datos NIR A (ruta de la flecha amarilla, utilizando Q₂= Santa Cruz® como ejemplo dentro de la figura), matriz de datos NIR B (ruta flecha roja, utilizando Q₄= Adobera, queso de San Luis Potosí como ejemplo en la Figura) y la matriz de datos NIR (flecha verde, utilizando Q₁₂= queso Grana Padano como ejemplo en la Figura) y matriz de datos NIR C (flecha verde, utilizando Q₁₂= queso Grana Padano como ejemplo en la Figura). Cada uno de los triplicados de datos NIR brutos y de la primera derivada (completa y puesta a cero) se guardaron en carpetas definidas por su factor discriminante (Q₁-Q₁₂ quesos / S₁-S₇ estándares). Todos los conjuntos de variables se organizaron a su vez en un formato zip adecuado como entradas de análisis estadístico Metaboanalyst 5.0 estándar de un factor.

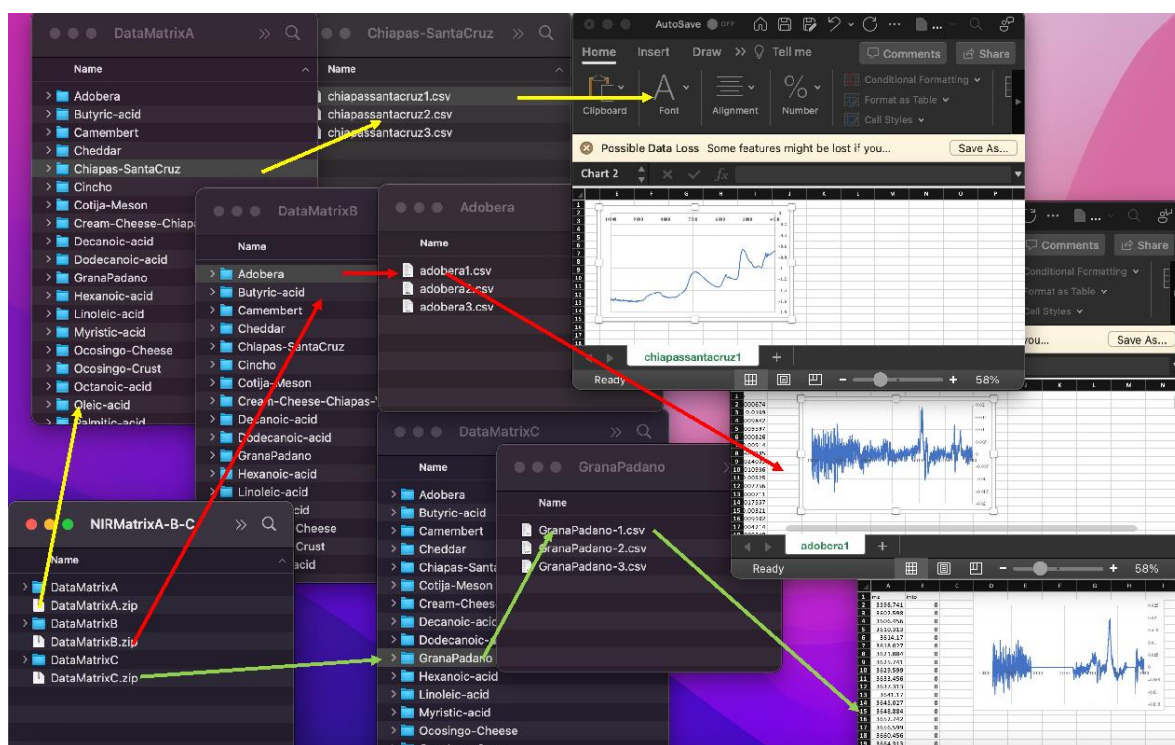


Figura 30. Flujo de trabajo para producir las matrices de datos NIR A (flechas amarillas), B (flechas rojas) y C (flechas verdes) como entradas para el análisis estadístico multivariante. (flechas rojas) y C (flechas verdes) como entradas para el análisis estadístico multivariante realizado con el software de análisis de datos metabolómicos racionalizado MetaboAnalyst 5.0.(<http://www.metaboanalyst.ca/>)

La Figura 31 muestra la puntuación PCA no supervisada (arriba) y los biplots (abajo) obtenidos a partir de las matrices de datos NIR A (izquierda), B (centro) y C (derecha).

El gráfico de puntuación PCA de la matriz de datos A presenta un componente principal 1 (PC1) del 80.6 % de varianza y PC2 del 16.2 % de varianza, que explican conjuntamente el 96.8 % de la variabilidad total de los datos. El gráfico de puntuación PCA de la matriz de datos B presenta un PC1 29.2 % y un PC2 de 13.1 % explicando en conjunto el 42.3 % de la variabilidad total de los datos. Por último, el gráfico de puntuación del PCA de la matriz de datos C presenta un PC1 de 28.4 % y PC2 de 12.9 %, explicando ambos componentes el 41.3 % de la variabilidad total de los datos. A pesar de tener mejor explicación de la varianza con la matriz de datos NIR A, las primeras derivadas (completa-matriz de datos NIR B- y a cero -matriz de datos NIR C-) son las entradas que mejor agrupan las muestras, como se observa en los gráficos biplot de la Figura 31 (abajo), mientras que los vectores representan variables explicativas en las que cuanto más y mejor distribuidas están desde el origen, mejor es el modelo para discriminar entre los factores discriminantes. El uso de la matriz de datos brutos A tiene limitaciones, como el uso de pocas variables discriminantes, puede causar una sobreestimación del modelo, como se observa en los biplots PCA producidos con la matriz de datos brutos de absorbancia NIR, que se muestran en la Figura 31, a la izquierda.

Por otro lado, el uso de una matriz de datos de absorbancia NIR disminuye considerablemente la varianza y tiene un mayor número de variables discriminantes (es decir, más vectores discriminantes dentro del biplot) y, por tanto, un modelo más fiable para desentrañar diferencias sutiles entre los quesos y los estándares de ácidos grasos. Se han utilizado PCA y MPLS combinados

para reducir señales NIR no relevantes para producir matrices de datos NIR altamente discriminantes y para cuantificación de ácidos grasos, realizando componentes principales para dilucidar características metabolómicas relacionadas con quesos descongelados y frescos, con varianzas aceptables de alrededor del 72 % para discriminar características relacionadas con la frescura de los quesos, con sólo dos componentes principales (González-Martín et al., 2020; Lucas et al., 2008).

Todos los conjuntos de datos NIR producen gráficos de puntuación PCA (Figura 31, arriba) que definen los quesos Q₁-Q₁₂ en el origen (PC1, PC2), mientras que los estándares S₁- S₇ se distribuyen en diferentes coordenadas (PC1, PC2). Cuanto más cerca estén las coordenadas S₁-S₇ del origen Q₁-Q₁₂, sugerirán la presencia de un AGS específico en los quesos. En todos los casos, S₅- S₇ (C12:0, C14:0 y C16:0) AGS comparten la dimensionalidad PCA con el conjunto completo de Q₁-Q₁₂ quesos. El gráfico de puntuación PCA de la matriz de datos C representa mejor la equivalencia PCA de las puntuaciones de los AGS láurico, mirístico y palmítico con el conjunto completo de quesos analizados, lo que sugiere claramente su presencia en los productos lácteos. Se han descrito ácidos grasos mirísticos (C14:0) y palmíticos (C16:0) en quesos frescos (Lucas et al., 2008) y también en leche de vaca, que contiene además ácido esteárico (C18:0) (Khattab et al., 2019). Por otra parte, el ácido láurico se asocia a un fuerte sabor jabonoso en los quesos (Ianni et al., 2020; Broadhurst et al., 2018). El hecho de que todas las muestras de queso se agruparan cerca de cero en todos los ensayos PCA, también se ha reportado en el análisis de control de calidad metabolómico, mientras que los productos lácteos se han mezclado explícitamente con AGS en diferentes proporciones (Dudzic et al., 2018; Grassi et al., 2022).

La Figura 32 representa el PLS-DA supervisado del conjunto completo de matrices de datos csv NIR que presentan las siguientes varianzas (%), bondad de predicción (Q²) y bondad del ajuste matemático (R²):

- Matriz de datos NIR A PLS-DA valor atípico: 85.5 % ($Q^2= 0.43$ y $R^2=0.45$).
- Matriz de datos NIR B PLS-DA valor atípico: 37.6 % ($Q^2= 0.78$ y $R^2=0.82$).
- Matriz de datos NIR valor atípico C PLS-DA: 37.0 % ($Q^2= 0.83$ y $R^2= 0.9$).

En todos los casos, el uso de 3 componentes PLS-DA es suficiente para presentar discriminaciones observadas del 43 %, 78 % y 83 %, respectivamente (Figura 32, abajo). PLS-DA de la matriz de datos A presenta un PC1 de 79.6 y un PC2 del 5.9 %, que explican el 85.5 % de la variabilidad total de los datos. El gráfico de puntuación PLS-DA de la matriz de datos B presenta un PC1 de 25.0 % y PC2 del 12.6, explicando ambos componentes el 37.6 % de la variabilidad total de los datos. Por último, en el gráfico de puntuación PLS-DA de la matriz de datos C los dos primeros componentes explican el 37.0 % de la variabilidad total de los datos. El mejor modelo es el que se obtuvo a partir de la matriz C debido a que tiene mayor dispersión de las variables explicativas.

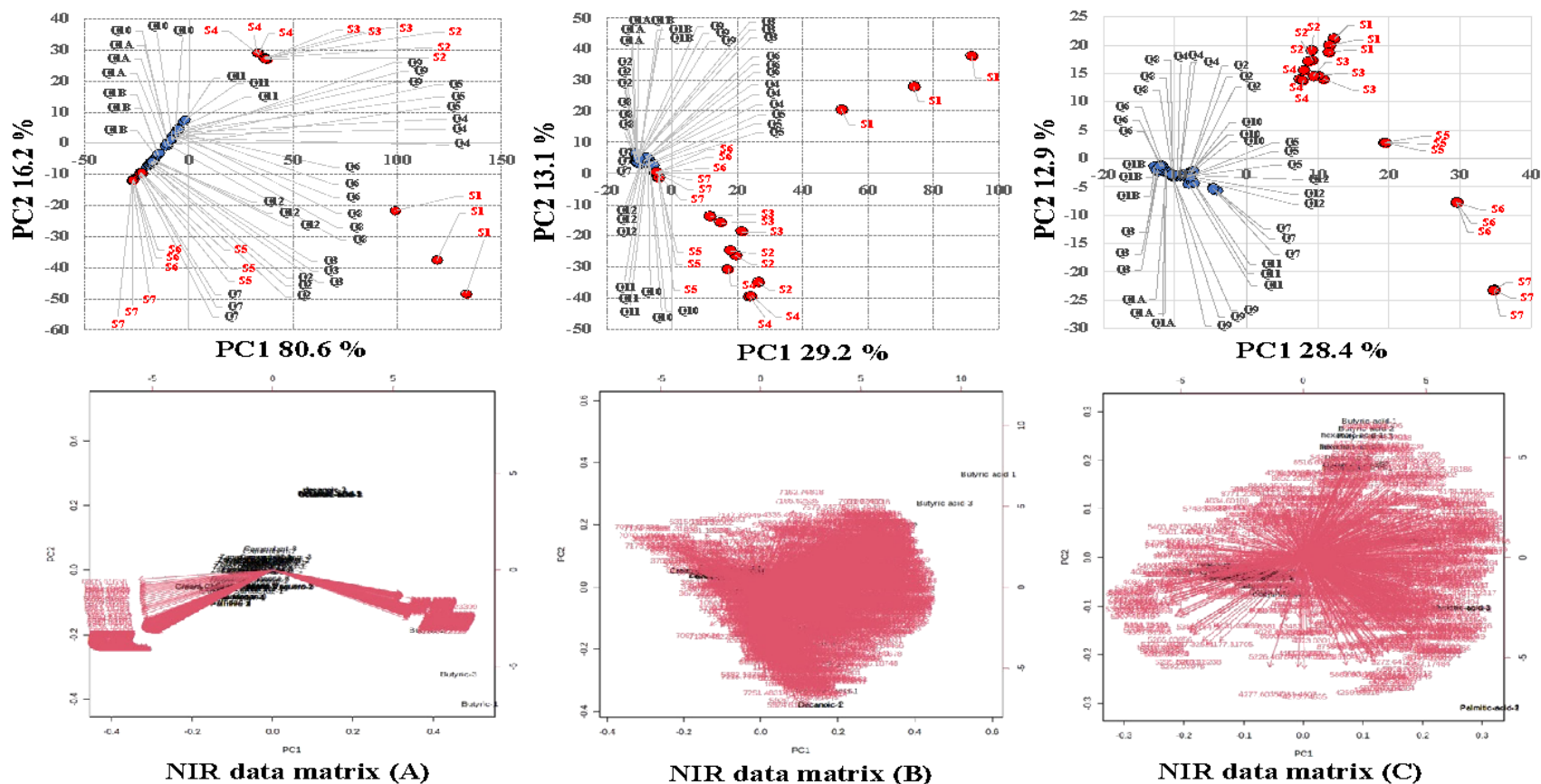


Figura 31. Gráficos de puntuación del Análisis de Componentes Principales (ACP) no supervisado (arriba) y biplots entre los componentes principales 1 y 2 (abajo) de cada análisis estadístico multivariante realizado con la matriz de datos NIR A (izquierda), la matriz de datos B (centro) y la matriz de datos C (derecha). Los gráficos de puntuación Q₁-Q₁₂ de los quesos están resaltados en azul, mientras que los gráficos de puntuación S₁-S₇ de los estándares están resaltados en rojo.

En comparación con el PCA no supervisado, el análisis estadístico multivariante supervisado de matrices de datos NIR produce gráficos de puntuación con varianzas de dos componentes equivalentes y una notable mejora de la separación de variables. Los PCA de los tramos NIR de la primera derivada (matriz de datos B) y de los tramos NIR seleccionados de la primera derivada (matriz de datos C) solo producen una separación pronunciada entre los estándares S₁-S₇ y los quesos Q₁-Q₁₂, con respecto al gráfico de puntuación PCA de la matriz de datos NIR A, siendo las puntuaciones de los quesos definidas en su mayor parte dentro del origen del PCA.

Con el modelo PLS-DA más discriminante obtenido con la matriz C de datos NIR, las muestras se dispersan a lo largo de los ejes, mientras que se observa una separación por origen geográfico entre quesos mexicanos (Q₁-Q₉, con PC2 positivo o próximo a cero) y extranjeros (Q₁₀-Q₁₂, componente PC2 negativo). Los quesos mexicanos presentan la misma dimensionalidad positiva PC2 que los estándares de ácidos grasos de cadena baja S₁ a S₅ (ácido butírico, hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico). Por el contrario, los gráficos de puntuación PLS-DA de los quesos americanos e italianos analizados con la matriz de datos NIR C, presentan la misma dimensionalidad negativa PC2 que con los estándares S₆ (ácido mirístico) y S₇ (ácido palmítico) de AGS, lo que sugiere mayor contenido dentro de su composición. Respecto al conjunto de quesos mexicanos, los quesos Zacazonapan de 15 días (Q₈) y 30 días (Q₉) de maduración contienen parcelas de puntuación PLS-DA muy similares y, por tanto, no presentan una discriminación evidente del tiempo de maduración, con el modelo de análisis estadístico multivariante seleccionado. Se observa una tendencia similar para el queso de bola de Ocosingo obtenido de su núcleo (Q_{1B}) y de su corteza (Q_{1A}), sin separación evidente entre los gráficos de puntuación, lo que sugiere fuertemente su composición similar, incluyendo su perfil de AGS.

Por otro lado, el queso tipo Oaxaca (Q₆, PC1 (-), PC2 (-)) de Hidalgo y su homólogo quesillo oaxaqueño (Q₅, PC1 (-), PC2 (+)) presentan diferencias significativas en las gráficas de puntuación PLS-DA, con el modelo multivariante

obtenido a partir de la matriz C de datos NIR. Las diferencias encontradas podrían considerarse como una huella de origen geográfico, ya que las condiciones climáticas, ambientales y la alimentación del ganado son únicas de cada región. Además, las dos marcas de quesos de Chiapas analizadas (Q₂ Santa Cruz®, PC1 (-), PC2 (-)) y Q₃ Vaquero®, PC1 (-), PC2 (+)) presentan ligeras diferencias en sus parcelas de puntuación. El modelo comparativo con las normas S₁-S₇ AGS podría sugerir que este conjunto de diferencias se debe al contenido de ácidos grasos en cada producto lácteo analizado. Así como, con las muestras americanas e italianas con una dimensionalidad PC2 negativa equivalente con C14:0 (S₆, ácido mirístico) y C16:0 (S₇, ácido palmítico), los quesos mexicanos que presentan la misma tendencia son Q_{1A} /Q_{1B} (Ocosingo, Chiapas), Q₂ (Queso Crema de Chiapas), Q₄ (Adobera, San Luis Potosí) y Q₆ (Hidalgo).

Validación de datos mediante agrupación jerárquica de la matriz A de datos NIR brutos, la matriz B de datos NIR de la primera derivada y la matriz C de datos de los intervalos NIR seleccionados de la primera derivada, matriz de datos NIR derivados B y la primera matriz de datos NIR derivados seleccionados C (estrategia de agrupación de frecuencias de las regiones comprendidas entre 9700 y 8265 (sobretono -CH-), 6661 y 4655 cm⁻¹(sobretono -C=O-) y de 4327 a 4000 cm⁻¹(-CH-)), mostradas como dendrogramas se representan en la Figura 33.

Para los clusters (grupos) de estándares AGS, se observan tres conjuntos principales:

- i) ácidos grasos de bajo peso molecular S₁ (C4:0, butírico), S₂ (C6:0, hexanoico), S₃ (C8:0, octanoico) y S₄ (C10:0, decanoico)
- ii) AGS de peso molecular medio S₅ (C12:0, ácido láurico)
- iii) ácidos S₆ (C14:0, mirístico) y S₇ (C16:0, palmítico) de mayor peso molecular.

En cuanto a los conglomerados de quesos, se observan cuatro conjuntos principales:

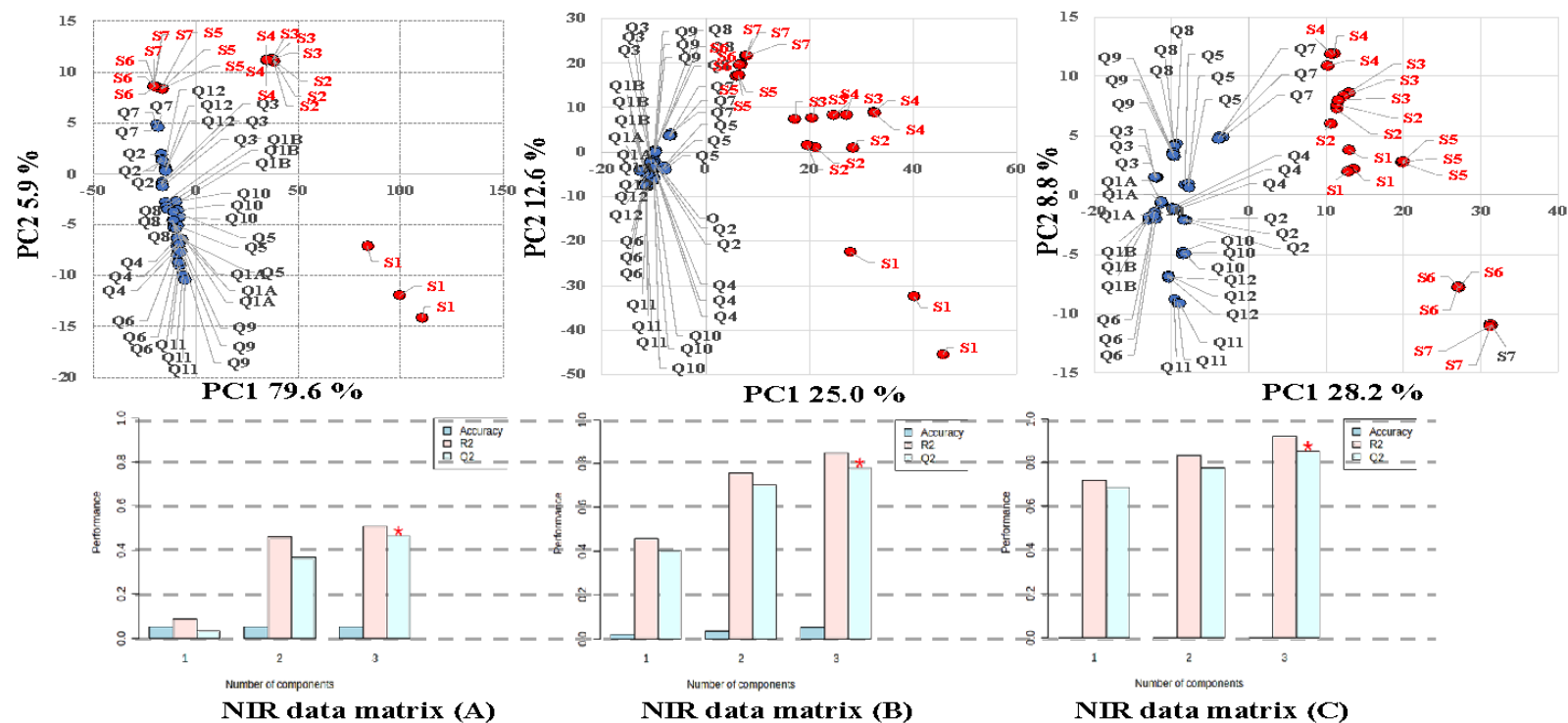


Figura 32. Gráficos de puntuación del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) (arriba) y representación en histograma (abajo) de la bondad del ajuste del MSA (R^2) y la bondad de la predicción (Q^2) de cada análisis estadístico multivariante realizado con la matriz de datos NIR A (izquierda), la matriz de datos B (centro) y la matriz de datos C (derecha). Los gráficos de puntuación Q1-Q12 de quesos están resaltados en azul, mientras que los gráficos de puntuación S1-S7 de los estándares están resaltados en rojo. La bondad de predicción (Q^2 , histogramas turquesa) y la bondad del ajuste matemático (R^2 , histogramas rosas) se obtuvieron con sólo tres componentes PLS-DA principales, mientras que la contribución de cada componente se resalta como 1, 2 y 3 conjuntos de histogramas.

Validación de datos mediante agrupación jerárquica de la matriz de datos brutos NIR A, matriz de datos NIR de la primera derivada B y la primera derivada seleccionada NIR abarca la matriz de datos C (estrategia de agrupación de frecuencias de las regiones comprendidas entre 9700 y 8265 (sobretono -CH-), 6661 y 4655 cm^{-1} (sobretono -C=O-) y de 4327 a 4000 cm^{-1} (-CH-), se muestran en forma de dendrogramas en la Figura 33.

Para los clusters de estándares AGS, se observan tres conjuntos principales:

- i) ácidos grasos de bajo peso molecular S_1 (C4:0, butírico), S_2 (C6:0, hexanoico), S_3 (C8:0, octanoico) y S_4 (C10:0, decanoico)
- ii) AGS de peso molecular medio S_5 (C12:0, ácido láurico)
- iii) ácidos S_6 (C14:0, mirístico) y S_7 (C16:0, palmítico) de mayor peso molecular.

En cuanto a los conglomerados de quesos, se observan cuatro conjuntos principales:

- i) Q_{11} (Camembert, Estados Unidos), Q_4 (Adobera, San Luis Potosí, México), Q_5 (Quesillo artesanal, Oaxaca, México) y Q_{12} (Grana Padano, Italia)
- ii) Q_8 (Zacazonapan 15 días de maduración, Estado de México), Q_9 (Zacazonapan 30 días de maduración, Estado de México), Q_{1A} (Corteza de queso bola de Ocosingo, Chiapas, México) Q_{1B} (Ocosingo queso de bola, Chiapas, México), Q_2 (Santa Cruz® "queso Crema", Chiapas, México) y Q_3 (Vaquero® "queso Crema", Chiapas, México)
- iii) Q_6 (queso tipo Oaxaca, Hidalgo, México) y Q_{10} (Cheddar, Tillamook®, Estados Unidos)
- iv) Q_7 (queso Cotija, Jalisco, México)

Esta agrupación jerárquica de la matriz de datos NIR C se correlaciona con las observaciones anteriores del gráfico de puntuación PLS-DA, como la clasificación de las categorías de AGS bajo (S_1 - S_4), medio (S_5) y alto (S_6 - S_7), los quesos

mexicanos (Q_1 - Q_9) son iguales a los estadounidenses e italianos (Q_{10} - Q_{12} , excepto por la falta de diferencia de jerarquía entre Q_6 y Q_{10}), quesos del mismo tipo pero diferente origen geográfico (Q_5 / Q_6) y la falta de discriminación entre muestras del mismo origen pero diferentes procesos de maduración (Q_8 - Q_9) o superficies de los quesos (Q_{1A} - Q_{1B}). Estudios anteriores que utilizaron dendrograma incluyeron un modelo para rastrear el tiempo de maduración de los quesos mediante la identificación de perfiles de ácidos grasos en quesos tipo Cottage, Holandés, Suizo, Azul e Italiano en la agrupación de dendrogramas mediante un criterio basado en la agrupación por distancias euclidianas y la aglomeración por el método de Ward (Szterk et al., 2022; Oliva-Cruz et al., 2021).

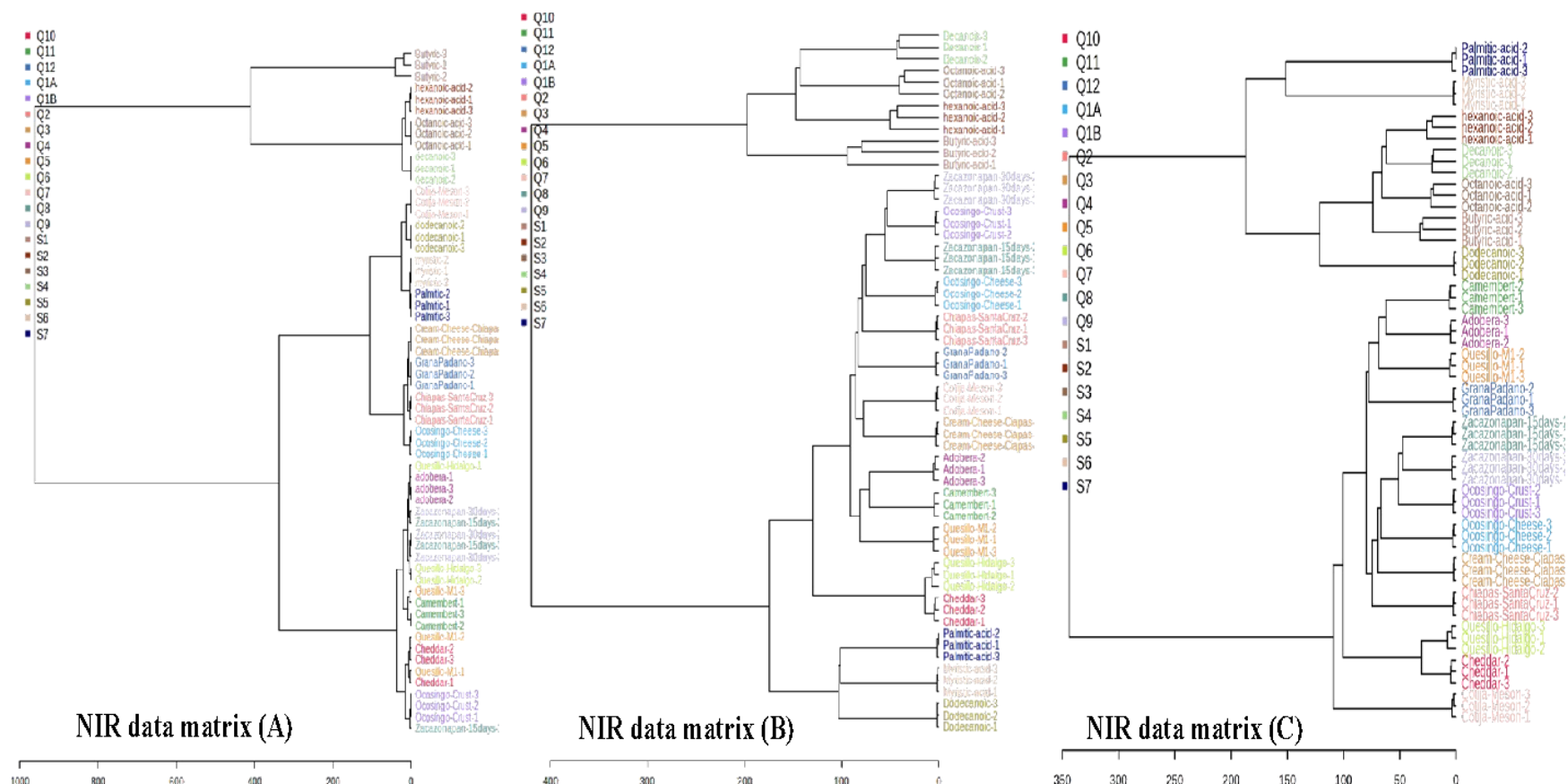


Figura 33. Agrupación jerárquica de la matriz A de datos NIR brutos (extremo izquierdo), la matriz B de datos NIR de la primera derivada (centro) y la matriz C de datos C de los intervalos NIR seleccionados de la primera derivada (extremo derecho), mostradas como dendrogramas, utilizando distancias euclidianas y algoritmos de agrupación para las mediciones de distancia entre las muestras.

6.6. Conclusiones

Se discute el uso de tres matrices diferentes de datos de infrarrojo cercano para el análisis estadístico multivariante (no) supervisado con la herramienta de datos metabolómicos Metaboanalyst. El muestreo de datos comprende 19 triplicados de espectros de absorbancia NIR de nueve quesos mexicanos, dos estadounidenses y uno italiano, además se evaluaron siete estándares AGS. Las entradas de datos NIR de absorbancia por triplicado son: i) tramos adquiridos de 12500 a 3600 cm^{-1} , ii) tramos NIR de primera derivada de todo el rango de frecuencias adquirido y iii) tramos NIR de primera derivada seleccionados poniendo a cero todos los rangos de frecuencias excepto de 9700 a 8265, de 6661 a 4655 cm^{-1} y de 4327 a 4000 cm^{-1} como estrategia de agrupación de longitudes de onda NIR.

Todos los espectros NIR de la matriz de datos A se exportaron del formato del instrumento, a una matriz de datos NIR (A) matriz de datos NIR (B) matriz de datos NIR (C) formato estándar universal JCAMP-DX IUPAC. Posteriormente, todos los datos se convirtieron a un formato de valores separados por comas (CSV), utilizando el script conversor de archivos JCAMP-DX a CSV. Los resultados de la conversión se copiaron y pegaron en hojas de cálculo Excel en formato editable de valores separados por comas (.csv). Los archivos (.csv) individuales se organizaron en una entrada de dos variables adecuada tanto para NIR con Microsoft Excel para producir las matrices de datos NIR B y C y para el MSA llevado a cabo con el software MetaboAnalyst 5.0. La matriz de datos NIR C fue la mejor entrada para analizar las correlaciones entre los quesos y los estándares AGS, mientras que su análisis discriminante PLS supervisado proporcionó los valores más fiables de bondad de ajuste matemático ($R^2 = 0.9$) y de predicción del modelo ($Q^2 = 0.83$).

Ninguno de los modelos PLS-DA NIR fue capaz de discriminar entre factores discriminantes específicos de muestras del mismo origen como la maduración (Q_8/Q_9) o la superficie de los quesos como el núcleo o la corteza (Q_{1A} / Q_{1B}), pero el modelo C de matriz de datos NIR mejor seleccionado diferenció con precisión

entre muestras mexicanas, americanas e italianas, quesos del mismo tipo pero diferente origen geográfico (Q₅ / Q₆), y quesos del mismo tipo y origen geográfico pero diferente marca (Q₂/Q₃), este último también confirmado con el análisis jerárquico de conglomerados. El modelo comparativo entre los quesos Q₁-Q₁₂ con las normas S₁-S₇ AGS podría sugerir que el conjunto de diferencias observadas se debe al contenido de ácidos grasos en cada producto lácteo analizado.

6.7. Literatura citada

- Amores, G., & Virto, M. (2019). Total and Free Fatty Acids Analysis in Milk and Dairy Fat. *Separations*, 6(1), 14. <https://doi.org/10.3390/separations6010014>
- Ayvaz, H., Mortas, M., Dogan, M. A., Atan, M., Yildiz Tiryaki, G., & Karagul Yuceer, Y. (2021). Near- and mid-infrared determination of some quality parameters of cheese manufactured from the mixture of different milk species. *Journal of Food Science and Technology*, 58(10), 3981-3992. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04861-0>
- Beleggia, R., Platani, C., Papa, R., Di Chio, A., Barros, E., Mashaba, C., Wirth, J., Fammartino, A., Sautter, C., Conner, S., Rauscher, J., Stewart, D., & Cattivelli, L. (2011). Metabolomics and Food Processing: From Semolina to Pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9366-9377. <https://doi.org/10.1021/jf2022836>
- Bittante, G., Patel, N., Cecchinato, A., & Berzaghi, P. (2022). Invited review: A comprehensive review of visible and near-infrared spectroscopy for predicting the chemical composition of cheese. *Journal of Dairy Science*, 105(3), 1817-1836. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20640>
- Bou-Orm, N., AlRomaithi, A. A., Elrmeithi, M., Ali, F. M., Nazzal, Y., Howari, F. M., & Al Aydaros, F. (2020). Advantages of first-derivative reflectance spectroscopy in the VNIR-SWIR for the quantification of olivine and hematite. *Planetary and Space Science*, 188, 104957. <https://doi.org/10.1016/j.pss.2020.104957>
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., & Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*, 14(6), 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1), e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Collomb, M., Bisig, W., Bütikofer, U., Sieber, R., Bregy, M., & Etter, L. (2008). Seasonal variation in the fatty acid composition of milk supplied to dairies in the mountain regions of Switzerland. *Dairy Science & Technology*, 88(6), 631-647. <https://doi.org/10.1051/dst:2008029>

- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.041>
- Curto, B., Moreno, V., García-Esteban, J. A., Blanco, F. J., González, I., Vivar, A., & Revilla, I. (2020). Accurate Prediction of Sensory Attributes of Cheese Using Near-Infrared Spectroscopy Based on Artificial Neural Network. *Sensors*, 20(12), 3566. <https://doi.org/10.3390/s20123566>
- Davies, T. (1993). Book Reviews: Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis, Ft-NIR Atlas: Something Old, Something New. *NIR News*, 4(5), 12-12. <https://doi.org/10.1255/nirn.212>
- Downey, G., Sheehan, E., Delahunty, C., O'Callaghan, D., Guinee, T., & Howard, V. (2005). Prediction of maturity and sensory attributes of Cheddar cheese using near-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 15(6), 701-709. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.06.013>
- Dudzik, D., Barbas-Bernardos, C., García, A., & Barbas, C. (2018). Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 149-173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.044>
- Garrido-Varo, A., Carrete, R., & Fernández-Cabanás, V. (1998). Use of Difference near Infrared Reflectance Spectra to Extract Relevant Information from the Spectra of Agro-Food Products. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6(1), 89-95. <https://doi.org/10.1255/jnirs.125>
- Gautam, R., Vanga, S., Ariese, F., & Umapathy, S. (2015). Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy. *EPJ Techniques and Instrumentation*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1140/epjti/s40485-015-0018-6>
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Salvador-Esteban, J., González-Pérez, C., Revilla, I., & Vivar-Quintana, A. (2011). Discrimination of seasonality in cheeses by near-infrared technology: Discrimination of seasonality in cheeses by NIR technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1064-1069. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4283>
- González-Martín, M. I., Severiano-Pérez, P., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., Hernández-Hierro, J. M., González-Pérez, C., & Lobos-Ortega, I. A. (2011). Prediction of sensory attributes of cheese by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 127(1), 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.105>
- González-Martín, M. I., Vivar-Quintana, A. M., Revilla, I., & Salvador-Esteban, J. (2020). The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*, 156, 104854. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104854>
- Grassi, S., Tarapoulouzi, M., D'Alessandro, A., Agriopoulou, S., Strani, L., & Varzakas, T. (2022). How Chemometrics Can Fight Milk Adulteration. *Foods*, 12(1), 139. <https://doi.org/10.3390/foods12010139>
- Herbert-Pucheta, J. E., Lozada-Ramírez, J. D., Ortega-Regules, A. E., Hernández, L. R., & Anaya de Parrodi, C. (2021). Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics with Double Pulsed-Field-Gradient Echo and

- Automatized Solvent Suppression Spectroscopy for Multivariate Data Matrix Applied in Novel Wine and Juice Discriminant Analysis. *Molecules*, 26(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules26144146>
- Hewavitharana, G. G., Perera, D. N., Navaratne, S. B., & Wickramasinghe, I. (2020). Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8), 6865-6875. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.06.039>
- Hourant, P., Baeten, V., Morales, M. T., Meurens, M., & Aparicio, R. (2000). Oil and Fat Classification by Selected Bands of Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 54(8), 1168-1174. <https://doi.org/10.1366/0003702001950733>
- Ianni, A., Bennato, F., Martino, C., Grotta, L., & Martino, G. (2020). Volatile Flavor Compounds in Cheese as Affected by Ruminant Diet. *Molecules*, 25(3), 461. <https://doi.org/10.3390/molecules25030461>
- Ikehata, A. (2021). NIR Optics and Measurement Methods. En Y. Ozaki, C. Huck, S. Tsuchikawa, & S. B. Engelsen (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Theory, Spectral Analysis, Instrumentation, and Applications* (pp. 211-233). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8648-4_9
- Kalivodová, A., Hron, K., Filzmoser, P., Najdekr, L., Janečková, H., & Adam, T. (2015). PLS-DA for compositional data with application to metabolomics. *Journal of Chemometrics*, 29(1), 21-28. <https://doi.org/10.1002/cem.2657>
- Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., & Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 343-360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
- Llano Suárez, P., Soldado, A., González-Arrojo, A., Vicente, F., & de la Roza-Delgado, B. (2018). Rapid on-site monitoring of fatty acid profile in raw milk using a handheld near infrared sensor. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.03.003>
- Lobos-Ortega, I., Hernández-Jiménez, M., González-Martín, M. I., Hernández-Hierro, J. M., Revilla, I., & Vivar-Quintana, A. M. (2021). *Study of Polyunsaturated Fatty Acids in Cheeses Using Near-Infrared Spectroscopy: Influence of Milk from Different Ruminant Species*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/7342792>
- Lucas, A., Andueza, D., Ferlay, A., & Martin, B. (2008). Prediction of fatty acid composition of fresh and freeze-dried cheeses by visible–near-infrared reflectance spectroscopy. *International Dairy Journal*, 18(6), 595-604. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.12.001>
- Madalozzo, E. S., Sauer, E., & Nagata, N. (2015). Determination of fat, protein and moisture in ricotta cheese by near infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1649-1655. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1147-z>
- Manuelian, C. L., Currò, S., Penasa, M., Cassandro, M., & De Marchi, M. (2017). Prediction of minerals, fatty acid composition and cholesterol content of

- commercial cheeses by near infrared transmittance spectroscopy. *International Dairy Journal*, 71, 107-113.
- Manuelian, C. L., Currò, S., Visentin, G., Penasa, M., Cassandro, M., Dellea, C., Bernardi, M., & De Marchi, M. (2017). Technical note: At-line prediction of mineral composition of fresh cheeses using near-infrared technologies. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6084-6089. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12634>
- Markiewicz-Kęszycka, M., Czyżak-Runowska, G., Lipińska, P., & Wójtowski, J. (2013). Fatty Acid Profile of Milk—A Review. *Journal of Veterinary Research*, 57(2), 135-139. <https://doi.org/10.2478/bvip-2013-0026>
- Marshall, D. D., & Powers, R. (2017). Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 100, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.01.001>
- Mishra, P., Roger, J. M., Rutledge, D. N., & Woltering, E. (2020). SPORT pre-processing can improve near-infrared quality prediction models for fresh fruits and agro-materials. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111271. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111271>
- Núñez-Sánchez, N., Martínez-Marín, A. L., Polvillo, O., Fernández-Cabanás, V. M., Carrizosa, J., Urrutia, B., & Serradilla, J. M. (2016). Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chemistry*, 190, 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.083>
- Oliva-Cruz, M., Mori-Culqui, P. L., Caetano, A. C., Goñas, M., Vilca-Valqui, N. C., & Chavez, S. G. (2021). Total Fat Content and Fatty Acid Profile of Fine-Aroma Cocoa From Northeastern Peru. *Frontiers in Nutrition*, 8, 677000. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.677000>
- Oyedele, O. F. (2021). Extension of biplot methodology to multivariate regression analysis. *Journal of Applied Statistics*, 48(10), 1816-1832. <https://doi.org/10.1080/02664763.2020.1779192>
- Pereira, C. G., Leite, A. I. N., Andrade, J., Bell, M. J. V., & Anjos, V. (2019). Evaluation of butter oil adulteration with soybean oil by FT-MIR and FT-NIR spectroscopies and multivariate analyses. *LWT*, 107, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.072>
- Pérez-Enciso, M., & Tenenhaus, M. (2003). Prediction of clinical outcome with microarray data: A partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. *Human Genetics*, 112(5-6), 581-592. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-0921-9>
- Rodríguez-Otero, J. L., Hermida, M., & Centeno, J. (1997). Analysis of Dairy Products by Near-Infrared Spectroscopy: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2815-2819. <https://doi.org/10.1021/jf960744p>
- Saccenti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A., & Hendriks, M. M. W. B. (2014). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 10(3), 361-374. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0598-6>

- Šašić, S., & Ozaki, Y. (2000). Band Assignment of Near-Infrared Spectra of Milk by Use of Partial Least-Squares Regression. *Applied Spectroscopy*, 54(9), 1327-1338. <https://doi.org/10.13600037020019510026/>
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1991). New Standardization and Calibration Procedures for Nirs Analytical Systems. *Crop Science*, 31(6), crops1991.0011183X003100060064x. <https://doi.org/10.2135/crops1991.0011183X003100060064x>
- Silva, L. K. R., Jesus, J. C., Onelli, R. R. V., Conceição, D. G., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2021). Discriminating Coalho cheese by origin through near and middle infrared spectroscopy and analytical measures. Discrimination of Coalho cheese origin. *International Journal of Dairy Technology*, 74(2), 393-403. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12767>
- Sørensen, K. M., van den Berg, F., & Engelsen, S. B. (2021). NIR Data Exploration and Regression by Chemometrics—A Primer. En Y. Ozaki, C. Huck, S. Tsuchikawa, & S. B. Engelsen (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy: Theory, Spectral Analysis, Instrumentation, and Applications* (pp. 127-189). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8648-4_7
- Soto-Barajas, M. C., González-Martín, M. I., Salvador-Esteban, J., Hernández-Hierro, J. M., Moreno-Rodilla, V., Vivar-Quintana, A. M., Revilla, I., Ortega, I. L., Morón-Sancho, R., & Curto-Diego, B. (2013). Prediction of the type of milk and degree of ripening in cheeses by means of artificial neural networks with data concerning fatty acids and near infrared spectroscopy. *Talanta*, 116, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.043>
- Subramanian, A., Prabhakar, V., & Rodriguez-Saona, L. (2011). Infrared spectroscopy in dairy analysis. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 115-124.
- Szterk, A., Ofiara, K., Strus, B., Abdullaev, I., Ferenc, K., Sady, M., Flis, S., & Gajewski, Z. (2022). Content of Health-Promoting Fatty Acids in Commercial Sheep, Cow and Goat Cheeses. *Foods*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/foods11081116>
- Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Bielińska, S., Stanisław, M., & Wójtowski, J. (2011). Camelina sativa cake improved unsaturated fatty acids in ewe's milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(11), 2031-2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4415>
- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Zhao, X., Song, Y., Zhang, Y., Cai, G., Xue, G., Liu, Y., Chen, K., Zhang, F., Wang, K., Zhang, M., Gao, Y., Sun, D., Wang, X., & Li, J. (2023). Predictions of Milk Fatty Acid Contents by Mid-Infrared Spectroscopy in Chinese Holstein Cows. *Molecules*, 28(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules28020666>
- Zhong, L., Huang, R., Gao, L., Yue, J., Zhao, B., Nie, L., Li, L., Wu, A., Zhang, K., Meng, Z., Cao, G., Zhang, H., & Zang, H. (2023). A Novel Variable Selection Method Based on Binning-Normalized Mutual Information for Multivariate Calibration. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(15), 5672. <https://doi.org/10.3390/molecules28155672>

7. CONCLUSIONES GENERALES

La secuenciación del gen 16S para bacterias e ITS para hongos y levaduras permitió conocer la diversidad microbiana a lo largo del tiempo de maduración del queso Crema de Chiapas. La dinámica del microbioma fue diferente a lo largo de la maduración, sin embargo, las BAL predominaron sobre otros grupos bacterianos. En el T3 se encontró una mayor cantidad de géneros microbianos; en los tiempos T1 y T2 los hongos y levaduras tuvieron una mayor cantidad de especies. Los extractos de queso Crema de Chiapas mostraron actividad antimicrobiana para cepas de *L. innocua* ATCC3309 y *M. luteus* CDBBB1018. Sin embargo, la inhibición del crecimiento microbiano por los extractos de queso dependió del tiempo de maduración similar a lo obtenido para la actividad antiinflamatoria.

El estudio de los extractos líquidos del queso Crema de Chiapas con metabolómica con RMN permitió identificar que la región aromática genera modelos más discriminantes para separar tiempos de maduración y queserías, que cuando se utilizó toda la región de desplazamientos químicos debido a que se eliminan desplazamientos que no contribuyen a la discriminación.

La metabolómica con NIR permitió separar quesos por su composición de ácidos grasos y se encontró que los ácidos saturados son los que estuvieron presentes en las muestras de quesos analizados. La innovación de este trabajo fue generar un diagrama de flujo de trabajo para analizar datos de NIR con Metaboanalyst, un programa de acceso libre en el que solo nos permitía realizar análisis de datos obtenidos de cromatografía de gases, HPLC y masas.

El estudio integral del queso desde un punto de vista multidisciplinario busca 1) poder generar confianza en cuanto a la inocuidad en el consumo de queso artesanal para las entidades reguladoras y 2) desentrañar las propiedades biológicas del queso que pueden ayudar a coadyuvar algunas enfermedades provocadas por la resistencia antimicrobiana o inflamación. Con esto, se espera

poder incentivar el consumo de quesos artesanales y en consecuencia mejorar las condiciones de vida de los queseros.

8. ANEXOS

Anexo 1A: Curva estándar de diclofenaco sódico.

