



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DEL QUESO SECO DE LA
TIERRA CALIENTE DE GUERRERO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:



MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

APROBADA



Presenta:

DIANA VÁZQUEZ QUIROZ

Bajo la supervisión de: TEODORO ESPINOSA SOLARES, DR.



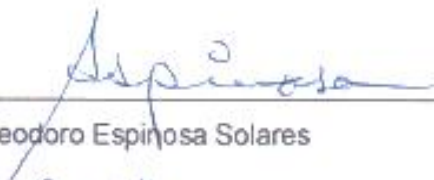
Chapingo, Estado de México, diciembre de 2023

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DEL QUESO SECO DE LA TIERRA CALIENTE DE GUERRERO

Tesis realizada por **DIANA VÁZQUEZ QUIROZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:


Dr. Teodoro Espinosa Solares

ASESOR:


Dra. Ofelia Sandoval Castilla

ASESOR:


Dra. Guadalupe Hernández Eugenio

ASESOR:


Dr. Alejandro Téllez Jurado

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS USADAS	vii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
DEDICATORIAS	x
DATOS BIBLIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL.....	xii
GENERAL ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
2.1 Marco teórico	16
2.1.1 Panorama de la industria quesera en México	16
2.1.2 Quesos mexicanos artesanales	17
2.1.3 Caracterización de los quesos artesanales	18
2.1.4 Microbiota de los quesos	19
2.1.5 Factores que influyen en la microbiota de los quesos artesanales.....	21
2.1.6 La microbiota de los quesos artesanales mexicanos como objeto de estudio.....	23
2.1.7 Caracterización de la composición microbiana: métodos dependientes de cultivo	25
2.1.8 Metagenómica.....	26
2.1.9 Metabolómica	28
2.1.10 Características de la región de estudio	30
2.2 Referencias	32
3. CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DEL QUESO SECO DE LA TIERRA CALIENTE DE GUERRERO.....	40
3.1 Introducción	40
3.2 Materiales y métodos.....	43

3.2.1 Muestras evaluadas	43
3.2.2 Análisis químico proximal	43
3.2.3 Análisis metagenómico.....	46
3.2.4 Análisis metabolómico.....	47
3.2.5 Análisis bioinformático.....	48
3.2.6 Análisis estadístico	48
3.3 Resultados y discusión	48
3.3.1 Análisis químico proximal	48
3.3.2 Perfil metagenómico del QSTCG	52
3.3.3 Perfil metabolómico del QSTCG	58
3.4 Conclusiones	69
3.5 Referencias	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis químico proximal del QSTCG.....	51
Cuadro 2. Metabolitos identificados en el QSTCG.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Región de la Tierra Caliente.	31
Figura 2. Índices de diversidad Shannon y Simpson.	53
Figura 3. Abundancia y total de géneros identificados en el QSTCG.	54
Figura 4. Composición microbiana a nivel de género presente en el QSTCG.	55
Figura 5. Gráfico de puntuación PCA de muestras de QSTCG que dos temporadas y productores.	64
Figura 6. Heat map que muestra los principales metabolitos presentes en todas las muestras del QSTCG.	66

ABREVIATURAS USADAS

°C: Grados Celsius

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AOAC: Association of Analytical Communities (Asociación de Comunidades Analíticas)

ARN: Ácido ribonucleico

a_w: Actividad de agua

DCA: Diseño completamente al azar

Ec: Ecuación

ESI: Electrospray (Electropulverización)

F: Factor proteico

FT-ICR MS: Espectrofotómetro de masas de resonancia de ciclotrón iónico por transformada de Fourier

g: Gramo

GC-MS: Cromatografía gases-espectrometría de masas

h: Hora

HTS: High-throughput sequencing (Secuenciación de alto rendimiento)

ITS: Internal Transcribed Space (Espacio interno transcrito)

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografía líquida-espectrometría de masas)

m/z: Masa/carga

M: Millones

min: Minutos

mL: Mililitro

mm: Milímetro

N: Normalidad

NGS: Next Generation Sequencing (Secuenciación de próxima generación)

NOM: Norma Oficial Mexicana

NRM: Nuclear Magnetic Resonance (Resonancia magnética nuclear)

P: Peso

PCA: Principal Component Analysis (Análisis de componentes principales)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

ph: Potencial de hidrógeno

QSTCG: Queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

V: Volumen

μL: Microlitros

μm: Micrómetro

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por darme la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida.

A mi comité asesor, Dr. Teodoro Espinosa Solares, Dra. Ofelia Sandoval Castilla, Dra. Guadalupe Hernández Eugenio y Dr. Alejandro Téllez Jurado en la dirección y culminación de esta investigación.

Al Ph.D. Baldomero Alarcón Zúñiga, Dr. Yair Cruz Narváez y I.B.Q. Félix Esparza Torres por la disposición y facilidades brindadas para llevar a cabo las actividades relacionadas con esta investigación.

A Doris, Mauricio y Lolita por la atención brindada y por facilitarme el material necesario para poder realizar la fase experimental de este trabajo.

A los queseros Edgar y Guillermina por brindar las muestras para realizar este estudio.

A mis entrañables amigas Jan, Karlita y Chío por su amistad, apoyo incondicional, por las vivencias que pudimos enfrentar juntas y por acompañarme durante esta travesía. ¡Las quiero!

A Memo por ser mi amigo, maestro y guía en esta aventura. ¡Gracias, Capitán!

A mis compañeros de generación, en especial a Lupita, Jenni e Isa por los momentos compartidos y sobre todo por su amistad.

A todas las personas que de alguna manera hicieron este logro posible.

DEDICATORIAS

A mi padre Albino:
con cada ladrillo que pegas,
se enciende una estrella en mi corazón.
Tus manos son casas
donde habito.

A mi madre Rosa:
eres luz en medio de la sombra.
Eres la prueba
de que Dios nos acompaña.

A mis hermanos Lalo, Luz, Albin y Niche:
en el cielo nocturno,
son los astros que guían
mi navegación.

A mi amor:
en las grietas de mi sangre,
sin saberlo florecías.

A mí:
sin brújula ni mapa,
y contra todo pronóstico,
cruzaste el mar
y encontraste el tesoro.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Diana Vázquez Quiroz

Fecha de nacimiento: 13 de octubre de 1996

Lugar de nacimiento: Chignahuapan, Puebla

Cédula Profesional: 12614874

Desarrollo Académico

Bachillerato: Colegio de Bachilleres del Estado de Puebla (Cobaep) P. 29

Licenciatura: Ingeniería en Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DEL QUESO SECO DE LA TIERRA CALIENTE DE GUERRERO

La microbiota y el metaboloma del queso desempeñan un papel fundamental, ya que influyen en el desarrollo de las características sensoriales y calidad del alimento. En este estudio se caracterizó la microbiota y se determinó el perfil metabolómico del queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero mediante las técnicas de secuenciación metagenómica *shotgun* y espectrometría de masas. El análisis metagenómico reveló mayor abundancia de los géneros *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Salinicola*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Anaplasma*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* en la mayoría de las muestras. Asimismo, se observó que la composición de la microbiota presentó diferencias entre temporada de lluvias y secas, mientras que entre los productores se observaron algunas similitudes. Se identificaron un total de 196 metabolitos de los cuales: glicéridos, glicerofosfolípidos, ácidos grasos, aminoácidos, péptidos, vitaminas, esfingolípidos y carbohidratos fueron los grupos con mayor presencia de metabolitos detectados. El perfil metabolómico mostró similitud entre ambas temporadas de producción, así como entre los productores evaluados. Los metabolitos detectados con más intensidad en la mayoría de las muestras fueron riboflavina, D-2-hidroxiglutarico, dimetilsulfona, ácido palmítico y ácido esteárico. Estos resultados reflejan que los análisis multiómicos tienen el potencial para determinar las relaciones que existen entre la microbiota y los metabolitos presentes en el queso.

Palabras clave: Metagenómica, metabolómica, microbiota, queso artesanal.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Diana Vázquez Quiroz

Director de Tesis: Dr. Teodoro Espinosa Solares

GENERAL ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE MICROBIOTA OF DRIED CHEESE FROM TIERRA CALIENTE DE GUERRERO

The microbiota and metabolome of cheese play a fundamental role since they influence the development of sensory characteristics and the quality of the food. In this study, the microbiota was characterized, and the metabolomic profile of Seco cheese from Tierra Caliente de Guerrero was determined using *shotgun* metagenomic sequencing and mass spectrometry techniques. Metagenomic analysis revealed a higher abundance of the genera *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Salinicola*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Anaplasma*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Lactococcus* in most samples. Likewise, it was observed that the composition of the microbiota presented differences between the rainy and dry seasons, while some similarities were observed among the producers. A total of 196 metabolites were identified, of which; glycerides, glycerophospholipids, fatty acids, amino acids, peptides, vitamins, sphingolipids, and carbohydrates were the groups with the highest presence of metabolites detected. The metabolomic profile showed similarity between both production seasons as well as between the evaluated producers. The most intensely detected metabolites in most samples were riboflavin, D-2-hydroxyglutaric acid, dimethylsulfone, palmitic acid, and stearic acid. These results reflect that multi-omics analyses have the potential to determine the relationships that exist between the microbiota and the metabolites present in cheese.

Key words: Metagenomics, metabolomics, microbiota, artisanal cheese.

Thesis of Master Science. Program of Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Diana Vázquez Quiroz

Advisor: Dr. Teodoro Espinosa Solares

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los quesos artesanales son alimentos que se producen en todo el mundo, y se caracterizan por su distintivo e intenso sabor, además de que se consumen tanto frescos como madurados (Licitra, 2010). Los quesos mexicanos artesanales simbolizan parte del patrimonio de nuestro país expresan la historia, la cultura y el *saber hacer* que se transmite de generación en generación (Villegas & Cervantes, 2011). En México se tienen caracterizados alrededor de más de 40 variedades de quesos artesanales (Villegas et al., 2016), entre los cuales se encuentra el queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero (QSTCG), un queso madurado que se elabora a partir de leche cruda de vaca, y con el mínimo de aditivos (*p. ej.* cuajo animal y sal).

La calidad y características sensoriales de los quesos se debe a diversos factores, entre los cuales destacan las técnicas de producción (Yang et al., 2020), las materias primas y el entorno en el que se elaboran (Laca et al., 2020), sin embargo, el factor más importante es la microbiota que se encuentra asociada a este alimento (Bottari et al., 2020). La microbiota presente en los quesos alberga gran diversidad de microorganismos que varían según el tipo de queso. Estas comunidades microbianas son de gran importancia, ya que influyen en el sabor, calidad y seguridad del producto (Jiang et al., 2022).

En los últimos años, y tras el surgimiento de las ciencias ómicas, se han empleado técnicas que brindan mayor capacidad de análisis como la metagenómica, la cual se asocia a métodos moleculares fundamentados en el ADN y ARN, la secuenciación de alto rendimiento (HTS) (Yeluri Jonnala et al., 2018) y el análisis con herramientas bioinformáticas (Scholz et al., 2016).

Dentro del desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, se encuentra la secuenciación metagenómica *shotgun*, la cual posee una mayor sensibilidad por lo que brinda información más detallada con respecto a la composición taxonómica de la microbiota presente en los quesos (Wolfe et al., 2014).

Otra área de las ciencias ómicas es la metabolómica, que permite la identificación y cuantificación de los metabolitos que son producto de distintos procesos bioquímicos (Johnson et al., 2016). La metabolómica se ha empleado como una técnica de análisis en los quesos para determinar el perfil del metaboloma, en particular aquellos compuestos que se relacionan con atributos del sabor (Afshari et al., 2020a). Por lo que la integración de la metagenómica y metabolómica representan la mejor herramienta para determinar la composición de la microbiota y determinar el perfil metabolómico presentes en el queso (Jiang et al., 2022).

En este estudio se planteó la siguiente hipótesis: la microbiota y el metaboloma del queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero presentarán variabilidad de acuerdo con los productores evaluados y la temporada de producción. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue caracterizar la microbiota asociada con el queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero, por medio de la secuenciación metagenómica *shotgun* y análisis metabolómico, para determinar como la microbiota presente impacta en las características que le otorgan su tipicidad a esta variedad de queso.

El proyecto de investigación se dividió en tres etapas con el fin de lograr el objetivo planteado. La primera se centró en determinar la composición químico proximal del QSTCG; la segunda consistió en caracterizar la microbiota mediante la extracción y secuenciación de ADN; en la tercera se determinó el perfil metabolómico a través de la técnica de espectrometría de masas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Marco teórico

2.1.1 Panorama de la industria quesera en México

En los últimos años la producción de leche ha mantenido un crecimiento anual en los últimos cinco años de entre 0.5 y 2 % (SIAP, 2019a), en el primer trimestre de 2019 la producción de leche de vaca fue de 2,867,215 L, 2.1 % más respecto al año 2018 con una producción de 2,807,876 L y se estima que México se mantenga en la octava posición en la producción mundial de leche (SIAP, 2019b).

Los principales estados productores de leche en el país son: Jalisco (20.26 %), Coahuila (11.27 %), Durango (10.21 %), Chihuahua (9.40 %), Guanajuato (7.08 %), Veracruz (6.03 %), Puebla (3.71 %), Chiapas (3.61 %) y México (3.58 %) (SIAP, 2019b). La producción lechera se regula en tres sectores, el sistema intensivo, el sistema doble propósito y el sistema familiar. Es decir, esquemas diferenciados por el tipo y número de cabezas de ganado que concentran por explotación, el nivel de adopción de tecnología y las condiciones de producción (Camacho-Vera et al., 2017).

La mayor parte de la leche que se produce en el país se utiliza para elaborar productos lácteos, y se estima que al menos el 35 % de la leche se utiliza para la elaboración de queso (SIAP, 2019a). En febrero de 2019, la industria quesera produjo 71 mil 456 toneladas de queso, con un valor en el mercado de 3 mil 774 millones de pesos, siendo las principales variedades de queso producidas: fresco (18.9 %), doble crema (15.6 %), chihuahua (11.4 %), panela (11.2 %) y amarillo (10.9 %) (SIAP, 2019b).

La agroindustria láctea es de los más importantes en la industria mexicana, hay registro de 1961 unidades manufactureras oficiales y un sinnúmero de pequeñas y medianas que laboran de manera informal (Pomeón & Cervantes 2010). Un porcentaje considerable de leche se destina al sector quesero que procesa de manera industrial, sin embargo, la quesería artesanal figura como una actividad y fuente económica importante en el país y principalmente para las regiones donde se producen, por lo tanto, es prescindible indagar en este rubro. Existen algunas regiones especializadas en la producción micro y mediana de queso como: Tulancingo, en Hidalgo; San José de Gracia, en Michoacán; la región sur de Tlaxcala-Puebla, la Costa de Chiapas; las colonias menonitas, en Chihuahua; la Sierra de Jalmich, entre otras, no obstante, las zonas de mayor producción se encuentran en los estados de Jalisco y Guanajuato (Pomeón & Cervantes 2010).

2.1.2 Quesos mexicanos artesanales

El queso se ha producido en México desde la época colonial, cuando los conquistadores españoles trajeron las primeras cabras y ovejas a la Nueva España. Con el paso del tiempo áreas con fuerte actividad pastoril se desarrollaron y luego se asociaron a la industria quesera (Cervantes et al., 2008). En nuestro país se producen quesos genuinos, de imitación y extranjeros. Existen alrededor de más de 40 quesos clasificados como genuinos, de los cuales algunos presentan mayor reconocimiento por sus volúmenes de producción como el queso Chihuahua, el tipo manchego mexicano, el panela, el asadero y el Cotija. Mientras que, otros se elaboran, consumen y asocian específicamente a ciertas regiones, por ejemplo, el queso crema de Chiapas, Queso Bola de Ocosingo, Chiapas, el queso añejo de Zacazonapan y el queso Poro de Tabasco (Villegas et al., 2016).

Los quesos mexicanos artesanales se definen como genuinos, legítimos, naturales y auténticos (Villegas & Cervantes, 2011). Su producción en la mayoría de los casos se asocia a pequeñas cuencas o regiones dedicadas a la elaboración específica de estos quesos (Pomeón & Cervantes 2010), en los cuales se valoran aspectos como historia, territorio y diversidad biocultural que le

brindan identidad al producto y que son considerados como atributos de calidad (Hernández-Moreno & Medina, 2014). Los ingredientes principales que se emplean para la obtención de este alimento son leche fluida cruda o pasteurizada (Villegas et al., 2016), cuajo, sal y la microbiota (Fox & Cogan, 2004). La producción de quesos artesanales es caracterizada por transmitir el conocimiento del saber hacer de generación en generación, empleando de esta manera técnicas con escasa tecnología de producción y manteniendo la materia prima e insumos originales (Villegas et al., 2016).

Aunado a lo anterior, los quesos artesanales son alimentos que transmiten genuinidad y representan la identidad de un territorio en particular (Berno & Fusté-Forné 2019), ya que permiten la difusión de el origen de la leche, la tierra, los maestros queseros y las recetas tradicionales que emiten las maneras de producción y consumo de queso con la tipicidad de una región (Fusté-Forné, 2020).

2.1.3 Caracterización de los quesos artesanales

La caracterización de un producto consiste en determinar su tipicidad, es decir, las características tangibles e intangibles que permiten identificarlo en el mercado (Pérez, 2017). Evaluar la integridad de los alimentos significa conocer el origen de la materia prima, el procesamiento, el origen geográfico y el sistema de producción. Como parte de las propiedades típicas del queso, una de las formas de entender su composición es por medio de métodos instrumentales que posibilitan la detección de su autenticidad (Galle et al., 2011).

La caracterización de los quesos tradicionales mexicanos debe estudiarse de una manera holística, de tal forma que se evalúen las características del producto en sí (Solís et al., 2009). Esta caracterización radica en examinar las distintas calidades del alimento, es decir, su calidad microbiológica, sensorial, fisicoquímica y simbólica (Pérez, 2017), que se establece por diversos factores como el medio ambiente, el clima, la raza del ganado, el tipo de alimentación de los animales, la microbiota nativa de la leche, el saber hacer, las herramientas y

utensilios tradicionales empleados y la maduración del queso, entre otros (Licitra, 2010).

La caracterización como herramienta para determinar la autenticidad de un producto, también puede servir como soporte científico para crear denominaciones de origen, marcas colectivas, identificaciones geográficas, ya que es bien sabido que hay una gran cantidad de productos en el mercado, pero cuando estos cuentan con alguna distinción, pueden generarse imitaciones (Millán et al., 2016). De ahí la importancia de estudiar los quesos tradicionales mexicanos para conservar y proteger estos productos, ya que su registro y documentación garantiza la referencia de las características que te otorgan tipicidad y que contribuyen a su permanencia, así como de las actividades relacionadas con su producción, comercialización y consumo (Linck et al., 2006).

2.1.4 Microbiota de los quesos

Los defensores de los quesos tradicionales exhortan a mantener una alta diversidad taxonómica de comunidades microbianas en los quesos artesanales y sostener diferentes métodos de producción. Esta postura parte de la premisa del hecho de que la diversidad de la actividad microbiana en conjunto con los métodos de producción específicos, contribuyen al desarrollo de las características peculiares de los quesos tradicionales, como la disminución de carga patógena y el perfil sensorial (Montel et al., 2014).

El queso es un alimento fermentado que contiene diferentes comunidades microbianas, es decir, posee una microbiota que cambia conforme transcurre el tiempo y varía de acuerdo con el tipo de queso (Afshari et al., 2020b). Los quesos albergan una microbiota que está constituida por consorcios procariotas, eucariotas y virales, sin embargo, las poblaciones principales corresponden a bacterias ácido lácticas (Mayo et al., 2021). La microbiota del queso contribuye significativamente a las características químicas y sensoriales típicas de las distintas variedades (Ianni et al., 2020), lo cual es propiciado por el crecimiento e

interacción de la diversidad microbiana que se lleva a cabo durante la producción y maduración (Bottari et al., 2020).

La diversidad y dinámica de la microbiota es muy compleja, esta varía desde el centro (núcleo) hasta la superficie del queso (Yeluri Jonnala et al., 2018). La biodiversidad tiende a disminuir en los núcleos del queso, donde predominan las especies de bacterias ácido lácticas (BAL), mientras que en la superficie esta biodiversidad permanece, ya que alberga especies bacterianas, levaduras y mohos. Generalmente los quesos elaborados a partir de leche cruda presentan una microbiota nativa más abundante en comparación con los quesos producidos con leche pasteurizada (Montel et al., 2014).

La BAL tienen un dominio en el núcleo, ya que se adaptan a las condiciones que se presentan como bajo pH, alto contenido de NaCl, un ambiente anaeróbico, falta de carbohidratos fermentables, etc. (Montel et al., 2014). Las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB) predominan en casi todas las variedades de queso producidos de manera artesanal o no. Los *Lactobacillus* mesófilos representan las NSBAL más habituales, su abundancia durante la maduración de los quesos a base de leche cruda depende del tipo de pasta del queso (blanda, semidura, dura) (Quigley et al., 2012) y el tiempo de maduración (Gatti et al., 2008).

Las NSBAL termófilas son las comunidades microbianas viables que dominan desde el proceso de producción hasta la maduración (Grappin et al., 1999), las principales especies de LAB termófilas presentes en las diversas variedades de queso son *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus fermentum* (Bouton et al., 2002). Mientras tanto, entre la diversidad microbiana subdominante se encuentran las levaduras, bacterias Gram positivas catalasa positivas, enterococos y pediococos son subdominantes (Rossi et al., 2012). No obstante, las BAL representan el grupo microbiano dominante, registrando al menos 21 especies diferentes, las especies de mayor dominio son: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc*

mesenteroides, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Montel et al., 2014).

En la superficie de los quesos, al ser un ecosistema más abierto que el núcleo (Law, 2010) en donde hay mayor disponibilidad de O₂, se desarrollan primordialmente levaduras, mohos y bacterias aeróbicas como *Corynebacteriaceae* y *Micrococcaceae*. Las superficies de los quesos presentan una mayor diversidad de especies y géneros de eucariotas y procariotas, se han registrado alrededor de 30 especies de levaduras, que abarcan 14 géneros, de los cuales las principales especies son *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata*, *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica* (Montel et al., 2014). Mientras que, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* son las poblaciones bacterianas más dominantes (Quigley et al., 2012). La biodiversidad y dinámica de la microbiota que se encuentra presente en los quesos tradicionales es muy compleja que representa un papel crucial en la determinación de la tipicidad de cada variedad existente (De Filippis et al., 2016).

2.1.5 Factores que influyen en la microbiota de los quesos artesanales

La microbiota presente en los quesos artesanales procede de diversas fuentes de origen y está influenciada por varios factores. El tipo de leche cruda y/o pasteurizada, el cuajo, los cultivos iniciadores, las hierbas, las especias (Sudagidan et al., 2021), el medio ambiente (Yang et al., 2021), el equipo de producción, las prácticas de elaboración empleadas (Montel et al., 2014), el contenido de sal, los grados de maduración, los tanques de salmuera, las tinas, los estantes de maduración, los cuchillos y otras superficies en las instalaciones de producción (Yeluri Jonnala et al., 2018). Esta colonización depende de las características de la superficie, la disponibilidad y composición de nutrientes, la capacidad de los microorganismos para formar biopelículas, factores ecológicos y de los operadores (Stellato et al., 2015).

La composición y diversidad microbiana difiere de la leche cruda a la pasteurizada, entre la cuajada, el suero, el queso y el origen (leche de vaca, cabra y oveja). La microbiota de la leche cruda está influenciada por las cargas microbianas presentes en el canal del pezón, la superficie de la piel del pezón, las prácticas de higiene, los cuidadores de animales y la microbiota autóctona de los equipos y recipientes de almacenamiento (Quigley et al., 2012). La diversidad de microorganismos presentes en la leche es tan diversa que se tiene registrado la presencia de más de 100 géneros y al menos 400 especies diferentes; principalmente bacterias Gram negativas, Gram positivas catalasa-positivas, bacterias ácido lácticas, levaduras y hongos (Montel et al. 2014). El tratamiento a alta temperatura (pasteurización) y el bajo pH también contribuyen a la selección de bacterias específicas en algunos quesos artesanales que se elaboran en ausencia de bacterias iniciadoras (De Filippis et al., 2014).

La adición de ingredientes también influye en la microbiota, en un estudio referente a quesos artesanales irlandeses, se refleja como las proporciones de lactobacilos incrementaron y los lactococos disminuyeron por la adición de hierbas, mientras que el elevado contenido de sal inhibió la proliferación de *Leuconostoc* y *Pseudomonas* (Quigley et al., 2012). Las salmueras también influyen en la diversidad microbiana, estas dependen del tipo de queso a elaborar, la planta quesera específica y las concentraciones de salinidad. Se ha reportado que algunas de las bacterias adventicias encontradas en la salmuera, como *Staphylococcus equorum*, puede presentar una actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes* en las superficies del queso, además puede influir en el desarrollo de propiedades sensoriales como el sabor y olor de quesos madurado (Yeluri Jonnala et al., 2018). No obstante, si la salmuera se encuentra contaminada esta a su vez puede contaminar el núcleo y la superficie de los quesos por ello se recomienda la supervisión e higienización periódicamente (Marino et al., 2017).

La limpieza es un factor importante en la eliminación de las bacterias de deterioro que se encuentran en de las superficies de las plantas lecheras, mientras que el tipo de material de la superficie tiene una gran influencia en la adherencia de las bacterias. Los materiales como el plástico son más porosos y no viables para una limpieza profunda, ya que son sensibles al agua caliente, lo que provoca corrosión e incrementa la posibilidad de que se adhieran las bacterias (Stellato et al., 2015).

2.1.6 La microbiota de los quesos artesanales mexicanos como objeto de estudio

Los quesos mexicanos genuinos son parte de la tradición y cultura del país, sin embargo, ante la presión competitiva de los productos de imitación y la falta de revalorización del público se encuentran desapareciendo paulatinamente, aunado a la pérdida de nuestras tradiciones gastronómicas y de nuestra propia identidad (Villegas & Cervantes, 2011). Por ello, se han encausado investigaciones con el fin de documentar, caracterizar, salvaguardar y revalorizar los quesos mexicanos por medio de diversas estrategias y métodos de estudio. Ejemplo de ello es el queso Cotija, un queso mexicano artesanal elaborado a partir de leche cruda, su maduración se lleva a cabo en un ambiente abierto, por lo tanto, la humedad, la lluvia y la temperatura se consideran como parámetros importantes. Aunado, a las superficies de madera que se emplean para amasar la cuajada durante la salazón, las cubas y mesas utilizadas en el proceso de elaboración del queso funcionan como una importante fuente microbiana que se encuentra en el queso. A partir del análisis metagenómico de secuencias del gen 16S ADN_r se reporta que alrededor del 80% de la población bacteriana está formada por *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, y *Weissella paramesenteroides*, y por más de 500 géneros subdominantes pertenecientes a 31 phyla (bacterias y arqueas), *Dehalobacter*, *Desulfohalobium*, *Halomonas*, *Thermohalobacter* y *Haloquadratum* por mencionar solo algunos ejemplos (Escobar-Zepeda et al., 2016).

El queso de hebra o quesillo es un queso estirado de pasta filata que también se ha investigado, referente a su microbiota, a través del uso de la secuenciación de alto rendimiento (high-throughput sequencing) del gen 16S/18S ADNr, se ha descrito la microbiota del núcleo que reporta a nivel de género *Streptococcus* (70.8 %), *Lactococcus* (12.5 %), *Escherichia-Shigella* (6.8 %) y *Lactobacillus* (1.8 %) como las bacterias en mayor abundancia. Mientras que, en el caso de hongos, los géneros dominantes son *Scheffersomyces* (67.3 %), *Saccharomyces* (18.8 %), *Galactomyces* (4.6 %) y *Candida* (2.9 %) (Murugesan et al., 2018). El queso de Bola de Ocosingo producido en Chiapas a partir de leche cruda es otro ejemplo en el que la aplicación de la secuenciación de alto rendimiento ha revelado la composición de su microbiota, donde predominan especies como *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* y *L. plantarum*, y en niveles más bajos *Escherichia coli/Shigella flexnerii* se encuentran presentes en casi todas las etapas del proceso (Aldrete-Tapia et al., 2018).

Otro estudio referente a la caracterización de los quesos artesanales mexicanos es el realizado al queso Poro producido en Tabasco, en esta investigación por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aprecia la abundancia de *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. farciminis* y *L. rhamnosus* como los principales microorganismos encontrados en este queso (González-Ariceaga et al., 2019). El queso Adobera de los Altos de Jalisco, se ha descrito como un queso de pasta filata, fresco a ligeramente maduro, elaborado con leche de vaca cruda de la raza, acidificado por su microbiota autóctona, de pH bajo y elevado contenido de humedad (Villegas et al., 2014), referente a su microbiota y por el uso de secuenciación de alto rendimiento de librerías de 16S/18S ADNr, se ha determinado que los géneros bacterianos dominantes en son *Streptococcus* (68-77 %), *Lactococcus* (13-21 %) y *Lactobacillus* (5.7 %). Mientras que en el caso de hongos se reporta que la microbiota está representada por los géneros *Galactomyces*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Scheffersomyces*, *Candida* y *Dikarya* (Murugesan et al., 2018).

A pesar de los estudios referentes a los quesos artesanales mexicanos, la información disponible de mayoría de distintas variedades sigue siendo limitada. Por lo cual, discernir la microbiota asociada con la leche y el queso cobra mayor importancia para entender cómo todas las etapas del proceso de producción del queso influyen en la microbiota albergada, y a su vez cómo esta impacta en las características sensoriales y de bioseguridad del alimento (Tilocca et al., 2020).

2.1.7 Caracterización de la composición microbiana: métodos dependientes de cultivo

Los quesos artesanales se han considerado como poco seguros desde el punto de vista microbiológico, por lo cual, para hacer frente a los riesgos sanitarios y mejorar su calidad, hasta hace unos años la investigación se enfocaba principalmente en la detección de microorganismos patógenos y la evaluación de la calidad microbiológica del queso mediante métodos dependientes del cultivo (Metz et al., 2020).

Los métodos tradicionales de identificación se basan en los análisis fenotípicos y fisiológicos de las poblaciones microbianas. La identificación comienza con el examen morfológico de colonias aisladas en un medio sólido selectivo, y continúa la observación microscópica de frotis de microorganismos aislados previamente teñidos de acuerdo con la técnica de Gram, posteriormente se realiza la inoculación y las pruebas bioquímicas, es necesario purificar el respectivo microorganismo para luego obtener suficiente biomasa y realizar pruebas tales como: sistemas indicadores de pH, formación o degradación de determinadas sustancias y actividades enzimáticas (Nieto et al., 2004).

Sin embargo, las técnicas de microbiología basadas en cultivos presentan limitaciones en términos de reproducibilidad y desafíos en la capacidad de cultivo de algunos microorganismos (Jung et al., 2011). Aunque la enumeración y el aislamiento microbianos resultan útiles para discernir cambios en la población y preservar la diversidad microbiana, solo pueden revelar la fracción de comunidades microbianas viables y cultivables. Además, la profundidad del

análisis depende de la cantidad y selectividad de los medios apropiados de cultivo apropiados (Penland et al., 2021). Por lo tanto, los métodos dependientes de cultivo no permiten tener una imagen completa de la microbiota existente (Kothe et al., 2022), ya que tienen una capacidad limitada para detectar microorganismos "difíciles de cultivar" o subdominantes, lo que puede dar resultados engañosos (Yeluri Jonnala et al., 2018).

2.1.8 Metagenómica

Los métodos de microbiología clásica basados en la dependencia de cultivos para realizar el estudio de la microbiota asociada al queso cambiaron a enfoques independientes de cultivo con el advenimiento de las ciencias ómicas más recientes (Afshari et al., 2020b). Estos enfoques han permitido determinar la composición y el rol que juega la comunidad microbiana presente en la leche cruda destinada a la producción de queso y que a su vez conforman la microbiota de este, también brindan una conceptualización holística de las biomoléculas responsables de la estructura, función y dinámica de consorcios de microorganismos que co-habitan en el mismo nicho ecológico (Tilocca et al., 2020). Las disciplinas involucradas en la cuantificación e identificación de estas biomoléculas relacionadas con la microbiota son la metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica, métodos basadas en el estudio de ADN, ARN, proteínas y metabolitos respectivamente, procedentes de la comunidad microbiana en conjunto (Deutsch et al., 2015).

La metagenómica estudia la ecología microbiana en su estado natural en el medio ambiente, independientemente de sus características no cultivables (Thomas et al., 2012). Esta disciplina facilita la comprensión del microbioma a nivel agregado y ofrece información sobre cómo interactúan estos genes para cumplir funciones colectivas (Comité sobre metagenómica del Consejo Nacional de Investigación de EE. UU., 2007). La investigación metagenómica referente a la microbiota del queso tiene como objetivo estudiar el genoma completo de toda la comunidad microbiana que se encuentra en un nicho ecológico determinado, es decir, el queso (Thomas et al., 2012).

Las etapas clave de la investigación metagenómica consisten en la extracción de ADN de la biomasa, después el ADN se somete a secuenciación y se realiza el análisis de datos bioinformáticos. La extracción del ADN es de suma importancia, ya que debe representar la heterogeneidad de los microorganismos que componen la microbiota del queso y las proporciones de abundancia relativa, los protocolos de extracción de ADN a menudo se realizan utilizando kits comerciales (Tilocca et al., 2020). La secuenciación metagenómica se basa en las denominadas plataformas de secuenciación de próxima generación (NGS), de las cuales las más utilizadas son 454 Roche Pyrosequencing, SOLiD e Illumina Sequencing by Synthesis (Deusch et al., 2015). Los protocolos de preparación de bibliotecas y reactivos de secuenciación dependen en gran medida de la tecnología y del equipo de secuenciación que se utilice (Seifert et al., 2013).

Existen dos enfoques básicos en los estudios de metagenómica, la metagenómica basada en secuencias y basada en funciones (Adebo et al., 2023). La primera, conlleva a la determinación de la secuencia de ácidos nucleicos y el orden de los nucleótidos en el ADN. Las tecnologías de huellas dactilares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los métodos electroforéticos se encuentran involucrados antes de la secuenciación del ADN. La amplificación por PCR se dirige a regiones hipervariables (V1-V9) del gen 16S, 26S y 28S ARNr de bacterias y de hongos (ITS) (Bigot et al., 2016).

La metagenómica basada en funciones por su lado comprende la secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés), también conocida como secuenciación profunda o secuenciación paralela masiva, esta implica una tecnología de secuenciación de ADN escalable, de alta velocidad, a gran escala y profunda que permite consultas de todo el genoma, los exones dentro de todos los genes conocidos o solo los exones de genes seleccionados (Alfaro et al., 2019); y por otra parte está la secuenciación *shotgun* que implica la fragmentación aleatoria de secuencias de ADN en varias piezas más pequeñas para luego volver a ensamblar los fragmentos mediante la consulta de regiones superpuestas (Agyirifo et al., 2019), una de las ventajas de este tipo de

secuenciación es que nos permite realizar la clasificación de todos los microorganismos presentes a nivel de especie o inclusive de cepa, así como la obtención de información sobre el potencial funcional de la microbiota (Yeluri Jonnala et al., 2018).

La secuenciación metagenómica ha brindado la oportunidad de determinar la identificación más precisa de la microbiota presente en los quesos, caracterizar su dinámica poblacional durante el proceso de maduración, así como su contribución al desarrollo de características organolépticas y fisicoquímicas que le otorgan tipicidad a cada variedad de queso (Kamilari et al., 2019).

2.1.9 Metabolómica

La metabolómica es un campo multidisciplinario de investigación que combina la química analítica, la bioquímica y la bioinformática para identificar todas las pequeñas moléculas endógenas sintetizadas y modificadas en células, tejidos u organismos completos. Se emplea comúnmente para detectar, identificar y cuantificar metabolitos de bajo peso molecular (<1500 Da) en sistemas biológicos en respuesta a condiciones ambientales, abióticas y bióticas (Roessner et al., 2011). La metabolómica orientada a los alimentos es una técnica que se emplea para identificar y comprender el metaboloma de los alimentos, incluida su bioquímica, biotransformación y composición, permitiendo obtener un mapa molecular detallado y completo de miles de metabolitos involucrados en procesos alimentarios como la fermentación (Wang et al., 2020).

Existen dos enfoques principales en la metabolómica, el análisis dirigido y el no dirigido (Spratlin et al., 2009). La metabolómica no dirigida se lleva a cabo para recolectar y analizar todos los metabolitos en un sistema biológico dado. Como método de descubrimiento, el análisis no dirigido puede revelar nuevos compuestos y productos químicos desconocidos, lo que conlleva a nuevos conocimientos sobre la fermentación y los alimentos fermentados (Adebo et al., 2023). Mientras que, la metabolómica dirigida se enfoca en grupos o categorías predefinidos de metabolitos, como los metabolitos asociados con una vía

metabólica específica o responsables de ciertas propiedades de los alimentos, por ejemplo, compuestos fenólicos, aminoácidos, vitaminas y azúcares, etc. (Lacalle-Bergeron et al., 2021). Por lo tanto, este enfoque implica la selección de metabolitos objetivo y su posterior análisis utilizando métodos analíticos específicos. La separación de metabolitos se lleva a cabo utilizando diversas técnicas analíticas y las más utilizadas en alimentos fermentados para estudios de metabolómica son los sistemas de separación acopladas a espectrometría de masas como cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y resonancia magnética nuclear (NRM) (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

La cromatografía líquida-espectrometría de masas se considera una poderosa herramienta analítica para la identificación y cuantificación de metabolitos (Salem et al., 2020). Sus ventajas, como la velocidad, la sensibilidad y la versatilidad, la convierten en la plataforma analítica elegida para el análisis de muestras a gran escala y en una herramienta útil para el análisis metabolómico dirigido y no dirigido (Yoshida et al., 2012). La cromatografía de gases-espectrometría de masas por su parte es una técnica analítica de alto rendimiento con resolución, reproducibilidad de separación y sensibilidad (Park et al., 2010). Esta técnica incluye ionización electrónica continua y bibliotecas estandarizadas para acumular tiempos de retención cromatográficos y espectros de masas de más de 500 000 compuestos (Fiehn, 2017). Mientras que, la resonancia magnética nuclear es un método poderoso que requiere una preparación mínima de la muestra y, en general, puede detectar todos los metabolitos que contienen hidrógeno-1 (protio), particularmente en los alimentos fermentados (Chen et al., 2016). Las ventajas que brinda son la relación precisa y cuantitativa entre la intensidad y la concentración molar de las resonancias (Sundekilde et al., 2013).

En los últimos años, la metabolómica se ha aplicado en el análisis de varias muestras de productos lácteos. Por lo tanto, el análisis integral de la metagenómica y la metabolómica proporciona una poderosa herramienta para descifrar el proceso de producción de queso en relación con la dinámica y las

funciones de las comunidades microbianas asociadas (Yang et al., 2021), como la contribución de la microbiota en la producción de diferentes metabolitos y, en particular, aquellos relacionados con el sabor (Afshari et al., 2020).

2.1.10 Características de la región de estudio

La región de la Tierra Caliente de Guerrero está ubicada en la meseta que rodea las cuencas del río Balsas y el río Tepalcatepec (López, 2021). Esta región representa el 17.8 % de la superficie total del estado, tiene una extensión territorial de 11,474.2 km² y está conformada por nueve municipios: Ajuchitán del Progreso, Arcelia, Cutzamala de Pinzón, Coyuca de Catalán, Pungarabato, San Miguel Totolapan, Tlapehuala, Tlalchapa, y Zirándaro.

La Tierra Caliente presenta un relieve de zona baja, plana y rodeada de montañas, tiene un clima cálido seco, en la época de primavera alcanza temperaturas superiores a los 40 °C y en invierno solamente desciende 10 °C (González, 2010). La región posee suelos planos arcillosos y tiene una fisiografía de tierras francas conformada de lomeríos con pendientes menores a 10 % (Palemón-Alberto et al., 2017).

En este estudio se consideró dos municipios de la región de Tierra Caliente de Guerrero, Coyuca de Catalán y Tlalchapa (ver Figura 1), lugares donde se conoce la producción del QSTCG. Esta zona de Guerrero colinda al norte con el estado de Michoacán y México, al sur con municipios Técpan de Galeana, Atoyac de Álvarez y Petatlán, al este con los municipios de General Heliodoro Castillo, Apaxtla y Teloloapan, y al oeste con Coahuayutla de José María Izazaga (Guzmán, 2009).

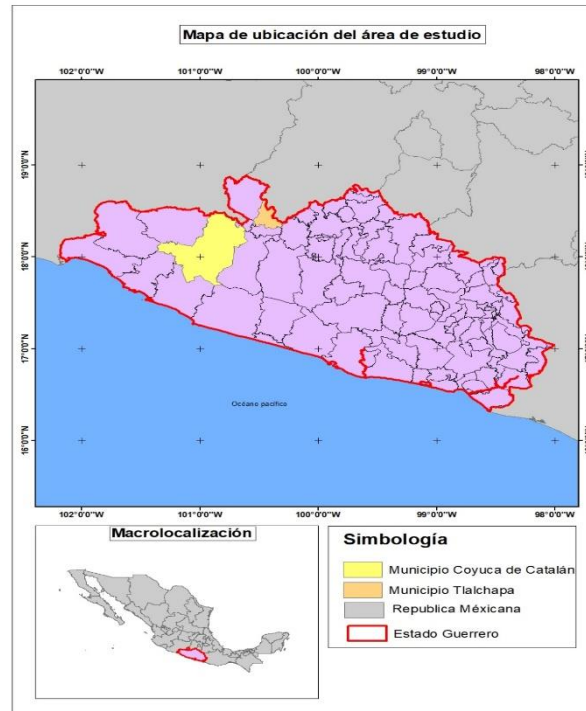


Figura 1. Región de la Tierra Caliente.
Fuente: Elaboración propia

La principal actividad económica es la agricultura de productos como el maíz, el ajonjolí, el café y la copra. Esta actividad de temporal se lleva a cabo en condiciones tecnológicas limitadas. La ganadería es la otra fuente económica que predomina, donde la región de la Tierra Caliente ocupa el tercer lugar con mayor uso de suelo en el estado de Guerrero con el 21.1 %. El principal centro económico de la Tierra Caliente de Guerrero es Ciudad Altamirano, perteneciente al municipio de Pungarabato, lugar donde se comercializan productos regionales, como: el “pan de baqueta”, el QSTCG sombreros de palma, huaraches de piel, mezcal, alimento para ganado y frutas (López-Ríos et al., 2016).

2.2 Referencias

- Adebo, O. A., Chinma, C. E., Obadina, A. O., Soares, A. G., Panda, S. K., & Gan, R. Y. (2023). *Indigenous Fermented Foods for the Tropics* (1^a ed.). Elsevier.
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020b). 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>
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020a). Microbiota and metabolite profiling combined with integrative analysis for differentiating cheeses of varying ripening ages. *Frontiers in Microbiology*, 11, 592060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592060>
- 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>
- Alfaro, M. P., Sepulveda, J. L., & Lyon, E. (2019). Molecular testing for targeted therapies and pharmacogenomics. In A. Dasgupta & J. L. Sepulveda (Eds.), *Accurate Results in the Clinical Laboratory* (pp. 349-363). Elsevier.
- Berno, T., & Fusté-Forné, F. (2019). Imaginaries of cheese: revisiting narratives of local produce in the contemporary world. *Annals of Leisure Research*, 23(5), 608-626. <https://doi.org/10.1080/11745398.2019.1603113>
- Bigot, C., Meile, J. C., Remize, F., & Strub, C. (2016). Applications of metagenomics to fermented foods. In D. Montet & R. C. Ray (Eds.), *Fermented Foods, Part I Biochemistry Biotechnol* (pp. 333-346). Taylor & Francis Group.
- Bottari, B., Levante, A., Bancalari, E., Sforza, S., Bottesini, C., Prandi, B., ... & 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>
- Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P., & Grappin, R. (2002). Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comté cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 27-38. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00006-5)
- Camacho-Vera, J. H., Cervantes-Escoto, F., Palacios-Rangel, M. I., Cesín-Vargas, A., & Ocampo-Ledesma, J. (2017). Especialización de los

sistemas productivos lecheros en México: la difusión del modelo tecnológico Holstein. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(3), 259-268.

- Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A. & Espinoza, A. (2008). *Los quesos mexicanos genuinos: patrimonio cultural que debe rescatarse*. Mundi-Prensa México, Universidad Autónoma Chapingo y Universidad Autónoma del Estado de México.
- Chen, D., Ye, Y., Chen, J., & Yan, X. (2016). Evolution of metabolomics profile of crab paste during fermentation. *Food Chemistry*, 192, 886-892. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.098>
- De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J. A., & Ercolini, D. (2016). Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Scientific Reports*, 6(1), 21871. <https://doi.org/10.1038/srep21871>
- De Filippis, F., La Stora, A., Stellato, G., Gatti, M., & Ercolini, D. (2014). A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLoS One*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089680>
- Deusch, S., Tilocca, B., Camarinha-Silva, A., & Seifert, J. (2015). News in livestock research—use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.12.005>
- Escobar-Zepeda, A., Sánchez-Flores, A., & Baruch, M. Q. (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>
- Fiehn, O. (2017). Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 114(1), 30-4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fox, P. F., & Cogan, T. M. (2004). Factors that affect the quality of cheese. In P. F. Fox., P. L. H. McSweeney., T. M. Cogan., & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Vol. 1, pp. 583-608). Academic Press.
- Fusté-Forné, F. (2020). Savouring place: cheese as a food tourism destination landmark. *Journal of Place Management and Development*, 13(2), 177-194. <https://doi.org/10.1108/JPMMD-07-2019-0065>
- Galle, S. A., Koot, A., Soukoulis, C., Cappellin, L., Biasioli, F., Alewijn, M., & van Ruth, S. M. (2011). Typicality and geographical origin markers of protected origin cheese from the Netherlands revealed by PTR-MS. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2554-2563.
<https://doi.org/10.1021/jf104170r>
- Gatti, M., De Dea Lindner, J., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M., Bernini, V., & Neviani, E. (2008). Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 6161-6167.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00871-08>
- González-Ariceaga, C. C., Afzal, M. I., Umer, M., Abbas, S., Ahmad, H., Sajjad, M., ... & Cailliez-Grimal, C. (2019). Physicochemical, sensorial and microbiological characterization of PoroCheese, an artisanal Mexican cheese made from raw milk. *Foods*, 8(10), 509.
<https://doi.org/10.3390/foods8100509>
- González, R. E. (2010). La valona de la Tierra Caliente. En *En el lugar de la música (1964-2009)* (pp. 90-99). CONACULTA: INAH.
- Grappin, R., Beuvier, É., Bouton, Y., & Pochet, S. (1999). Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-typecheeses. *Le Lait*, 79(1), 3-22.
<https://doi.org/10.1051/lait:199911>
- Hernández-Moreno, M. D. C., & Medina, A. V. (2014). La calidad en el sistema agroalimentario globalizado. *Revista Mexicana de Sociología*, 76(4), 557-582.
- Ianni, A., Di Domenico, M., Bennato, F., Peserico, A., Martino, C., Rinaldi, A., ... & Martino, G. (2020). Metagenomic and volatile profiles of ripened cheese obtained from dairy ewes fed a dietary hemp seed supplementation. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 5882-5892.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17954>
- Jiang, N., Wu, R., Wu, C., Wang, R., Wu, J., & Shi, H. (2022). Multi-omics approaches to elucidate the role of interactions between microbial communities in cheese flavor and quality. *Food Reviews International*, 39(8), 5446-5458. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2070199>
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7), 451-459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- Jung, J. Y., Lee, S. H., Kim, J. M., Park, M. S., Bae, J. W., Hahn, Y., & Jeon, C. O. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2264-2274. <https://doi.org/10.1128/AEM.02157-10>
- Kamilari, E., Tomazou, M., Antoniadis, A., & Tsaltas, D. (2019). High throughput sequencing technologies as a new toolbox for deep analysis, characterization and potentially authentication of protection designation of origin cheeses?. *International Journal of Food Science*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/5837301>

- Kothe, C. I., Mohellibi, N., & Renault, P. (2022). Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Research International*, 157, 111265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111265>
- Laca, A., Gómez, N., Laca, A., & Díaz, M. (2020). Overview on GHG emissions of raw milk production and a comparison of milk and cheese carbon footprints of two different systems from northern Spain. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 1650-1666. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06857-6>
- Lacalle-Bergeron, L., Izquierdo-Sandoval, D., Sancho, J. V., López, F. J., Hernández, F., & Portolés, T. (2021). Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food (bio) markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116161. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116161>
- Law, B. (2010). Cheese adjunct cultures. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65(2), 45.
- Licitra, G. (2010). World wide traditional cheeses: Banned for business?. *Dairy Science & Technology*, 90(4), 357-374. <https://doi.org/10.1051/dst/2010016>
- Linck, T., Barragán López, E., & Casabianca, F. (2006). De la propiedad intelectual a la calificación de los territorios: lo que cuentan los quesos tradicionales. *Agroalimentaria*, 11(22), 99-109.
- López-Ríos, A., Quintero-Romero, D. M., & Morales-Hernández, R. (2016). *Teorías y enfoques del desarrollo, la política social y la migración*. Plaza y Valdes.
- López, G. (2021). *Caracterización del queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo]. Repositorio Académico de la Universidad Autónoma Chapingo. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/791c77ce-640f-4353-95c4fbc4138b5611>
- Marino, M., Innocente, N., Maifreni, M., Mounier, J., Cobo-Díaz, J. F., Coton, E., & Cardazzo, B. (2017). Diversity within Italian cheesemaking brine-associated bacterial communities evidenced by massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02119>
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2021). Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety. *Foods*, 10(3), 602. <https://doi.org/10.3390/foods10030602>
- Metz, M., Sheehan, J., & Feng, P. C. (2020). Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses—A literature review. *Food Microbiology*, 85, 103283. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103283>

- Millán, V. M.G., Amador, L. y Arjona, F. J.M. (2016). La denominación de origen protegida “Los Pedroches” como ruta gastronómica del jamón ibérico: análisis del perfil del visitante y evolución futura. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 13(77), 63-91.
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Murugesan, S., Reyes, M. P., Nirmalkar, K., Chavez, A., Juárez, J. I., Torres-Gómez, R. E., & García, J. (2018). Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput ADN sequencing. *Food Research International*, 113, 371-381.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.023>
- National Research Council (US) Committee on Metagenomics. (2007). National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet. Washington, DC: National Academies Press.
- Nieto, L. I., Donolo, A. S., Bava, A. J., & Yantorno, O. M. (2004). Empleo de espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 38(3), 289-295.
- Palemón-Alberto, F., Reyes-García, G., Vargas-Álvarez, D., Damián-Nava, A., Hernández-Castro, E., Juárez-López, P., & Cruz-Lagunas, B. (2017). Rendimiento de maíces cultivados en la región Tierra Caliente, Guerrero, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 3(1), 1-7.
- Park, M. K., Cho, I. H., Lee, S., Choi, H. K., Kwon, D. Y., & Kim, Y. S. (2010). Metabolite profiling of Cheonggukjang, a fermented soybean paste, during fermentation by gas chromatography-mass spectrometry and principal component analysis. *Food Chemistry*, 122(4), 1313-1319.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.095>
- Penland, M., Falentin, H., Parayre, S., Pawtowski, A., Maillard, M. B., Thierry, A., & Deutsch, S. M. (2021). Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109130.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109130>
- Pérez, G. (2017). *Caracterización del queso panela oreado de Soyatlán, Jalisco*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo]. Repositorio Académico de la Universidad Autónoma Chapingo.
<https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/82de95bd-225b-450b803f064bc325ee96>

- Pomeón T., & Cervantes E. F. (2010). El sector lechero y quesero en México de 1990 a 2009: entre lo global y local. Universidad Autónoma Chapingo. *Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial*.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012). High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5717-5723. <https://doi.org/10.1128/AEM.00918-12>
- Roessner, U., Nahid, A., Chapman, B., Hunter, A., & Bellgard, M. (2011). *Metabolomics—the combination of analytical biochemistry, biology, and informatics*. Elsevier.
- Rossi, F., Gatto, V., Sabattini, G., & Torriani, S. (2012). An assessment of factors characterising the microbiology of Grana Trentino cheese, a Grana-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65(3), 401-409. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00844.x>
- Salem, M. A., Perez de Souza, L., Serag, A., Fernie, A. R., Farag, M. A., Ezzat, S. M., & Alseekh, S. (2020). Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. *Metabolites*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.3390/metabo10010037>
- Scholz, M., Ward, D. V., Pasolli, E., Tolio, T., Zolfo, M., Asnicar, F., ... & Segata, N. (2016). Strain-level microbial epidemiology and population genomics from shotgun metagenomics. *Nature Methods*, 13(5), 435-438. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3802>
- Seifert, J., Herbst, F. A., Halkjær Nielsen, P., Planes, F. J., Jehmlich, N., Ferrer, M., & Von Bergen, M. (2013). Bioinformatic progress and applications in metaproteogenomics for bridging the gap between genomic sequences and metabolic functions in microbial communities. *Proteomics*, 13(18-19), 2786-2804. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200566>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019a). *Boletín de Leche. Enero-Marzo 2019*. <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Bolet%C3%ADn%20de%20Leche%20enero-marzo%202019.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019b). *Boletín de Panorama de la lechería en México*. <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20Cuarto%20Trimestre%202019.pdf>
- Sólis, M. A. D., Estrada, F. J. G., & Castelán, O. O. A. (2009). Propuesta metodológica caracterización de quesos artesanales. En H. L. García & P. L. Brunett (Eds.), *Producción sustentable: calidad y leche orgánica* (pp. 245-270). Universidad Autónoma Metropolitana.

- Spratlin, J. L., Serkova, N. J., & Eckhardt, S. G. (2009). Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clinical Cancer Research*, 15(2), 431-440. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1059>
- Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7893-7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Sudagidan, M., Yurt, M. N. Z., Tasbasi, B. B., Acar, E. E., Omeroglu, E. E., Ucak, S., ... & Aydin, A. (2021). 16S Bacterial Metagenomic Analysis of Herby Cheese (Otlü Peynir) Microbiota. *Acta Veterinaria Eurasia*, 47(3), 188-197. <https://doi.org/10.5152/actavet.2021.21037>
- Sundekilde, U. K., Larsen, L. B., & Bertram, H. C. (2013). NMR-based milk metabolomics. *Metabolites*, 3(2), 204-222. <https://doi.org/10.3390/metabo3020204>
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics: A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2, 1-12. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tilocca B., Costanzo N., Morittu V. M., Spina A. A., Soggiu A., Britti D., Roncada P., & Piras C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>
- Villegas, A., & Cervantes, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales (Hermosillo, Son.)*, 19(38), 145-164.
- Villegas, A., Cervantes, F., Cesín, A., Espinoza, A., Hernández, A., Santos, A., & Martínez, Á. R. (2014). *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. Colegio de Postgraduados.
- Villegas, A., Santos, A., & Cervantes, F. (2016). *Los quesos mexicanos tradicionales*. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM.
- Wang, N., Chen, S., & Zhou, Z. (2020). Age-dependent characterization of volatile organic compounds and age discrimination in Chinese rice wine using an untargeted GC/MS-based metabolomic approach. *Food Chemistry*, 325, 126900. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126900>
- Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., & Dutton, R. J. (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, 158(2), 422-433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>
- Yang, C., You, L., Kwok, L. Y., Jin, H., Peng, J., Zhao, Z., & Sun, Z. (2021). Strain-level multiomics analysis reveals significant variation in cheeses from

different regions. *LWT*, 151, 112043.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112043>

- Yang, C., Zhao, F., Hou, Q., Wang, J., Li, M., & Sun, Z. (2020). PacBio sequencing reveals bacterial community diversity in cheeses collected from different regions. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1238-1249. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17496>
- Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>
- Yoshida, M., Hatano, N., Nishiumi, S., Irino, Y., Izumi, Y., Takenawa, T., & Azuma, T. (2012). Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Gastroenterology*, 47, 9-20. <https://doi.org/10.1007/s.00535-011-0493-8>

3. CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DEL QUESO SECO DE LA TIERRA CALIENTE DE GUERRERO

3.1 Introducción

Un queso artesanal de acuerdo con la American Cheese Society es aquél que se produce en pequeña escala, utilizando las habilidades, destrezas y el conocimiento práctico de los queseros, por lo tanto, se elaboran a mano empleando la menor mecanización posible y con técnicas tradicionales (Paxson, 2011). Villegas & Cervantes (2011) definen los quesos mexicanos artesanales como genuinos, legítimos, naturales y auténticos, los cuales expresan la historia, la cultura y el saber hacer que se transmite de generación en generación.

Los quesos artesanales se distinguen, en la mayoría de los casos, por el empleo de leche cruda para su producción (Montel et al., 2014); aunque, también se elaboran a partir de leche pasteurizada. Los ingredientes principales de los quesos artesanales son leche fluida, cuajo y sal (Villegas & Cervantes, 2011). En México se tenían descritos más de 40 variedades de quesos catalogados como genuinos (Villegas et al., 2016).

La producción de quesos tradicionales es de gran importancia, ya que constituyen un ejemplo de transmisión de identidad y representación social del territorio al que se encuentran vinculados. En cada pedazo de queso se encuentra y transmite su procedencia, contexto físico-ambiental, cultural, formas de elaboración y degustación, los cuales otorgan esa tipicidad, que los hace originales y distinguidos (Berno & Fusté-Forné, 2019). El queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero (QSTCG), es un queso madurado elaborado de manera artesanal en la región de la Tierra Caliente del estado de Guerrero. Se produce a partir de leche cruda de vaca, cuajo animal y sal. El QSTCG es característico

por sus atributos sensoriales de sabor salado, textura desmoronable y porosidad, además de ser un queso tradicional mexicano catalogado como genuino (López, 2021).

La caracterización de los quesos permite catalogar y determinar la diversidad de este alimento, esta actividad consiste en abordar las características tecnológicas, químicas, sensoriales y microbiológicas (Almena-Aliste & Miettton, 2014). En particular, la microbiología del queso juega un papel importante, debido a que interviene en su calidad y tipicidad (Gobbetti et al., 2018). El queso aloja diversas comunidades microbianas, es decir, posee una microbiota que es diferente según la variedad de cada queso (Afshari et al., 2020a). La microbiota del queso se encuentra constituida por un consorcio de poblaciones procariotas, eucariotas y virales (Mayo et al., 2021). Los microorganismos que comprenden esta microbiota provienen de distintas fuentes como lo es la leche cruda o pasteurizada, el cuajo, los cultivos iniciadores, las hierbas y especias (Sudagidan et al., 2021), el equipo, utensilios empleados y el entorno de producción (Yang et al., 2021).

La microbiota influye en las características químicas y sensoriales de los quesos (Yeluri Jonnala et al., 2018). La composición, el crecimiento y la interacción de los microorganismos durante todo el proceso de elaboración y maduración (Bottari et al., 2020) permiten el desarrollo particular del sabor y la textura en cada variedad de queso (Tilocca et al., 2020). Comprender la microbiota asociada al queso es de vital importancia para controlar y optimizar la apariencia, el sabor, la calidad y seguridad del producto final (Walsh et al., 2020). Los métodos dependientes de cultivo se han empleado para comprender y caracterizar la diversidad microbiana de los quesos (Ianni et al., 2020). Sin embargo, estas técnicas tienen limitaciones debido a que no proporcionan una visión completa de la microbiota existente porque no detectan varias especies que son difíciles de cultivar y requieren de medios de cultivo selectivos (Kothe et al., 2022).

El advenimiento de las técnicas independientes de cultivo basadas en la metagenómica cambió el enfoque empleado para analizar la microbiota (Biolcati

et al., 2020). Las nuevas técnicas están asociadas a métodos moleculares fundamentados en el ADN y/o ARN, la secuenciación de alto rendimiento (HTS) (Yeluri Jonnala et al., 2018) y el desarrollo de las herramientas bioinformáticas (Afshari et al., 2020a). La HTS es un poderoso método que tiene la capacidad de brindar una identificación más detallada de la composición y diversidad de la microbiota (El Sheikha & Hu, 2020), también permite caracterizar la dinámica poblacional que impacta en el proceso de maduración y determinar las especies microbianas implicadas en la formación de características sensoriales y fisicoquímicas que otorgan tipicidad a cada tipo de queso (Kamilari et al., 2019). La secuenciación metagenómica *shotgun* es una herramienta que posibilita la caracterización completa de la microbiota, la clasificación taxonómica a nivel de especie y cepa, así como información funcional (De Filippis et al., 2016).

Las metodologías de secuenciación metagenómica permiten caracterizar la comunidad microbiana de los quesos, sin embargo, no ofrecen conocimientos referentes a la función metabólica de la microbiota, que impacta en la calidad y formación de las características sensoriales del alimento (Yang et al., 2021). La metabolómica es una de las ciencias ómicas que se encarga de estudiar los metabolitos de un sistema u organismo (Castro-Puyana et al., 2017), las investigaciones en quesos se han enfocado en determinar los metabolitos producidos por la microbiota, permitiendo comprender la relación de la microbiota con la producción de los metabolitos específicos del queso (Afshari et al., 2020a). De manera que la combinación de las herramientas ómicas como la metagenómica y metabolómica permiten ampliar el conocimiento de la composición, dinámica y función de la microbiota asociada al queso (Yang et al., 2021).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue caracterizar la microbiota asociada con el queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero, por medio de la secuenciación metagenómica *shotgun* y análisis metabolómico, para determinar como la microbiota presente impacta en las características que le otorgan su tipicidad a esta variedad de queso.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Muestras evaluadas

Se obtuvieron seis piezas de queso Seco de la temporada de secas (abril, 2022), de dos productores diferentes (A y B) ubicados en el municipio de Tlalchapa y Coyuca de Catalán (localidad Paso de Arena), Guerrero, respectivamente. De las mismas queserías se muestrearon seis piezas de queso de la temporada de lluvias (septiembre, 2022). En ambos muestreos, los quesos se recolectaron a los 30 días de maduración, se transportaron directamente al laboratorio a 4 °C y fueron almacenados a -24 °C hasta su posterior análisis.

3.2.2 Análisis químico proximal

Determinación de humedad

En crisoles a peso constante se pesó de 3 a 4 g de muestra de queso, previamente molido. Después se colocaron en una estufa SHEL LAB® (Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, OR., USA) para secar el material a 105 °C, durante un tiempo de 5 h (AOAC 926.08, 2002).

Transcurrido el tiempo de secado los crisoles se colocaron en un desecador para su enfriamiento y finalmente se pesaron en una balanza analítica para calcular el contenido de humedad empleando la ecuación 1.

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{(P-P_0)}{M} \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Ec. 1})$$

P: Peso de la caja con muestra húmeda.

P₀: Peso de la caja con muestra seca.

M: Peso de la muestra.

Determinación de cenizas

En crisoles a peso constante se pesó de 3 a 5 g de muestra de queso, previamente molido. Después las muestras se incineraron usando un mechero bunsen hasta que dejaran de desprender humo. Posteriormente los crisoles con la muestra incinerada se colocaron en una mufla THERMOLYNE™ (Thermo Scientific Inc.,

Waltham, MA., EE. UU.) a 550 °C, para llevar a cabo la calcinación durante 4 h (AOAC 935.42, 2002).

Finalizada la calcinación se dejó enfriar las muestras y después se transfirió a un desecador para su enfriamiento. Finalmente, los crisoles con la muestra se pesaron para calcular el contenido de cenizas mediante la ecuación 2.

$$\text{Porcentaje cenizas} = \frac{(P - P_v)}{M} \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Ec. 2})$$

P: Peso del crisol con las cenizas.

P_v: Peso del crisol sin muestra.

M: Peso de la muestra.

Determinación de pH

La determinación del pH se llevó a cabo con un potenciómetro CORNING (Corning Incorporation, NY, USA), previamente calibrado con buffers de pH 4 y 7 (J.T.Baker). Se analizaron 10 g de queso, la muestra se diluyó en 10 mL agua destilada y después se tomó la lectura del potenciómetro (Piras et al., 2013).

Determinación de sodio

Se pesaron de 2-3 g de queso molido, la muestra se colocó en un matraz Erlenmeyer y después se añadió 35 mL de agua a temperatura de 55 °C. Enseguida se mezcló perfectamente y se añadió 15 mL de agua más para una mejor dispersión de la muestra. Posteriormente se añadió 1 mL de cromato de potasio y se realizó la valoración con una solución estandarizada de nitrato de plata hasta virar, para el cálculo se empleó la ecuación 3 (Ávila-Hernández et al., 2018).

$$\text{Porcentaje de NaCl} = \text{mL AgNO}_3 \times N \text{ AgNO}_3 \times 0.05844 \times \frac{100}{\text{g de muestra}} \quad [\%] \quad (\text{Ec. 3})$$

N: Normalidad de la solución valorada de AgNO₃

Determinación de proteína

La determinación de proteína se realizó mediante el método Kjeldahl, bajo las especificaciones de la AOAC 978.04-968.01 (2006), se pesó 0.2 g de queso Seco

molido y se depositó en un tubo de digestión Kjeldahl, al tubo se le añadió 9 mL de H₂SO₄, 5 perlas de vidrio y una pastilla digestora. Después, se realizó la digestión aumentando la temperatura gradualmente a 440 °C y se mantuvo durante 60-90 min hasta obtener un líquido transparente con una coloración azul verdosa. La destilación se llevó a cabo añadiendo 50 mL de H₃BO₃ al 4 % y 2 gotas de indicador de proteína en un matraz Erlenmeyer que se colocó bajo el tubo de salida del refrigerante correspondiente al equipo destilador, luego en el tubo de digestión se añadió 200 mL de H₂O destilada y 90 mL de NaOH al 40 %, la destilación finalizó hasta obtener un volumen de 250 mL en el Erlenmeyer. Finalmente, se realizó la titulación con una solución de HCl al 0.0923 N y el cálculo del contenido de proteína se efectuó con la ecuación 4 – 5.

$$\text{Porcentaje de nitrógeno} = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times \text{meq } N_2 \times 100}{P} \quad [\%] \quad (\text{Ec. 4})$$

V₀: Volumen gastado de H₂SO₄ con el blanco.

V₁: Volumen gastado de H₂SO₄ con la muestra.

N: Normalidad de la solución valorada de HCL

meq N₂: Miliequivalente del N₂ (0.014).

P: Peso de la muestra.

$$\text{Porcentaje de proteína} = \% N \times F \quad [\%] \quad (\text{Ec. 5})$$

F: Factor proteico (6.38 utilizado para lácteos).

% N: Porcentaje de nitrógeno.

Determinación de grasa

El contenido de grasa fue se determinó por la técnica de extracción de Soxhlet, método oficial de la AOAC 920.35 (2002), que consistió en pesar 3-4 g de queso Seco molido, después la muestra se introdujo en cartuchos de extracción de celulosa previamente pesados y mantenidos a peso constante. Los cartuchos se colocaron dentro del extractor Soxhlet, en los matraces se añadió 80 mL del solvente de éter petróleo y se dejó efectuar la extracción a 100-110 °C durante 4-6 h. Una vez terminada la extracción se retiraron los cartuchos del extractor y se eliminó el solvente por evaporación dejando secar en la estufa a 100 °C

durante 2 h. Finalmente, los cartuchos se dejaron enfriar en un desecador y se calculó el porcentaje de grasa con la ecuación 6.

$$\text{Porcentaje de grasa} = \frac{(P_1 - P_2)}{M} \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Ec. 6})$$

P₁: Peso del dedal más muestra con grasa.

P₂: Peso del dedal más muestra sin grasa.

M: Peso de la muestra.

3.2.3 Análisis metagenómico

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de minipreparación de ADN ZymoBIOMICS™; No.cat D4300 (Zymo Research, Irvine, CA., EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se molieron 5 g de cada muestra de queso en un mortero y se utilizaron 0.4 g para la extracción. La muestra se transfirió al tubo de lisis ZR BashingBead™ y se incubó con 750 µL de solución de lisis ZymoBIOMICS™ y 100 µL de proteinasa K durante 1 h a 55 °C. Después de la lisis, la suspensión se centrifugó (12,000 rpm, 5 min) y el ADN se extrajo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, EUA).

Secuenciación metagenómica *shotgun*

Las bibliotecas *shotgun* de metagenoma completo se prepararon de acuerdo con la guía de preparación de bibliotecas de Illumina - ADN (whole genome) (Illumina, Inc., San Diego, CA., EE. UU.). Las bibliotecas se secuenciaron en Illumina NovaSeq - S4 - PE 150 (Illumina, Inc., San Diego, CA., EE. UU.) utilizando el kit IDT XGen™ (Integrated ADN Technologies, Inc., Coralville, Iowa., EE. UU.). La secuenciación se realizó con una configuración de 150 ciclos de extremo emparejado en las instalaciones de Oklahoma Medical Research Foundation

Genomics Core (OMRF, Oklahoma City, USA) de acuerdo con los protocolos de secuenciación estándar de Illumina.

3.2.4 Análisis metabolómico

Preparación de extractos acuosos

Los extractos acuosos se obtuvieron bajo la metodología señalada por Torres-Llanez et al. (2011) con ligeras modificaciones. Se tomaron 40 g de queso y se homogenizaron con 80 mL de agua destilada empleando agitación mecánica durante 15 min. El homogenizado resultante se mantuvo a 4 °C durante 1 h, después se filtró en papel filtro Whatman™ grado 1 de 125 mm (Whatman International Ltd, Maidstone, England), el material insoluble fue separado por centrifugación a 4700 g por 30 min en una centrifuga Frontier™ FC5718R (OHAUS Corporation, Nanikon, Switzerland) manteniendo una temperatura de °C, y el sobrenadante se filtró con un filtro de jeringa Corning® diam. 28 mm, tamaño de poro 0.2 µm (Corning Incorporated, Oneonta, N.Y., USA) para quitar impurezas. Los extractos obtenidos se diluyeron en una proporción 1:10 y fueron almacenados a -24 °C para su posterior análisis.

Espectrometría de masas

El análisis metabolómico se realizó bajo la metodología determinada por Benítez-Guerrero et al. (2022) con ligeras modificaciones. El espectrofotómetro de masas de resonancia de ciclotrón iónico por transformada de Fourier (FT-ICR MS) Solarix XR (Bruker, Bremen, Alemania), se calibró en modo Electrospray (ESI) positivo y negativo con solución de trifluoroacetato sódico. Las muestras se inyectaron en el instrumento con una jeringa Hamilton de 250 µL a un caudal de 120 µL/h mediante ESI positivo y negativo (capilar: 3500 V, 2499.3 nA; desplazamiento de la placa final: -500 V, 30.931 nA). Las condiciones de adquisición fueron las siguientes: 42.99 Low m/z, 3000 High m/z, 24 escaneos promedio, 0.1 Accum (s) y 8M de resolución. La sintonización del gas fuente fue N₂, a 0.6 bar de nebulización, 4.0 L/min de gas seco, y 200 °C de temperatura seca. Se utilizó el programa DataAnalysis v.6.0. para los datos generados. El

nombre y la estructura de los metabolitos se asignaron utilizando el software Bruker Compass MetaboScape 2022 b v.9.0.1, provisto con una base de datos de leche de vaca que se obtuvo de The Human Metabolome Database v.5.0. Para el análisis estadístico, se utilizó el programa MetaboAnalyst v.5.0 y RStudio v.4.2.3 para la generación de los heatmaps.

3.2.5 Análisis bioinformático

La calidad de las lecturas de secuencias de ADN obtenidas se evaluó mediante FastQC (v0.12.1), las secuencias fueron filtradas y limpiadas de acuerdo con JGIRQCFilter (v38.22), para la clasificación taxonómica se empleó KAIJU (v1.9.0) y para el análisis estadístico se utilizó SigmaPlot (v13.0).

3.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del análisis químico proximal se analizaron con un diseño completamente al azar (DCA), y se aplicó la comparación de medias de Tukey con un grado de confiabilidad del 95 %. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico Minitab 17 y SAS v.9.4.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Análisis químico proximal

La composición químico proximal del QSTCG en dos temporadas de producción (lluvias y secas) se muestra en el Cuadro 1; considerando estos resultados, se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados ($p \leq 0.05$), excepto por el contenido de grasa, que fue igual en las temporadas evaluadas.

El contenido de humedad presentó un valor inferior en la temporada de secas comparado con la temporada de lluvias, lo cual es una característica favorable, ya que el contenido de humedad es un factor que influye en la proliferación de microorganismos. El porcentaje de humedad presenta similitud con lo reportado por Salas & Montes (2021) quienes informaron para el queso de Zacazonapan un porcentaje entre el 33.19 % y 40.51 %, mientras que Hernández et al. (2010) determinaron un valor del 31.8 % al 41.9 % en el queso Añejo mexicano. Cabe

mentar que de acuerdo con la NMX-F-713-COFOCALEC-2014, el QSTCG se clasifica como extraduro, debido a que presenta valores < 51 % de humedad.

La variable de cenizas presentó un mayor porcentaje en relación con lo reportado en otros estudios como el caso del queso de Tepeque de la Tierra Caliente de Michoacán, donde en la temporada de secas se registró un valor de 5.5 %, y en la temporada de lluvias, 6.6 % (Solís et al., 2013). Asimismo, en el queso Añejo estilo Manchego Mexicano se obtuvo un porcentaje de 4.76 % a los 30 días de maduración (Mezo-Solís et al., 2020).

En lo que respecta al contenido de grasa, no se presentó diferencia estadística significativa en las temporadas evaluadas ($p \leq 0.05$), lo cual se podría adjudicar a la alimentación del hato: durante la época de secas en algunos ranchos se tiene la disponibilidad de forraje (López, 2021). El QSTCG presentó mayor contenido de grasa en comparación con los datos obtenidos por Flores-Magallón et al. (2011), quienes evaluaron el queso Cotija artesanal, y registraron un 34 % de grasa; por otro lado, Hernández et al. (2010) registraron porcentajes que oscilan entre el 23.59 % y 30.44 % en el queso Añejo mexicano. Debido al contenido de grasa que se determinó en el QSTCG, se puede catalogar como un queso semigraso al encontrarse en un rango del 25 al 45 % de acuerdo con la NMX-F-713-COFOCALEC-2014.

Los valores de proteína obtenidos en el QSTCG presentan similitud con los reportados por Salas & Montes (2021) en su investigación del queso de Zacazonapan, ya que determinaron valores entre el 26.42 % y 29.98 % de proteína; así como Ramírez et al. (2016), quienes informaron un contenido de proteína del 26.10 % y 26.61 % en el queso Poro de Balancán. Cabe señalar que el mayor contenido de proteína que se observó en la época de secas puede deberse a la estacionalidad, puesto que Peláez et al. (2003) mencionan que este factor afecta el contenido de proteína y grasa, siendo en la época de secas cuando hay un mayor contenido de proteína, mientras que la humedad tiende a ser menor. Aunado a ello, la alimentación del ganado asignada a la época del año representa otro factor por el cual se suscitan variaciones, ya que influye en

la composición de la leche, y por ende en la composición final del queso (Verdier-Metz et al., 2001).

Referente al contenido de sodio, éste se encuentra en niveles superiores a los que se informan en otras investigaciones como en el queso Añejo estilo Manchego Mexicano, que presentó un 1.45 % (Mezo-Solís et al., 2020), el queso Poro de Balancán, que mostró un valor de 3.51 % al 3.62 % (Ramírez et al., 2016); así como en el queso de Tepeque de la Tierra Caliente de Michoacán, donde se evaluaron muestras de la temporada de secas y lluvias, y se logró determinar un 3.7 % y 4 % de sodio, respectivamente (Solís et al., 2013). El contenido de sodio presenta múltiples funciones en el queso; de acuerdo con Rogers et al. (2009), brinda sabor, y contribuye en la sinéresis de la cuajada que a su vez repercute en la disminución de humedad. También, interviene en el control y desarrollo de microorganismos propiciando de esta manera la inhibición microbiana (Ramírez-Navas et al., 2017).

El QSTCG reportó valores de pH que son similares al queso Cotija, que se informó con un valor de 5.0 (Flores-Magallón et al., 2011) y al queso Añejo mexicano, que se encontró entre los valores de 5.1 a 5.4 (Hernández et al., 2010). El pH es un factor importante en la producción de quesos, ya que en conjunto con la actividad de agua (a_w) y el contenido de sodio, brindan condiciones que disminuyen el desarrollo de patógenos, por lo que aportan cierta inhibición de microorganismos no deseables (Trmčić et al., 2017).

Cuadro 1. Análisis químico proximal del QSTCG.

Temporada	Humedad (%)	Ceniza (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	NaCl (%)	pH
Secas	27.212±0.355 ^a	8.784±0.059 ^a	36.398±0.424 ^a	29.652±0.666 ^a	8.188±0.009 ^a	5.290±0.005 ^a
Lluvias	34.273±0.355 ^b	7.294±0.59 ^b	37.093±0.424 ^a	26.385±0.666 ^b	5.979±0.009 ^b	5.400±0.005 ^b

Medias en columnas con letras diferentes (a y b) exhiben diferencias estadísticamente significativas, entre temporadas (Tukey, $p \leq 0.05$).
Fuente: Elaboración propia.

3.3.2 Perfil metagenómico del QSTCG

En este estudio la composición de la microbiota presente en dos temporadas de producción (secas y lluvias) y de dos productores (A: Tlalchapa, B: Paso de Arena) del QSTCG se determinó mediante el análisis de secuenciación metagenómica *shotgun*.

Se evaluaron los índices Shannon y Simpson, con la finalidad de determinar la diversidad microbiana en las muestras. El índice de Shannon varía de 1 – 5, valores menores de 2 se consideran como diversidad baja; entre 2 – 3.5, media; y cuando es superior a 3.5, se considera como diversidad alta (Margalef, 1972). A nivel de género, se observó en la Figura 2 que casi todas las muestras registraron valores de diversidad Shannon de entre 2.07 – 2.95, por lo que se asume que la microbiota de todas las muestras posee una diversidad media, a excepción de dos muestras, que presentaron diversidad baja: la muestra pr1 con un índice de 1.91 y la muestra tr1 con un índice de 1.73. También se pudo apreciar que en la temporada de secas los valores oscilaron entre 2.36 – 2.95, mientras que en la temporada de lluvias se reportaron valores de 1.72 – 2.58. Y en lo que respecta a los productores, en el productor A se observaron índices entre 1.72 – 2.95, y en el productor B se presentaron valores del 1.91 – 2.92.

El segundo índice de diversidad evaluado fue el de Simpson. Los valores de este índice son de 0 a 1, y mientras más se acerca al valor de 1, se tiene mayor posibilidad de dominancia, y cuando sea más cercano a cero, habrá mayor diversidad en la muestra (Soler et al., 2012). Los índices de diversidad de Simpson para muestras fueron de 0.73 – 0.91, lo cual indicó que hay dominio de varios géneros; por otro lado, de acuerdo con este índice, la diversidad fue baja, por lo que se infiere que la comunidad microbiana está representada por un grupo de géneros seleccionados. De acuerdo con las temporadas de producción, se observó que en la temporada de secas los índices estuvieron entre 0.76 – 0.91, y en la temporada de lluvias los valores reportados fueron de 0.72 – 0.87. En el caso de los productores, el productor A presentó índices entre 0.73 – 0.91 y el productor B los valores oscilaron entre 0.72 – 0.89 (ver Figura 2).

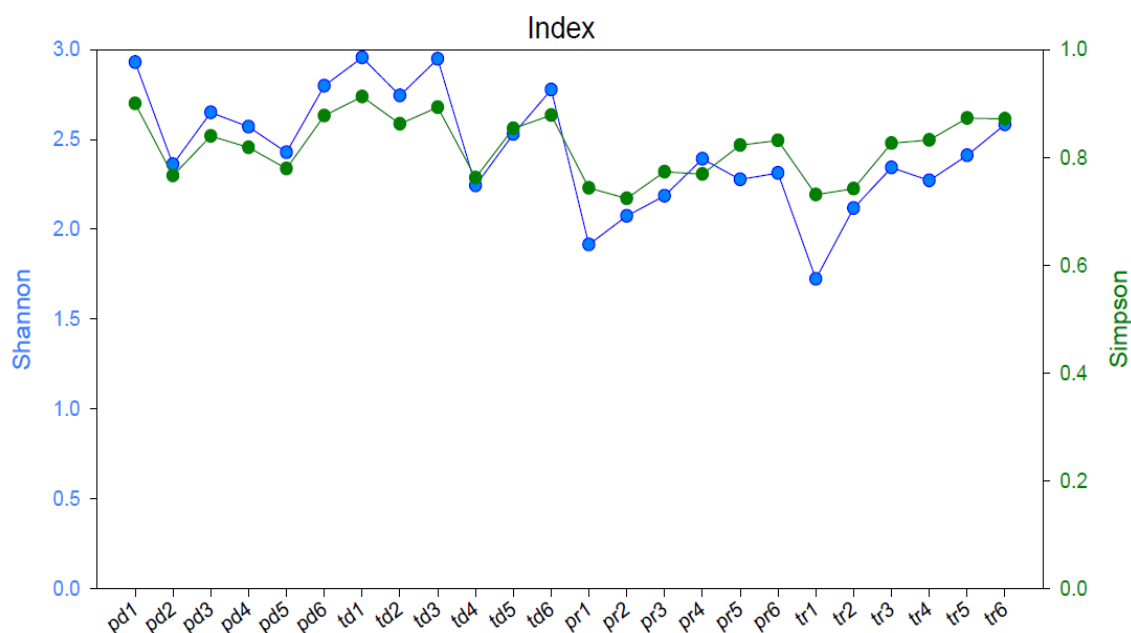


Figura 2. Índices de diversidad Shannon y Simpson.

El análisis en porcentaje de abundancia y número de géneros que se identificaron en las muestras evaluadas (ver Figura 3) reflejaron que en la temporada de secas la abundancia osciló del 62.74 % al 71.86 %, y el total de géneros en las muestras estuvo en un intervalo de 65 a 85 géneros, siendo la muestra pd3 (71.86 %) la que presentó el mayor porcentaje de abundancia, y en cuanto a género, la muestra con mayor presencia fue td1, con 85 géneros. Mientras que, en la época de lluvias, la abundancia se encontró entre el 60.74 % y 78.86 %, y los géneros estuvieron en un rango de 71 a 125 géneros. Cabe destacar que la muestra que tuvo mayor porcentaje fue la tr3 (78.86 %), y las que reflejaron más cantidad de géneros fueron las muestras pr3 y tr6, con 125 géneros. En cambio, al contrastar a los productores, se observó que el productor A presentó una abundancia del 66.24 % al 78.86 %, y los géneros se reflejaron en una proporción de 70 a 125 géneros; cabe resaltar que la muestra tr3 (78.86 %) fue la que mostró mayor porcentaje de abundancia, y la muestra tr6, con 125 géneros, la que tuvo más número de géneros. Por el contrario, el productor B mostró una abundancia entre el 60.74 % al 73.08 % y un intervalo de 70 a 125 géneros, siendo la muestra pr6

(73.08 %) la que reflejó el mayor porcentaje, y referente al género, la muestra pr3, con 125 géneros, presentó más abundancia.

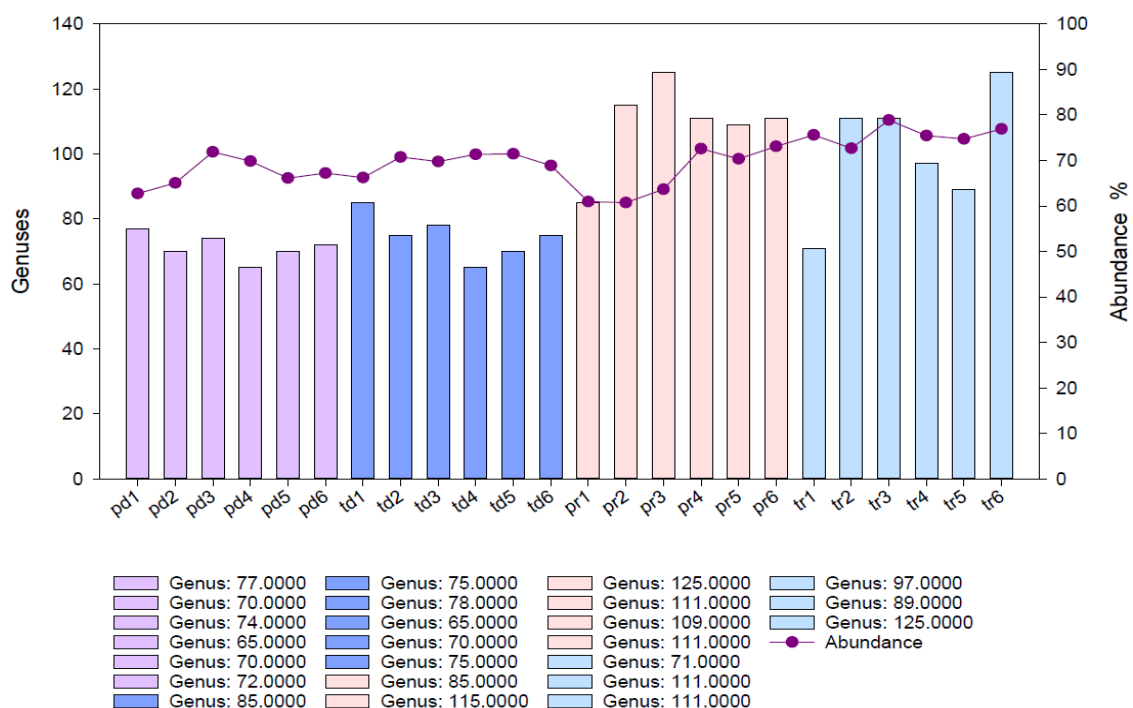


Figura 3. Abundancia y total de géneros identificados en el QSTCG.

En general, se identificó en la mayoría de las muestras el dominio de los géneros *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Salinicola*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Anaplasma*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*. Sin embargo, se pudieron apreciar diferencias considerables entre las temporadas evaluadas, mientras que entre los productores se observó menor discrepancia de géneros (ver Figura 4).

Los géneros más abundantes en las muestras de la temporada de secas fueron *Staphylococcus* (21.60 %), *Lactobacillus* (6.41 %), *Anaplasma* (4.97 %), *Streptococcus* (3.67 %) y *Enterococcus* (3.08 %), en tanto que, en la temporada de lluvias, predominaron los géneros *Weissella* (10.34 %), *Staphylococcus* (9.77 %), *Salinicola* (9.44 %), *Lactobacillus* (9.27 %) y *Halomonas* (6.80 %) (ver Figura 4).

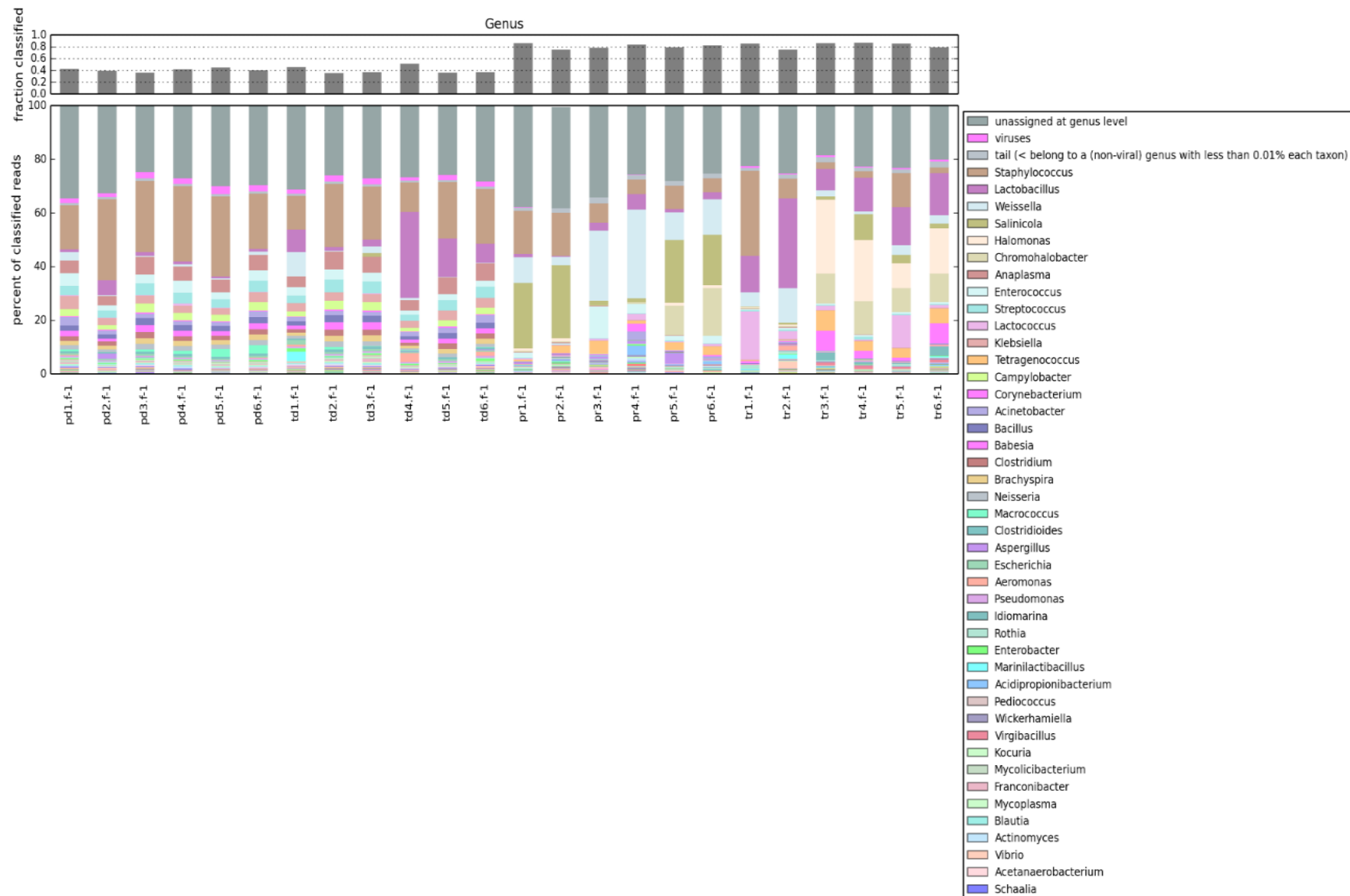


Figura 4. Composición microbiana a nivel de género presente en el QSTCG.

Por otro lado, los géneros *Staphylococcus* (13.88 %), *Lactobacillus* (13.60 %), *Halomonas* (6.42 %), *Chromohalobacter* (3.65 %) y *Weissella* (3.41 %) dominaron en el productor A (td1 – td6: tr1 – tr6), y los géneros *Staphylococcus* (17.49 %), *Weissella* (8.51 %), *Salinicola* (8.05 %), *Enterococcus* (3.61 %) y *Anaplasma* (2.60 %) en el productor B (pd1 – pd6: pr1 – pr6) (ver Figura 4).

La presencia de estos géneros presenta similitud con los reportados por Suárez et al. (2020), quienes mediante la secuenciación de alto rendimiento de la región V4 del gen de 16S rRNA y el análisis metagenómico *shotgun* evaluaron muestras de quesos artesanales del noroeste argentino, y determinaron el dominio de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Otro estudio, realizado por Afshari et al. (2020b), en muestras de diferentes marcas comerciales de queso Cheddar, logró la identificación de 159 OTU, donde *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* fueron los géneros más abundantes. Camargo et al. (2021) a través del uso de la secuenciación de alto rendimiento dirigido al gen 16S rRNA, reportaron en quesos brasileños madurados los géneros de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* como de mayor frecuencia, sin embargo, *Staphylococcus* y *Klebsiella* fueron identificados en alta proporción.

Por otra parte, Escobar-Zepeda et al. (2016) realizaron un estudio en el queso artesanal mexicano Cotija, y se reveló que el metagenoma estaba dominado por los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. También, se ha reportado la presencia de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Staphylococcus* en quesos Gruyère (Falardeau et al., 2019), en tanto que los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Halomonas*, *Streptococcus* y *Enterococcus* han sido identificados en quesos madurados irlandeses (Quigley et al., 2012). *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* fueron los géneros detectados en muestras de queso Mozzarella (Marino et al., 2019).

La población de la microbiota del queso está constituida por bacterias procariotas, levaduras y hongos eucariotas (Ritschard et al., 2018), y también se han identificado virus primordialmente bacteriófagos (Mahony et al., 2017). Estudios realizados han demostrado que las bacterias presentes en los quesos

integra principalmente los filos *Firmicutes* (BAL, *Enterococcus* y *Staphylococcus*), *Actinobacterias* (*Corynebacterium*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*) y *Proteobacterias* (*Enterobacter*) (Yunita & Dodd, 2018). Mientras que, entre los eucariotas y las levaduras, los géneros dominantes han pertenecido a *Geotrichum*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* y *Yarrowia* (Irlinger et al., 2015). Cabe mencionar que en los estudios metagenómicos generalmente las BAL han representado > 90 % de las secuencias, siendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, y *Lactococcus* los géneros que han predominado (Ceugniez et al., 2017), lo cual se reflejó en los resultados obtenidos de esta investigación, ya que algunos de estos géneros fueron los que predominaron en las muestras.

Es importante señalar que *Staphylococcus* fue el género de mayor dominio, por lo que, de acuerdo con Zadoks et al. (2011), una alta prevalencia de este género puede indicar malas prácticas de higiene y mal estado sanitario del ganado. Sin embargo, aunque en este estudio no se hayan examinado las muestras con la presencia de enterotoxinas estafilocócicas, algunas investigaciones han revelado la ausencia de estas enterotoxinas (Andretta et al., 2019; Borelli et al., 2011) o baja ocurrencia en quesos madurados (Cardoso et al., 2013). Aunado a ello, se ha reportado que los quesos elaborados a partir de leche cruda proveen de cultivos bioprotectores, ya que alojan BAL que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos, fungiendo de esta manera como los principales agentes en la conservación de estos alimentos (Montel et al., 2014), al producir bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos (Ristagno et al., 2012).

Cabe mencionar, que la diversidad de la microbiota presente en el QSTCG se debió a diversas fuentes que algunos autores han señalado como los responsables en el perfil general de los quesos de distintas variedades, entre los factores bióticos se encuentran la leche cruda o pasteurizada, el cuajo y los cultivos iniciadores (Sudagidan et al., 2021) mientras que entre los factores abióticos están los procesos tecnológico y el entorno de producción (Yang et al., 2021).

3.3.3 Perfil metabolómico del QSTCG

El análisis metabolómico realizado con el espectrómetro de masas reveló el perfil metabolómico del QSTCG, identificando un total de 193 metabolitos (ver Cuadro 2), que se clasificaron en 38 categorías, de los cuales 46 glicéridos, 31 glicerofosfolípidos, 17 ácidos grasos, 10 aminoácidos, 10 péptidos, 9 vitaminas, 8 esfingolípidos y 7 carbohidratos fueron los grupos que mostraron mayor número de metabolitos detectados.

Cuadro 2. Metabolitos identificados en el QSTCG.

Clasificación	Compuesto
Ácidos alcanos sulfónicos	Á+B2:B160cido metanosulfónico
Ácidos biliares	Ácido glicocólico
Ácidos carboxílicos	Ácido fórmico
Ácidos cinámicos	Ácido 4-metoxicinámico
Ácidos dicarboxílicos	Ácido D-2-hidroxiglutarico
	Ácido 2-ceto-glutarámico
	Ácido oxoglutarico
Ácidos grasos	Ácido isopalmítico
	Ácido 13-metilmirístico
	Ácido 15-metilhexadecanoico
	Ácido araquídico
	Ácido behénico
	Ácido dodecanoico
	Ácido mirístico
	Ácido palmítico
	Ácido esteárico
	Ácido docosahexaenoico
	Ácido eicosadienoico
	Ácido tetracosapentaenoico (24:5n-3)
	Ácido trans-10 octadecenoico
	Ácido trópico
	Ácido erúcico
	Ácido palmitelaídico
	Ácido linoelaídico

Ácidos inorgánicos	Ácido fosfórico
Ácidos orgánicos	Ácido glucónico
	Ácido L-láctico
Ácidos tricarboxílicos	Ácido cítrico
	Ácido cis-acónico
	Homo-cis-aconitato
Acilcarnitinas	L-octanoilcarnitina
	Oleoilcarnitina
Alcanos	3-metilpentano
Alcoholes	1-butanol
	Fenilacetaldehído
Aldehídos	(E,E)-2,4-Hexadienal
	3-aminopropionaldehído
Aminas	Dietanolamina
	N-acetilputrescina
	5-metoxitriptamina
Aminoácidos	5-hidroxi-L-triptófano
	Asn-Arg-Ala-Ile
	Cys-Cys-Asp-Pro
	Glutaminilisina
	Histidinil-cisteína
	Homo-L-arginina
	Ile-Ile-Ile-Pro
	Ácido L-glutámico
	L-Prolina
	Phe-Phe-Pro-Arg
Antibióticos	Penicilina G
	Tetraciclina
	Amoxicilina
Carbohidratos	Fructosa 6-fosfato
	Isomaltosa
	D-galactosa
	Ácido glucárico
	Fructosa 6-fosfato
	3'-sialilactosa

	6'-sialilactosa
Carotenoides	B-caroteno
Ceramidas	Cer(d18:0/24:1(15Z))
Cetonas	Sulcatona
	Dimetilsulfona
Clorhidratos	Clorhidrato de tiamina
Compuestos organosulfurados	Dimetilsulfóxido
	Trisulfuro de dimetilo
Compuestos policlorados	Alfa-endosulfán
Esfingolípidos	SM(d16:0/18:2(9Z,11E))
	SM(d17:0/18:1(11E))
	SM(d18:0/22:2(6Z,13Z))
	SM(d18:0/24:1(15Z))
	SM(d20:0/22:2(6Z,13Z))
	Monosialogangliósido GM1
	Monosialogangliósido GM2
	Monosialogangliósido GM3
Esteres	Monofosfato de guanosina
Fosfolípidos	1-fosfatidil-D-mioinositol
	Fosforilcolina
Glicéridos	DG(16:0/20:2(11Z,14Z)/0:0)[iso2]
	DG(20:2(11Z,14Z)/22:0/0:0)[iso2]
	TG(10:0/10:0/10:0)[iso]
	TG(12:0/18:2(9Z,12Z)/19:0)[iso6]
	TG(12:0/21:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]
	TG(13:0/20:1(11Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]
	TG(14:0/16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))[iso6]
	TG(14:0/16:0/4:0)
	TG(14:0/18:3(9Z,12Z,15Z)/16:1(9Z))
	TG(14:0/20:0/20:3(8Z,11Z,14Z))[iso6]
	TG(14:1(9Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/21:0)[iso6]
	TG(15:0/16:0/16:1(9Z))
	TG(15:0/16:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]
	TG(15:0/16:1(9Z)/24:1(15Z))
	TG(15:0/18:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]

	TG(15:0/18:2(9Z,12Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))[iso6]
	TG(15:0/18:3(9Z,12Z,15Z)/20:2(11Z,14Z))[iso6]
	TG(15:0/20:1(11Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))[iso6]
	TG(15:0/20:2(11Z,14Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))[iso6]
	TG(15:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:0)
	TG(15:0/24:1(15Z)/22:1(13Z))
	TG(16:0/12:0/4:0)
	TG(16:0/14:0/16:0)[iso3]
	TG(16:0/16:0/10:0)
	TG(16:0/16:0/20:0)[iso3]
	TG(16:0/16:1(9Z)/16:1(9Z))[iso3]
	TG(16:0/17:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]
	TG(16:0/18:0/20:0)[iso6]
	TG(16:0/18:2(9Z,12Z)/20:0)[iso6]
	TG(16:1(9Z)/15:0/24:1(15Z))
	TG(16:1(9Z)/16:1(9Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))[iso3]
	TG(16:1(9Z)/17:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)) [iso6]
	TG(16:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:1(11Z))[iso6]
	TG(16:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))[iso6]
	TG(17:0/17:0/20:3(8Z,11Z,14Z))[iso3]
	TG(17:0/18:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))[iso6]
	TG(17:0/18:2(9Z,12Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))[iso6]
	TG(17:0/18:3(6Z,9Z,12Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))[iso6]
	TG(18:0/14:0/18:0)[iso3]
	TG(18:0/18:0/18:0)
	TG(18:1(9Z)/15:0/o-18:0)
	TG(18:1(9Z)/18:1(9Z)/20:0)[iso3]
	TG(18:1(9Z)/20:1(11Z)/20:1(11Z))[iso3]
	TG(18:2(9Z,12Z)/20:0/20:1(11Z))[iso6]
	TG(20:1(11Z)/20:1(11Z)/20:1(11Z))
	TG(6:0/12:0/14:0)
Glicerofosfolípidos	PC(12:0/16:1(9Z))
	PC(14:0/20:3(8Z,11Z,14Z))
	PC(14:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))
	PC(14:1(9Z)/18:2(9Z,12Z))

	PC(14:1(9Z)/20:3(8Z,11Z,14Z))
	PC(15:0/16:1(9Z))
	PC(16:1(9Z)/24:1(15Z))
	PC(17:0/15:0)
	PC(18:0/14:0)
	PC(18:0/14:1(9Z))
	PC(18:0/20:3(8Z,11Z,14Z))
	PC(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))
	PC(18:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))
	PC(18:1(11E)/18:1(11E))
	PC(18:1(9Z)/18:0)
	PC(18:1(9Z)/20:1(11Z))
	PC(18:2(9Z,12Z)/13:0)
	PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/14:0)
	PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))
	PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/20:2(11Z,14Z))
	PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/16:0)
	PC(20:3(8Z,11Z,14Z)/12:0)
	PC(20:3(8Z,11Z,14Z)/18:3(6Z,9Z,12Z))
	PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/16:1(9Z))
	PC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/14:0)
	PC(O-14:0/18:2(9Z,12Z))
	PC(O-14:0/22:0)
	PC(O-20:0/16:1(9Z))
	PC(O-20:0/18:3(9Z,12Z,15Z))
	PC(O-22:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))
	PE(P-18:1(11Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))
Glucolípidos	Disialogangliósido Ib
Hormonas	Estradiol
	Estrona
	Sulfato de estrona
	Genisteína
Lisofosfolípidos	LysoPC(0:0/18:0)
	LysoPC(16:0)
	LisoPC(18:1(9Z))

	LysoPC(18:2(9Z,12Z))
Nucleobases de pirimidinas	Timina
	UDP-L-ramnosa
	Uridina
	Ácido orótico
Nucleósidos	Inosina
Péptidos	Arg-Thr-Lys-Arg
	Alanil-histidina
	Aspartil-valina
	Leucil-alanina
	Leucil-Serina
	Serilmetionina
	Triptófilo-arginina
	Valil-Prolina
	Lys-Asp-Tyr
	L-beta-aspartil-L-glicina
Pirimidinas	5-metilcitosina
	Dihidrouracilo
Triterpenoides	Acetato de 7,11-Dioxolanost-8-en-3-ilo
Uracilos	2-tiouracilo
Vitaminas	Alfa-tocoferol
	Mazorca(l)alamina
	Cobalamina
	Cianocobalamina
	Delta-tocoferol
	Ergocalciferol
	Vitamina C
	Vitamina K1
	Riboflavina

Fuente: Elaboración propia.

Inicialmente, para obtener una descripción general de la distribución de las muestras evaluadas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de los datos de espectrometría de masas. Como se observa en la Figura 5, los dos componentes principales explican el 43.9 % ($p \leq 0.05$) de la variabilidad total de

los datos, el primer componente principal (PC1) explicó el 24.8 % de la variabilidad, y el segundo componente (PC2) el 19.1 % . La gráfica mostró que los datos de la temporada lluvias del productor A y B presentan una similitud considerable, mientras que entre los productores A y B de la época de secas si hubo diferencias. Sin embargo, cabe señalar que el productor A de la época de secas presentó gran similitud con el grupo de lluvias del productor A y B (ver Figura 5).

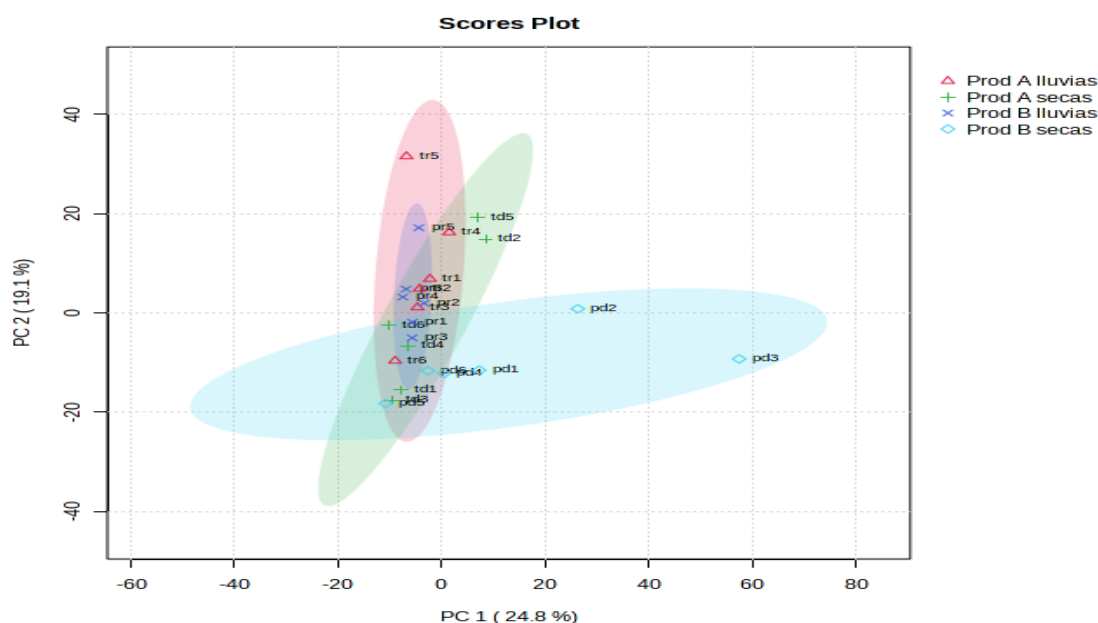


Figura 5. Gráfico de puntuación PCA de muestras de QSTCG que dos temporadas y productores.

Con base al análisis de espectrometría de masas, se realizó un heat map, que presentó los datos obtenidos a una tolerancia negativa de 1000 (ver Figura 6). Los resultados del heat map resultaron consistentes con los obtenidos en el PCA, en donde se presentaron similitudes entre las muestras de ambas temporadas (lluvias y secas), en este caso se observó esa misma tendencia, ya que se apreciaron ciertas similitudes entre los compuestos identificados. Como se aprecia en la Figura 6, se formaron dos grupos principales. El primero comprendió las muestras pd5, td3, td1 y tr6. Por otra parte, el segundo se constituyó por tres subgrupos: el primero englobó las muestras td6, tr3, tr2, pr3, pr2, pr1, pr4, pr6 y pr5; el segundo, las tr5, tr1, td2, tr4, td5, td4, pd6 y pd4; y el tercero, las pd1, pd3

y pd2. Estas asociaciones reflejaron que no se forman conglomerados definidos de las muestras que corresponden a las temporadas de lluvias y secas, sino que hubo metabolitos que se presentaron tanto en las muestras de lluvias como en la de secas. En lo que respecta a los productores, ese mismo comportamiento se mostró en las muestras, excepto por el tercer subgrupo en el que se agruparon solamente las que corresponden al productor B.

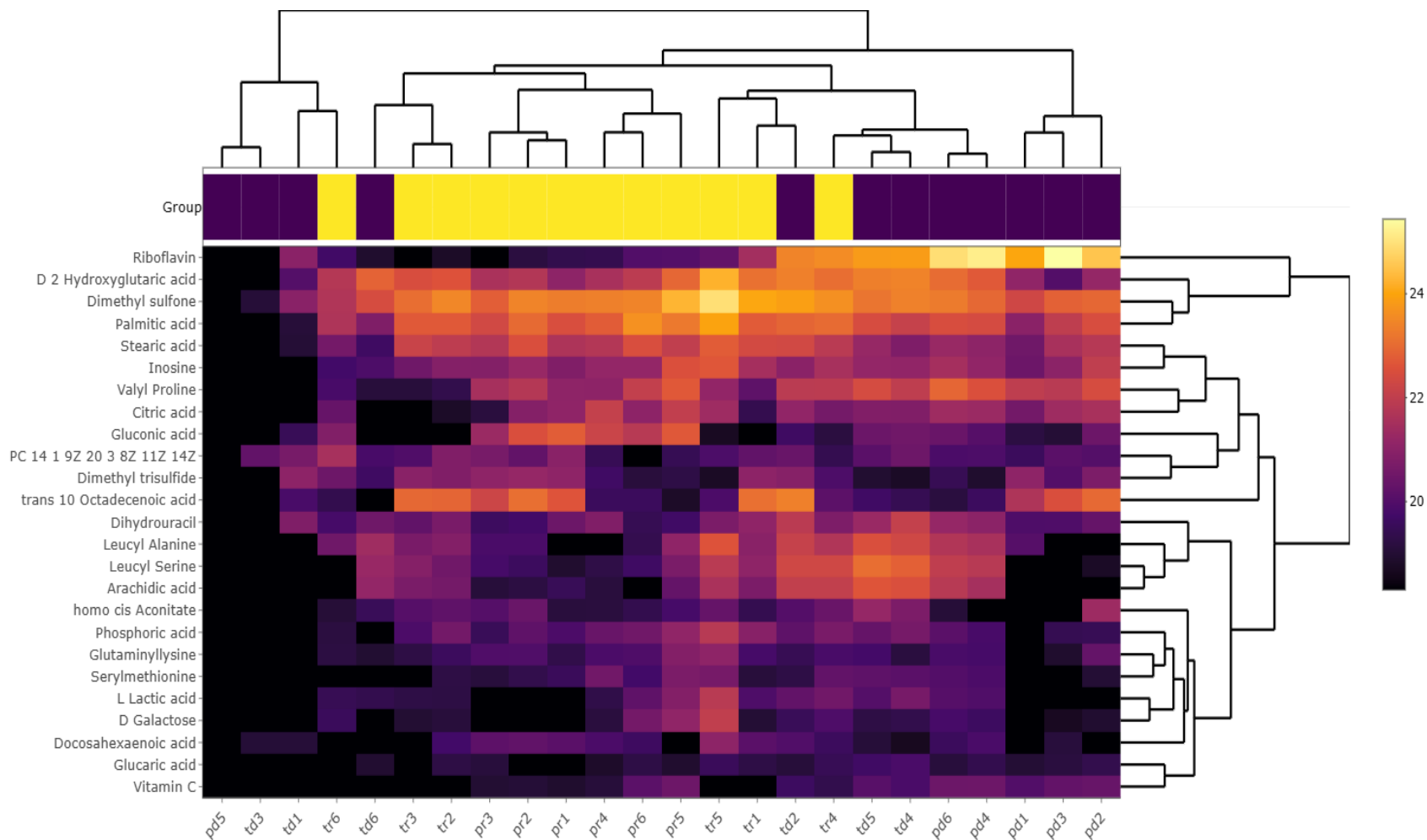


Figura 6. Heat map que muestra los principales metabolitos presentes en todas las muestras del QSTCG.

El heat map agrupó jerárquicamente la intensidad de los metabolitos detectados en las muestras del QSTCG. En el primer grupo principal, se presenciaron con mayor intensidad los compuestos ácido D-2-hidroxiglutarico, dimetilsulfona y ácido palmítico, en tanto que para el segundo grupo principal, formado por tres subgrupos, se observó que en el primer subgrupo los metabolitos de mayor presencia fueron dimetilsulfona, D-2-hidroxiglutarico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido glucónico y ácido trans-10 octadecenoico; en el segundo subgrupo, riboflavina, D-2-hidroxiglutarico, dimetilsulfona, ácido palmítico, ácido esteárico, inosina, valil-prolina, ácido trans-10 octadecenoico, leucil-alanina, leucil-serina y ácido araquídico fueron los metabolitos con mayor intensidad; y en el tercer subgrupo, riboflavina, dimetilsulfona, ácido palmítico, ácido esteárico, valil-prolina y trans-10 octadecenoico.

Los grupos de metabolitos que se identificaron en este análisis presentaron similitud con los reportados por Afshari et al. (2020c), quienes mediante la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas determinaron el perfil metabolómico del queso Cheddar, el cual estaba compuesto por aminoácidos, aminos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos libres y carbohidratos. Mientras que Bertuzzi et al. (2018), en el mismo tipo de queso, detectó los grupos de alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres, cetonas y compuestos sulfurados. Unno et al. (2021), en muestras de tres tipos de queso madurado, identificó aldehídos, alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, hidrocarburos, cetonas y compuestos de azufre. Otro estudio, realizado por Zhang et al. (2022) en muestras de queso mongol, reportó lípidos, ácidos orgánicos, compuestos orgánicos heterocíclicos, bencenoides, compuestos orgánicos nitrogenados, fenilpropanoides y nucleósidos. En tanto que Chen et al. (2022) revelaron los grupos cetonas, ésteres, aldehídos, alcoholes, ácidos y lactonas para la composición metabolómica del queso Gouda. Pisano et al. (2016), por su parte, informaron los grupos de ácidos carboxílicos, aminoácidos, sacáridos y ácidos grasos de cadena corta como los grupos de metabolitos identificados en queso Mozzarella. Y ácidos, ésteres, cetonas, alcoholes, terpenos y compuestos de azufre se

determinaron en análisis metabólico del queso Kope (Esmailzadeh et al., 2021).

Cabe destacar que la presencia de algunos de los metabolitos identificados en las muestras de QSTCG, como la riboflavina, se debió a que este compuesto es empleado como componente de premezclas para piensos (Ruchala et al., 2022), por lo que se infiere que el ganado de ambos productores pudo ser alimentado con este tipo de pienso y transmitido al queso por medio de la leche empleada en la producción. Por otra parte, se ha demostrado que los aminoácidos, ácidos orgánicos y ésteres son los principales metabolitos que confieren el sabor y aroma en los quesos artesanales (Yang et al., 2021). Los dipéptidos y aminoácidos se han asociado a brindar el amargor en los quesos (Zhao et al., 2016), sin embargo, se ha demostrado que, cuando el contenido de grasa y sal es mayor en la producción del queso, se reduce la generación de péptidos amargos (Moschopoulou et al., 2019). En tanto que Ganesan & Weimer, (2017) informaron que la detección de aldehídos es común en los quesos frescos y suelen disminuir durante el proceso de maduración. Referente a la presencia de la mayoría de los ácidos, éstos tienen lugar por el proceso del metabolismo de la lactosa o de la degradación de grasas (Alewijn et al., 2007), y las cetonas, por su parte, se forman por actividades enzimáticas de las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB) (van Mastriht et al., 2018).

El perfil metabólico, como ya se ha reportado en estudios previos, depende de varios factores, entre ellos, el proceso de elaboración, la maduración y la composición de la microbiota del queso (Masotti et al., 2010; Moser et al., 2018). Por lo que determinar el metaboloma del queso es de suma importancia, debido a que los atributos sensoriales y la calidad de los quesos se ligan fuertemente al perfil metabólico y a la abundancia de los metabolitos que se encuentren presentes (Kandasamy et al., 2020).

3.4 Conclusiones

Este estudio permitió la caracterización de la microbiota y determinó el perfil metabolómico del QSTCG. El análisis de secuenciación metagenómica *shotgun*, reveló diferencias en la composición taxonómica de temporadas (lluvias – secas) y mostró similitudes entre los productores evaluados.

El análisis metabolómico logró la identificación de 196 metabolitos que se clasificaron en diferentes grupos. Con base al análisis de componentes principales y el heat map, el perfil metabolómico presentó similitud entre ambas temporadas de producción, así como entre los productores evaluados. Los metabolitos detectados con mayor intensidad en la de las muestras fueron riboflavina, D-2-hidroxiglutarico, dimetilsulfona, ácido palmítico y ácido esteárico.

Los resultados obtenidos muestran que la integración de la metagenómica y metabolómica tienen la capacidad para poder determinar las relaciones que existen entre la diversidad microbiana y los metabolitos, que impactan en la calidad y tipicidad del queso.

3.5 Referencias

- Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020a). 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>
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Read, E., Rochfort, S., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020b). New insights into cheddar cheese microbiota-metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi-omics data. *Scientific Reports*, 10(1), 3164. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59617-9>
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Read, E., Rochfort, S., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020c). New insights into cheddar cheese microbiota-metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi-omics data. *Scientific Reports*, 10(1), 3164. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59617-9>
- Alewijn, M., Smit, B. A., Sliwinski, E. L., & Wouters, J. T. M. (2007). The formation mechanism of lactones in Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 17(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.002>
- Almena-Aliste, M., & Miettton, B. (2014). Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. *Cheese and Microbes*, 39-71. <https://doi.org/10.1128/9781555818593.ch3>
- Andretta, M., Almeida, T. T., Ferreira, L. R., Carvalho, A. F., Yamatogi, R. S., & Nero, L. A. (2019). Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10790-10798. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16967>
- Association of Official Analytical Chemists. (2002). *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Official methods cheese. Gaithersburg, MD, USA.
- Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Official methods cheese. Gaithersburg, MD, USA.
- Ávila-Hernández, J. G., Carrillo-Inungaray, M. L., & Reyes-Munguía, A. (2018). Modificación de la técnica volumétrica de Mohr para cuantificar sodio en queso fresco. *Revista de Simulación y Laboratorio*, 5(16), 1-4.
- Benítez-Guerrero, T., Vélez-Ixta, J. M., Juárez-Castelán, C. J., Corona-Cervantes, K., Piña-Escobedo, A., Martínez-Corona, H., ... & García-Mena, J. (2022). Gut Microbiota Associated with Gestational Health Conditions in a Sample of Mexican Women. *Nutrients*, 14(22), 4818. <https://doi.org/10.3390/nu14224818>
- Berno, T., & Fusté-Forné, F. (2019). Imaginaries of cheese: revisiting narratives of local produce in the contemporary world. *Annals of Leisure Research*, 23(5), 608-626 <https://doi.org/10.1080/11745398.2019.1603113>

- Bertuzzi, A. S., Walsh, A. M., Sheehan, J. J., Cotter, P. D., Crispie, F., McSweeney, P. L., ... & Rea, M. C. (2018). Omics-based insights into flavor development and microbial succession within surface-ripened cheese. *MSystems*, 3(1), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msystems.00211-17>
- Biolcati, F., Ferrocino, I., Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2020). 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>
- Borelli, B. M., Lacerda, I. C. A., Brandão, L. R., Vianna, C. R., Ferreira, M. C., Gomes, F. C. O., ... & Rosa, C. A. (2011). Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63, 481-487. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000200028>
- Bottari, B., Levante, A., Bancalari, E., Sforza, S., Bottesini, C., Prandi, B., ... & 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>
- Cardoso, V. M., Dias, R. S., Soares, B. M., Clementino, L. A., Araújo, C. P., & Rosa, C. A. (2013). The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 743-749. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000059>
- Castro-Puyana, M., Pérez-Míguez, R., Montero, L., & Herrero, M. (2017). Reprint of: Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 96, 62-78. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.007>
- 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>
- Chen, C., Tian, T., Yu, H., Yuan, H., Wang, B., Xu, Z., & Tian, H. (2022). Characterisation of the key volatile compounds of commercial Gouda cheeses and their contribution to aromas according to Chinese consumers' preferences. *Food Chemistry*, 368, 100416. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100416>
- De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J. A., & Ercolini, D. (2016). Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Scientific Reports*, 6(1), 21871. <https://doi.org/10.1038/srep21871>

- El Sheikha, A. F., & Hu, D. M. (2020). Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 11-32. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1506906>
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Baruch, M. Q. (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>
- Esmailzadeh, P., Ehsani, M. R., Mizani, M., & Givianrad, M. H. (2021). Characterization of a traditional ripened cheese, Kurdish Kope: Lipolysis, lactate metabolism, the release profile of volatile compounds, and correlations with sensory characteristics. *Journal of Food Science*, 86(8), 3303-3321. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15830>
- Falardeau, J., Keeney, K., Trmčić, A., Kitts, D., & Wang, S. (2019). Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiology*, 83, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.002>
- Flores-Magallón, R., Oliva-Hernández, A. A., & Narváez-Zapata, J. A. (2011). Characterization of microbial traits involved with the elaboration of the Cotija cheese. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 997-1003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0137-z>
- Ganesan, B., & Weimer, B. C. (2017). Amino acid catabolism and its relationship to cheese flavor outcomes. In P. L. H. McSweeney., P. F. Fox., P. D. Cotter., & D. W. Everett (Eds.), *Cheese* (pp. 483-516). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3>
- 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>
- Hernández, C., Hernández, A., Aguirre, E., & Villegas, A. (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 552-560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Ianni, A., Di Domenico, M., Bennato, F., Peserico, A., Martino, C., Rinaldi, A., ... & Martino, G. (2020). Metagenomic and volatile profiles of ripened cheese obtained from dairy ewes fed a dietary hemp seed supplementation. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 5882-5892. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17954>
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., & Dugat-Bony, E. (2015). Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters*, 362(2), 1-11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>

- Kamilari, E., Tomazou, M., Antoniadou, A., & Tsaltas, D. (2019). High throughput sequencing technologies as a new toolbox for deep analysis, characterization and potentially authentication of protection designation of origin cheeses?. *International Journal of Food Science*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5837301>
- 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>
- Kothe, C. I., Mohellibi, N., & Renault, P. (2022). Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Research International*, 157, 111265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111265>
- López, G. (2021). *Caracterización del queso Seco de la Tierra Caliente de Guerrero* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo]. Repositorio Académico de la Universidad Autónoma Chapingo. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/791c77ce-640f-4353-95c4fbc4138b5611>
- Mahony, J., Moscarelli, A., Kelleher, P., Lugli, G. A., Ventura, M., Settanni, L., & Van Sinderen, D. (2017). Phage biodiversity in artisanal cheese wheys reflects the complexity of the fermentation process. *Viruses*, 9(3), 45. <https://doi.org/10.3390/v9030045>
- Margalef, R. (1972). *Homage to Evelyn Hutchinson, or why there is an upper limit to diversity*. Connecticut Academy of Arts and Sciences.
- Marino, M., de Wittenau, G. D., Saccà, E., Cattonaro, F., Spadotto, A., Innocente, N., ... & 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>
- Masotti, F., Hogenboom, J. A., Rosi, V., De Noni, I., & Pellegrino, L. (2010). Proteolysis indices related to cheese ripening and typicalness in PDO Grana Padano cheese. *International Dairy Journal*, 20(5), 352-359. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.020>
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2021). Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety. *Foods*, 10(3), 602. <https://doi.org/10.3390/foods10030602>
- Mezo-Solís, J. A., Moo-Huchin, V. M., Sánchez-Zarate, A., González-Ronquillo, M., Estrada-León, R. J., Ibáñez, R., ... & Vargas-Bello-Pérez, E. (2020). Physico-Chemical, Sensory and Texture Properties of an Aged Mexican Manchego-Style Cheese Produced from Hair Sheep Milk. *Foods*, 9(11), 1666. <https://doi.org/10.3390/foods9111666>
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and

- diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Moschopoulou, E., Moatsou, G., Syrokou, M. K., Paramithiotis, S., & Drosinos, E. H. (2019). Food quality changes during shelf life. In C. M. Galanakis (Ed.), *Food quality and shelf life* (pp. 1-31). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00001-X>
- Moser, A., Schaefroth, K., Meile, L., Egger, L., Badertscher, R., & Irmeler, S. (2018). Population dynamics of *Lactobacillus helveticus* in Swiss Gruyère-type cheese manufactured with natural whey cultures. *Frontiers in Microbiology*, 9, 637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00637>
- NMX-F-713-COFOCALEC-2014. (2014). *Sistema producto leche - alimentos lácteos queso y queso de suero - denominaciones, especificaciones y métodos de prueba*. Ciudad de México, México.
- Paxson, H. (2011). The 'art' and 'science' of handcrafting cheese in the United States. *Endeavour*, 35(2-3), 116-124.
<https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2011.05.004>
- Peláez, P., Fresno, M.R., Díaz, C., & Darías, J. (2003). Caracterización fisicoquímica de quesos frescos elaborados con leche de cabra en la Isla de Tenerife. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(2).
<https://doi.org/10.1080/11358120309487750>
- Piras, C., Marincola, F. C., 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>
- Pisano, M. B., Scano, P., Murgia, A., Cosentino, S., & Caboni, P. (2016). Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *Food Chemistry*, 192, 618-624.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.061>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012). High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5717-5723.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00918-12>
- Ramírez-Navas, J. S., Aguirre-Londoño, J., Aristizabal-Ferreira, V. A., & Castro-Narváez, S. (2017). La sal en el queso: diversas interacciones / Salt in cheese: several interactions. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 303-316.
<https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>
- Ramírez, M., Garibay, J. M., Jiménez, J., & Villanueva, A. (2016). Inocuidad en alimentos tradicionales: el queso de Poro de Balancán como un caso de

estudio. *Estudios Sociales: Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 25(47), 87-110.

- Ristagno, D., Hannon, J. A., Beresford, T. P., & McSweeney, P. L. (2012). Effect of a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus paracasei* on the nonstarter microflora of Cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 523-530. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00856.x>
- Ritschard, J. S., Amato, L., Kumar, Y., Müller, B., Meile, L., & Schuppler, M. (2018). The role of the surface smear microbiome in the development of defective smear on surface-ripened red-smear cheese. *AIMS Microbiology*, 4(4), 622. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.622>
- Rogers, N. R., McMahon, D. J., Daubert, C. R., Berry, T. K., & Foegeding, E. A. (2010). Rheological properties and microstructure of Cheddar cheese made with different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4565-4576. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3494>
- Ruchala, J., Andreieva, Y. A., Tsyrlunyk, A. O., Sobchuk, S. M., Najdecka, A., Wen, L., ... & Sibirny, A. A. (2022). Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01888-0>
- Salas, V. T., & Montes, A. H. (2021). Respuestas emocionales en consumidores de Queso de Zacazonapan y probabilidad de consumo durante maduración. *Agrociencia*, 55(3), 243-259. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i3.2416>
- Soler, P., Berroterán, J., Gil, J., & Acosta, R. (2012). Índice valor de importancia, diversidad y similaridad florística de especies leñosas en tres ecosistemas de los llanos centrales de Venezuela. *Agronomía Tropical*, 62(1-4), 025-038.
- Solís, A. D., Martínez, R., Solorio, J., Estrada, J. G., Avilés, F., Gutiérrez, A.T., & Castelán, O.A. (2013). Características del queso Tepeque de la tierra caliente de Michoacán: Un queso producido en un sistema silvopastoril intensivo. *Trop. Subtrop. Agroecosystems Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(2), 201-214.
- Suárez, N., Weckx, S., Minahk, C., Hebert, E. M., & Saavedra, L. (2020). Metagenomics-based approach for studying and selecting bioprotective strains from the bacterial community of artisanal cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 335, 108894. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108894>
- Sudagidan, M., Yurt, M. N. Z., Tasbasi, B. B., Acar, E. E., Omeroglu, E. E., Ucak, S., ... & Aydin, A. (2021). 16S Bacterial Metagenomic Analysis of Herby

- Cheese (Otlı Peynir) Microbiota. *Acta Veterinaria Eurasia*, 47(3), 188-197. <https://doi.org/10.5152/actavet.2021.21037>
- Tilocca B., Costanzo N., Morittu V. M., Spina A. A., Soggiu A., Britti D., Roncada P., & Piras C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>
- Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., & Vallejo-Cordoba, B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3794-3800. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4237>
- Trmčić, A., Ralyea, R., Meunier-Goddik, L., Donnelly, C., Glass, K., D'amico, D., ... & Wiedmann, M. (2017). Consensus categorization of cheese based on water activity and pH—A rational approach to systemizing cheese diversity. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 841-847. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11621>
- Unno, R., Suzuki, T., Matsutani, M., & Ishikawa, M. (2021). Evaluation of the relationships between microbiota and metabolites in soft-type ripened cheese using an integrated omics approach. *Frontiers in Microbiology*, 12, 681185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.681185>
- van Mastrigt, O., Gallegos Tejeda, D., Kristensen, M. N., Abee, T., & Smid, E. J. (2018). Aroma formation during cheese ripening is best resembled by *Lactococcus lactis* retentostat cultures. *Microbial Cell Factories*, 17, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0950-7>
- Verdier-Metz, I., Coulon, J. B., & Pradel, P. (2001). Relationship between milk fat and protein contents and cheese yield. *Animal Research*, 50(5), 365-371. <https://doi.org/10.1051/animres:2001138>
- Villegas, A., & Cervantes, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)*, 19(38), 145-164.
- Villegas, A., Santos, A., & Cervantes, F. (2016). *Los quesos mexicanos tradicionales*. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM.
- Walsh, A. M., Macori, G., Kilcawley, K. N., & Cotter, P. D. (2020). Meta-analysis of cheese microbiomes highlights contributions to multiple aspects of quality. *Nature Food*, 1(8), 500-510. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0129-3>
- Yang, C., You, L., Kwok, L. Y., Jin, H., Peng, J., Zhao, Z., & Sun, Z. (2021). Strain-level multiomics analysis reveals significant variation in cheeses from different regions. *LWT*, 151, 112043. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112043>

- Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>
- Yunita, D., & Dodd, C. E. (2018). Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4923-4935. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14104>
- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., & Schukken, Y. H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16, 357-372. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236>
- Zhang, X., Zheng, Y., Feng, J., Zhou, R., & Ma, M. (2022). Integrated metabolomics and high-throughput sequencing to explore the dynamic correlations between flavor related metabolites and bacterial succession in the process of Mongolian cheese production. *Food Research International*, 160, 111672. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111672>
- Zhao, C. J., Schieber, A., & Gänzle, M. G. (2016). Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations—A review. *Food Research International*, 89, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.042>