



ORIGINAL

## Microbiota levaduriforme en quesos artesanales de Corrientes, Argentina



Marina C. Cardozo<sup>a,\*</sup>, Ángel J.V. Fusco<sup>a</sup> y Marta S. Carrasco<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

<sup>b</sup> Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

Recibido el 12 de noviembre de 2015; aceptado el 28 de junio de 2016

Disponible en Internet el 25 de octubre de 2017

### PALABRAS CLAVE

Levaduras;  
Quesos artesanales;  
Microbiota

### KEYWORDS

Yeasts;  
Artisanal cheese;  
Microbiota

**Resumen** El llamado queso artesanal de Corrientes (QAC) es un queso blando elaborado en la provincia de Corrientes a partir de leche de vaca cruda y agente coagulante artesanal. Las bacterias lácticas constituyen la flora principal de estos quesos, pero las levaduras también se encuentran en tasas elevadas como biota secundaria y podrían desempeñar un papel relevante en su maduración. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de levaduras en las materias primas y en la cuajada con la que se elabora este queso y durante su maduración en función de las variaciones estacionales. Se aislaron y purificaron levaduras a partir de la leche cruda, del agente coagulante, de la cuajada y de los quesos elaborados en las distintas estaciones del año a distintos tiempos de maduración. Los recuentos de levaduras fueron del orden de  $10^3$  a  $10^7$  UFC/ml o UFC/g. Se obtuvieron e identificaron 90 cepas de levaduras: 9 de leche, 28 de agente coagulante, 10 de cuajada y 43 de quesos. En leche se observó un muy amplio predominio del género *Candida*, la incidencia de otros géneros fue poco significativa. En el agente coagulante también predominó netamente el género *Candida*, seguido por los géneros *Myxozyma* y *Debaryomyces*. Los aislamientos obtenidos de los quesos correspondieron a los mismos géneros que fueron predominantes en el agente coagulante, con el mismo orden de prevalencia.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Yeast microbiota in artisanal cheeses from Corrientes, Argentina

**Abstract** The artisanal cheese from Corrientes (from the Spanish acronym QAC-Queso Artesanal de Corrientes/Artisanal Cheese from Corrientes) is a soft cheese elaborated with raw cow milk and an artisanal coagulant agent. Lactic bacteria constitute the main flora of this cheese although yeasts are also present in high quantities as secondary microbiota and might play a relevant role in cheese ripening. The aim of this work was to evaluate yeast occurrence during

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [marinacardozo2212@yahoo.com.ar](mailto:marinacardozo2212@yahoo.com.ar) (M.C. Cardozo).

QAC elaboration and ripening, and the effect of seasonal variation. Yeasts were isolated and purified from raw materials and cheese at different ripening stages elaborated during the different seasons. Yeast sample counts were in the order of  $10^3$  -  $10^7$  UFC/ml o UFC/g. Ninety yeast strains were classified: 9 from milk, 28 from the coagulant agent, 10 from curd and 43 from cheese. *Candida* predominated in milk samples while other yeast genera had low incidence. *Candida* also predominated in the coagulant agent samples, followed by genera *Myxozyma* and *Debaryomyces*. The isolates obtained from cheese belonged to the same genera predominating in the coagulant agent, and showed the same order of prevalence.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

Las levaduras están presentes en distintas variedades de quesos, frecuentemente en alto número. Estos organismos podrían contribuir de manera significativa al proceso de maduración de estos productos o, por el contrario, podrían producir alteraciones en ellos. Su presencia en quesos puede ser atribuida a diferentes características tecnológicas, como la habilidad para crecer a bajas temperaturas<sup>6,7,22</sup>, la resistencia a altas concentraciones de sal<sup>7,11,22,26</sup>, la asimilación/fermentación de la lactosa<sup>22,24</sup>, la resistencia a agentes sanitizantes<sup>12</sup> y la habilidad de tolerar bajos valores de  $a_w$  y pH<sup>6,7,22,29</sup>.

La principal contribución de las levaduras al proceso de maduración de quesos es la utilización de los ácidos orgánicos que se generan como productos del metabolismo del cultivo iniciador<sup>6,9,11,16,22,31</sup>, con el consecuente incremento de pH.

La actividad proteolítica y lipolítica de ciertas especies de levaduras puede desempeñar también un papel importante en la formación de precursores del aroma, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos y ésteres<sup>6,16,22,31</sup>, además de contribuir con los cambios en la textura<sup>22</sup>.

Por otro lado, el daño en los productos lácteos debidos al crecimiento excesivo de levaduras generalmente incluye sabores frutales, a «levadura» y otros sabores desagradables; también gasificación, formación de limo, decoloración o generación de pigmentos indeseados y cambios de la textura<sup>15,30</sup>.

El queso artesanal de Corrientes (QAC) es un queso blando con escasa o nula maduración, elaborado en la provincia de Corrientes (Argentina) a partir de leche cruda de vaca y agente coagulante artesanal, obtenido por inmersión de trozos de cuajo en leche. La presencia de levaduras en quesos artesanales elaborados a partir de leche de diferentes orígenes animales ha sido investigada por diferentes autores europeos<sup>11,18,22</sup>, pero es escasa la información disponible sobre levaduras de origen caseario en nuestro país<sup>2,3,8</sup>.

En trabajos anteriores<sup>28</sup> se observó que durante la maduración del QAC, la población levaduriforme era importante y se incrementaba con el tiempo, sin verse afectada por la adición del fermento constituido por bacterias lácticas ni por la prolongación del período de maduración. El objetivo de

este trabajo fue evaluar la presencia de microbiota levaduriforme en las materias primas con las que se elaboran estos quesos y en el producto obtenido durante su maduración, en función de las variaciones estacionales.

## Materiales y métodos

### Elaboración de quesos

En el lapso de un año (marzo de 2004-marzo de 2005) se realizaron en el establecimiento rural perteneciente a la familia Goiriz, ubicado en la localidad de Ramada Paso, provincia de Corrientes, 8 elaboraciones artesanales de quesos a lo largo de las 4 estaciones climáticas del año (otoño, invierno, primavera y verano), a razón de 2 por estación, con la producción de solo un queso artesanal en cada elaboración. Las muestras para el presente estudio fueron tomadas del mismo queso a distintos tiempos de maduración. Por consiguiente, al finalizar la experiencia se contó con el análisis de 8 quesos en total (2 por cada estación).

Los quesos fueron producidos a partir de leche cruda de vaca obtenida del único animal perteneciente a la familia del establecimiento elaborador.

Cada queso fue elaborado por el productor siguiendo la metodología tradicional con el agregado de un fermento constituido por bacterias lácticas autóctonas, denominado fermento Gaucho<sup>28</sup>, en una concentración del 2% (v/v).

A 15 litros de leche cruda de vaca recién ordeñada y calentada a 32 °C se adicionaron 300 ml del fermento. Luego de permitir una ligera maduración (30 min), se agregaron 180 ml del agente coagulante artesanal producido por el mismo productor. El agente coagulante artesanal es el suero obtenido a partir de leche de vaca cruda coagulada a temperatura ambiente por acción del cuajo: cuarto estómago de ternero salado, en una proporción aproximada de una parte de sal cada 2 partes de tejido, y secado a temperatura y humedad ambiente.

La leche con adición de fermento y agente coagulante comenzó a coagular aproximadamente a los 55 min. Cuando la cuajada adquirió las características deseables, se procedió al corte, realizado en forma manual hasta lograr granos del tamaño de un maní. El suero exudado se eliminó

manualmente. Se procedió al salado (1,85% [p/v]) de la cuajada semiseca y luego se colocó en un molde plástico perforado realizando un ligero prensado en forma manual, permitiendo la eliminación del suero residual en un tiempo estimado de 4 a 6 h.

Cada queso fue madurado durante un período de 30 días en refrigerador doméstico (5-8 °C) en el lugar de origen, rotándolos diariamente. Durante este período se fueron tomando muestras del mismo queso a los días 1, 6, 15 y 30 de maduración. Cada queso tuvo, al finalizar la maduración, un peso promedio de 1 kg.

### Preparación de las muestras

En cada elaboración se aislaron levaduras de la leche cruda, del agente coagulante, de la cuajada luego del desuerado y del mismo queso a los días 1, 6, 15 y 30 de la maduración. De cada muestra fueron tomadas 4 submuestras; de esta manera el modelo de muestreo empleado considera como tratamientos las estaciones, con 2 repeticiones (2 elaboraciones) por estación y 4 submuestras por elaboración.

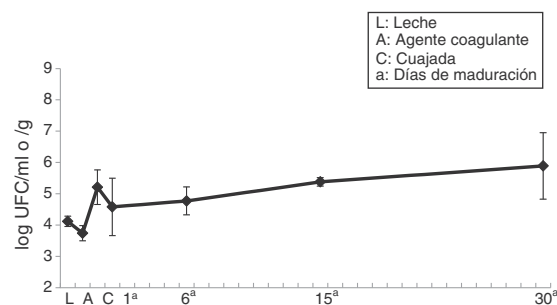
Las muestras de leche, de agente coagulante y de cuajada se recolectaron según las pautas del *International Standard FIL-IDF 50 C:1995*<sup>17</sup>. Las muestras de queso se extrajeron usando un sacabocados, desde la superficie hacia el centro, descartando la parte externa (aproximadamente 2 cm). Los orificios se sellaron con VAS-PAR estéril (vaselina-parafina 1:1) a fin de evitar posibles cambios generados por las condiciones ambientales.

Las muestras se transportaron al laboratorio mantenidas a temperatura de refrigeración (4-6 °C) y se analizaron dentro de las 24 h de su extracción, de acuerdo con lo descrito en el *International Standard FIL-IDF 122 C:1996*<sup>18</sup>.

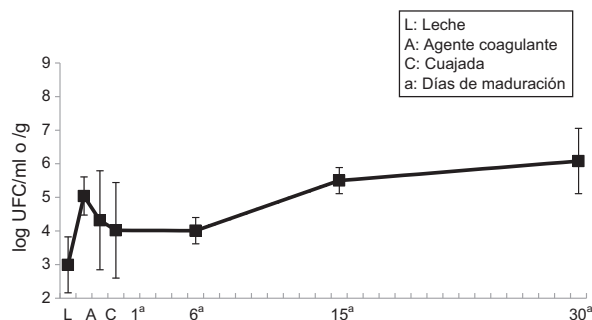
### Recuento y aislamiento de levaduras a partir de materias primas y del QAC a distintos períodos de maduración

Diluciones apropiadas de las submuestras se sembraron en profundidad y por duplicado en cajas de Petri utilizando el medio de cultivo YGCB (Biokar [Biokar Diagnostics - Solabia Group, Beauvais Cedex - France], extracto de levadura, 5,0 g; glucosa, 20,0 g; cloranfenicol, 0,1 g; agar-agar, 15,0 g; azul de bromofenol, 0,01 g; agua, 1 l; pH 6,4-6,8; esterilizado a 121 °C, 15 min). Luego de incubar a 30 °C durante 4 días, se efectuó el recuento total de levaduras. Se eligió esta temperatura de incubación debido a que la provincia de Corrientes se caracteriza por un clima cálido subtropical y se buscaba aislar levaduras adaptadas al nicho ecológico donde se elaboran estos quesos, en reemplazo de la temperatura de 25 ± 1 °C, usualmente empleada para aislar estos microorganismos<sup>23</sup>. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) o por gramo de muestra (UFC/g).

Se seleccionaron al menos 3 colonias de cada tipo morfológicamente diferente de cada caja de Petri y se purificaron por pasajes sucesivos y al menos 3 veces en medio YM (extracto de levadura, 0,3%; extracto de malta, 0,3%; peptona, 0,5%; glucosa, 1,0%; pH 6,0), con la adición de 10% (v/v) de una solución alcohólica de cloranfenicol al 0,5% (P/V). Las cepas se incubaron a 30 °C durante 4 días como



**Figura 1** Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de queso artesanal de Corrientes en la estación otoño.



**Figura 2** Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de queso artesanal de Corrientes en la estación invierno.

máximo, dependiendo de la velocidad de crecimiento; se verificó su pureza por microscopía directa. Las cepas puras y activas se conservaron bajo condiciones de refrigeración (4-5 °C) en estrías de agar YM<sup>23</sup> hasta su identificación.

### Caracterización taxonómica de las cepas aisladas

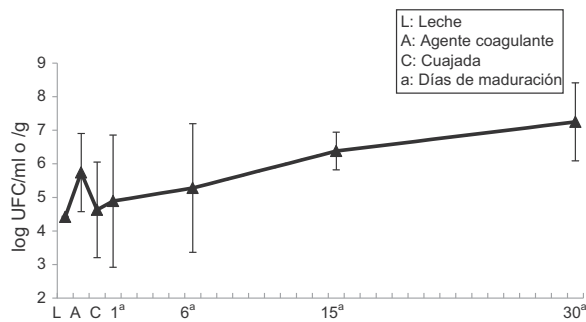
Las levaduras aisladas se identificaron de acuerdo con sus características morfológicas y fisiológicas según la clasificación y metodologías propuestas por Kreger-van Rij<sup>19</sup> y Barnett et al.<sup>4</sup>. Los resultados se confirmaron mediante el uso del sistema API 20 C AUX y API Candida (API 20 C AUX®, BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia).

### Análisis estadístico

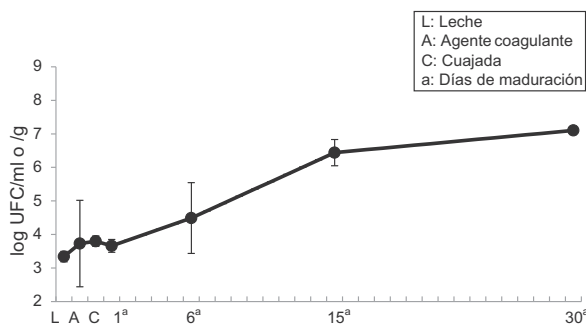
Se realizó el análisis de la varianza de los log UFC por mililitro o por gramo en las 4 estaciones empleando test de Duncan, con un grado de significación de 0,05. Para el análisis se empleó el software InfoStat versión 2016e (grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina)<sup>10</sup>.

### Resultados

Las cinéticas de crecimiento de las levaduras aisladas en cada estación de las materias primas y del QAC a diferentes tiempos de maduración se presentan en las figuras 1-4. Estas se elaboraron con los promedios de los recuentos de levaduras (expresados como log UFC por mililitro o gramo



**Figura 3** Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de queso artesanal de Corrientes en la estación primavera.



**Figura 4** Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de queso artesanal de Corrientes en la estación verano.

de muestra) obtenidos de las 8 submuestras analizadas por estación: 2 elaboraciones con 4 submuestras cada una.

Las diferentes muestras analizadas a lo largo de un año presentaron una población de levaduras en el orden de  $10^3$ - $10^7$  UFC/ml o UFC/g (tabla 1).

Los valores promedio de los recuentos en leche cruda oscilaron entre 2,99 log UFC/ml y 4,38 log UFC/ml. Los mayores recuentos se observaron en otoño y primavera ( $p < 0,05$ ), sin diferencias significativas entre dichas estaciones ( $p > 0,05$ ), y los menores recuentos se obtuvieron en invierno.

La carga microbiana presente en el agente coagulante en invierno y primavera fue superior ( $p < 0,05$ ) a la detectada en otoño y verano. La población del agente coagulante fue la que mostró mayor gradiente estacional.

Si comparamos los recuentos de ambas materias primas, el agente coagulante aporta la mayor contaminación

( $p < 0,05$ ) a la cuajada y, consecuentemente a los quesos, en invierno y primavera. La leche hace mayor aporte en el otoño ( $p < 0,05$ ), mientras que en el verano ambos hacen contribuciones similares ( $p > 0,05$ ).

No existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos de levaduras de la cuajada y de las materias primas en invierno, primavera y verano, mientras que en otoño los valores de la cuajada superan a los de las materias primas ( $p < 0,05$ ).

Al analizar las cinéticas de crecimiento de las levaduras durante la maduración, se distinguen 3 períodos en referencia a la velocidad de crecimiento (figs. 1-4):

- Primeros 6 días de maduración.** En las 4 estaciones se obtuvieron perfiles sustancialmente planos, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos en quesos sin maduración y en quesos con 6 días de maduración.
- Del 6.º al 15.º día de maduración.** Durante este período se observan en invierno y en verano las mayores velocidades de crecimiento, con pendientes francamente positivas y con diferencias significativas en el número de levaduras de los quesos de 6 y 15 días ( $p < 0,05$ ) de maduración, mientras que las pendientes correspondientes al otoño y la primavera son menores, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).
- Desde el 15.º hasta el 30.º día de maduración.** Las curvas de otoño e invierno se solapan ( $p > 0,05$ ), al igual que las de primavera y verano. Ambas duplas, a su vez, presentan pendientes similares ( $p > 0,05$ ).

Al comparar los recuentos en cada estación (tabla 1) durante la maduración, se observó que los recuentos de los quesos de un día de maduración no presentaban diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en ninguna de las 4 estaciones, mientras que a los 6 días de maduración no se observaban diferencias significativas solo entre otoño y verano.

Asimismo, a partir del 15.º día de maduración, la falta de diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) se produce entre otoño e invierno, al igual que entre primavera y verano. Los recuentos de las estaciones cálidas superan en un ciclo logarítmico a los registrados en las épocas de menores temperaturas ( $p < 0,05$ ).

Se aislaron en total 90 cepas de levaduras a partir de las materias primas y de los quesos elaborados en las diferentes estaciones del año y analizados a distintos tiempos de maduración. De ellas, 9 provenían de muestras de leche y 28 de muestras del agente coagulante artesanal, 10 de muestras de cuajada y 43 de muestras de quesos con distintos períodos

**Tabla 1** Recuentos de levaduras en las materias primas y en el queso artesanal de Corrientes a distintos tiempos de maduración

	Leche	Agente coagulante	Cuajada	Queso día 1	Queso día 6	Queso día 15	Queso día 30
Otoño	4,12 <sup>c</sup> ± 0,50	3,74 <sup>a</sup> ± 0,23	5,06 <sup>b</sup> ± 0,36	4,58 <sup>a</sup> ± 0,70	4,77 <sup>a,b</sup> ± 0,41	5,38 <sup>a</sup> ± 0,16	5,81 <sup>a</sup> ± 0,75
Invierno	2,99 <sup>a</sup> ± 0,69	5,04 <sup>b</sup> ± 0,44	5,00 <sup>b</sup> ± 0,39	4,02 <sup>a</sup> ± 1,07	4,01 <sup>a</sup> ± 0,99	5,57 <sup>a</sup> ± 0,26	6,08 <sup>a</sup> ± 0,75
Primavera	4,38 <sup>c</sup> ± 0,40	5,75 <sup>b</sup> ± 0,91	4,63 <sup>b</sup> ± 1,09	4,89 <sup>a</sup> ± 1,51	5,28 <sup>b</sup> ± 1,46	6,38 <sup>b</sup> ± 0,44	6,82 <sup>b</sup> ± 0,94
Verano	3,57 <sup>b</sup> ± 0,40	3,70 <sup>a</sup> ± 0,88	3,80 <sup>a</sup> ± 0,31	3,68 <sup>a</sup> ± 0,31	4,49 <sup>a,b</sup> ± 0,81	6,44 <sup>b</sup> ± 0,33	7,09 <sup>b</sup> ± 0,10

Los valores mostrados corresponden al log UFC/ml o de UFC/g ± desviación estándar.

En las materias primas, el número de muestras por estación fue 2 y el de submuestras 8 (4 submuestras por muestra).

<sup>a, b, c</sup>: letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los recuentos de levaduras en las diferentes estaciones climáticas en las materias primas, cuajada y quesos con distintos días de maduración (Test de Duncan).

**Tabla 2** Frecuencia relativa (%) de las especies de levaduras aisladas de las materias primas y del queso artesanal de Corrientes a distintos tiempos de maduración

Especie identificada	Origen de las especies (%)							Total (n = 90)
	Leche	Agente coagulante	Cuajada	Queso día 1	Queso día 6	Queso día 15	Queso día 30	
	(n = 9)	(n = 28)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 13)	(n = 10)	(n = 9)	
<i>Candida aaseri</i>	0	3,6	0	0	0	0	0	1,1
<i>Candida bertae</i>	11,1	0	0	0	7,7	0	0	2,2
<i>Candida blankii</i>	11,1	17,9	10,0	27,3	15,4	50,0	22,2	21,1
<i>Candida santjacobensis</i>	22,2	21,4	10,0	9,1	0	0	22,2	12,2
<i>Candida shehatae</i>	11,1	10,7	0	0	15,4	20,0	11,1	10,0
<i>Candida tenuis</i>	11,1	0	0	0	0	0	0	1,1
<i>Candida spp.</i>	0	3,6	0	0	0	0	0	1,1
<i>Cryptococcus albidus</i>	11,1	0	10,0	0	7,7	10,0	0	4,4
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	0	7,1	20,0	9,09	15,4	0	11,1	8,9
<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	0	7,1	10,0	27,3	0	0	0	6,7
<i>Myxozyma monticola</i>	0	21,4	10,0	18,2	23,1	10,0	22,2	17,8
<i>Pichia farinosa</i>	0	0	0	0	7,7	0	0	1,1
<i>Pichia spp.</i>	11,1	7,1	20,0	0	0	10,0	11,1	7,8
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	0	0	10,0	0	0	0	0	1,1
<i>Stephanoascus smithiae</i>	0	0	0	9,09	7,69	0	0	2,2
<i>Rhodotorula acuta</i>	11,1	0	0	0	0	0	0	1,1
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

n: número de aislamientos.

de maduración. Las frecuencias relativas (%) de las especies de levaduras aisladas en las distintas muestras se presentan en la [tabla 2](#).

En las cepas provenientes de leche predominó el género *Candida* (66,7%). Se aislaron también levaduras pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula* en menor proporción. En el agente coagulante, el género *Candida* (57,2%) también constituyó el grupo dominante. Se destacó en segundo orden el género *Myxozyma* (21,4%). Le siguieron en importancia cepas de levaduras pertenecientes al género *Debaryomyces*, que se presentaron en proporciones significativas (14,3%).

A diferencia de las materias primas, en la cuajada se observó una prevalencia del género *Debaryomyces*. En segundo lugar se ubicaron *Candida* y *Pichia*. Además, en estas muestras se aislaron cepas del género *Stephanoascus*, no hallado en las materias primas, en igual proporción que otros 2 géneros aislados en estas muestras, *Cryptococcus* y *Myxozyma*.

En los quesos con distintos tiempos de maduración se encontraron los mismos géneros hallados en la leche, en el agente coagulante y en la cuajada, con excepción del género *Rhodotorula*, que solo se encontró en muestras de leche. Se observó también un alto porcentaje del género *Candida* (48,8%), seguido en orden de importancia por *Myxozyma* (18,6%) y *Debaryomyces* (16,3%), estos presentaron el mismo orden decreciente de frecuencias que en el agente coagulante, con porcentajes muy similares.

## Discusión

En esta investigación, los recuentos de levaduras en la leche cruda destinada a la elaboración del QAC arrojaron

resultados similares a los informados previamente para la leche cruda empleada para la elaboración de otros quesos artesanales<sup>5,11,15,28</sup>.

La microflora del queso constituye una comunidad compleja, característica que se acentúa cuando se trata de productos elaborados con leche cruda y agente coagulante artesanal. La presencia de microorganismos en el agente coagulante empleado en la elaboración del QAC depende de muchas variables, entre ellas las ambientales (humedad y temperatura), la cantidad de sal empleada, las condiciones higiénicas particulares en las que fue preparado, la calidad higiénico-sanitaria de la leche empleada y las características del animal del que se obtuvo el estómago, entre otras.

Los mayores recuentos de levaduras obtenidos en el agente coagulante en primavera e invierno podrían deberse a que las condiciones ambientales durante su secado pudieron haber propiciado el desarrollo levaduriforme: se requiere mayor tiempo de secado en invierno debido a las bajas temperaturas, lo que podría permitir un mayor desarrollo, y las temperaturas de primavera, menos cálidas que las del verano, podrían ser más próximas a las temperaturas óptimas de crecimiento de las levaduras. Sin embargo, no hay que dejar de tener en cuenta las demás variables.

Una de las causas por la que solo en otoño los recuentos de la cuajada superaron a los de las materias primas podría ser los mayores recuentos de levaduras en la leche que en el agente coagulante.

Los recuentos de levaduras en las muestras de quesos también fueron coincidentes con los informados por otros autores<sup>20,24</sup> en otras variedades de quesos.

Las levaduras y los mohos usualmente empleados como indicadores higiénico-sanitarios<sup>23</sup>, y por lo tanto,

considerados contaminantes, resultaron ser los grupos mayoritarios encontrados en los estudios previos realizados por Vasek<sup>28</sup> durante la elaboración de estos quesos.

Asimismo, los perfiles de crecimiento de cada estación durante la maduración fueron similares al comunicado por Vasek<sup>28</sup>, quien además informó mayores recuentos de levaduras que los hallados en este trabajo en las estaciones frías, pero similares a los valores hallados en las estaciones cálidas.

En la provincia de Corrientes no se diferencian marcadamente las 4 estaciones climáticas, sino que podemos agrupar o diferenciar 2 estaciones: una seca y fría, y otra húmeda, de elevadas temperaturas. Esto explicaría la similitud de los perfiles en las 2 estaciones frías y en las 2 cálidas y húmedas que se observó a partir del 15.º día de maduración de los quesos. Además, hay que tener en cuenta que la maduración de estos quesos no se realiza en una cámara a temperatura controlada, sino en un refrigerador doméstico, y por ello la temperatura ambiente podría tener influencia en la temperatura de maduración. Esto explicaría las elevadas velocidades de crecimiento observadas en verano.

Las condiciones de anaerobiosis que se desarrollan en el interior del queso con el avance de la maduración probablemente permitieron la proliferación continua de la biota levaduriforme; esta no se vio inhibida por los metabolitos producidos por las bacterias lácticas propias de la leche cruda ni por los del cultivo *starter* adicionado. Las levaduras podrían consumir metabolitos producidos por las bacterias lácticas, como el ácido láctico, lo que también favorecería su desarrollo y podría ser una de las causas del incremento del pH en los estadios finales de maduración informado por Vasek<sup>26</sup> en estos quesos. La presencia de levaduras en alto número podría alterar las características organolépticas del QAC; sin embargo, en este estudio no se observaron alteraciones durante ninguna de las elaboraciones. Por otro lado, si la presencia de levaduras beneficiara la proliferación de bacterias lácticas, podríamos decir que la microbiota levaduriforme también podría contribuir a la inocuidad de este alimento.

La distribución de especies de levaduras a lo largo de la maduración de los quesos no fue constante. El agente coagulante fue el que presentó mayor número de especies diferentes, esto podría deberse a la multiplicidad de variables ya mencionadas, que pueden contribuir a la microbiota de esta materia prima.

La presencia de determinadas especies de levaduras en materias primas y quesos en las etapas finales de la maduración, aparentemente ausentes en los estadios intermedios, podría estar relacionada con cantidades insuficientes como para lograr su aislamiento en los períodos intermedios; el número de microorganismos pertenecientes a estas especies podría incrementarse con el tiempo de maduración y permitir nuevamente su aislamiento por técnicas dependientes del cultivo en las muestras de quesos de 15 o 30 días de maduración.

*Candida blankii* fue la única especie presente en ambas materias primas (leche cruda y agente coagulante) y en todas las muestras de quesos a distintos períodos de maduración, la frecuencia de su aislamiento se incrementó con el tiempo de maduración. Esta especie de levadura fue aislada por Welthagen y Viljoen<sup>31</sup> en la superficie de equipos

empleados para la manufactura de queso Cheddar en la región de Cape Province, en Sudáfrica.

La especie *Debaryomyces vanriijiae*, aislada durante la elaboración casearia, no fue hallada al avanzar el tiempo de maduración. En cambio, *Debaryomyces polymorphus* se mantuvo con frecuencias variables hasta el final de la maduración. El aislamiento de escasos representantes de la especie *D. vanriijiae* de la superficie del equipamiento empleado en la elaboración de quesos fue también informado por otros autores<sup>29</sup>.

*Cryptococcus albidus* es una especie que desde hace tiempo se la reporta en productos lácteos como cremas<sup>13</sup> y leches provenientes de vacas afectadas por mastitis<sup>21</sup>. Sin embargo, en los QAC se la halló en porcentajes de aislamiento que no superaron el 11,1%, con una permanencia discontinua hasta los 15 días de maduración.

Por otra parte, *Candida tenuis* y *Rhodotorula acuta* solo se aislaron de leche, en los quesos estas especies estuvieron ausentes. Un hallazgo similar se detectó en relación con la especie *Candida aaseri*, solo aislada del agente coagulante. En referencia a los representantes del género *Rhodotorula*, normalmente son recuperados en bajo número. Su origen suele relacionarse con la contaminación aérea<sup>27</sup> y su ausencia en los quesos madurados se debe, probablemente, a su poca resistencia a las bajas actividades de agua ( $a_w$ ) y a su metabolismo estrictamente aerobio. Pereira-Dias et al.<sup>24</sup> hallaron resultados similares en otro tipo de queso, con aislamiento de cepas de este género solo de la cuajada.

Las especies *Stephanoascus ciferrii* y *Stephanoascus smithiae*, a pesar de no estar presentes en las materias primas básicas (leche y agente coagulante), fueron aisladas a partir de la cuajada y de muestras de quesos. El origen de estas especies podría ser la contaminación aérea del establecimiento elaborador, dada su ausencia en la leche y el agente coagulante.

Los predominios de levaduras observados en el QAC coinciden con los hallados en las materias primas que se emplean para su elaboración: el género *Candida* fue el más frecuente, seguido en orden de importancia por *Myxozyma* y *Debaryomyces*. Otros géneros como *Cryptococcus*, *Pichia* y *Stephanoascus* resultaron poco significativos.

Se infiere que el origen de casi todos los géneros hallados serían las materias primas empleadas:

- La leche cruda de vaca recién ordeñada o almacenada bajo refrigeración durante un tiempo máximo de 24 h.
- El agente coagulante artesanal, suero obtenido de leche cruda coagulada por acción del cuajo: cuarto estómago de ternero salado, en una proporción de una parte de sal cada 2 partes de tejido, y secado a temperatura ambiente.

La leche cruda y el agente coagulante difieren como nichos ecológicos, la flora de levaduras típica de cada uno de ellos constituiría un rasgo característico de estos.

Podríamos afirmar que cada materia prima aporta a los quesos una microbiota específica de levaduras, adaptada al nicho ecológico de la región y a las condiciones de cada medio en particular. Es necesario evaluar mayor número de aislamientos de cada materia prima a fin de poder aportar mayor información acerca de los orígenes de las especies halladas.

Al comparar los géneros y especies identificados en el QAC con los informados para leches y productos lácteos elaborados en otras regiones del país, se aprecian ciertas similitudes, particularmente en lo que se refiere a la elevada incidencia de los géneros *Debaryomyces* y *Candida* y a sus especies dominantes. También se observan semejanzas en cuanto a la presencia, menos significativa, de otros géneros como *Cryptococcus* y *Pichia*.

Las especies predominantes o únicas halladas en Corrientes resultaron similares a las encontradas en Tandil: *C. blankii* y *Myxozyma monticola*. En cambio, en Trelew, la presencia de *C. blankii* coincide como una de las especies dominantes, pero acompañada en iguales proporciones por *Candida famata*<sup>3,8</sup>.

Por otra parte, se observan diferencias notables, como la presencia destacada de representantes del género *Brettanomyces* en leche y productos lácteos elaborados en la cuenca lechera santafesina<sup>3,8</sup>, dado que no se halló ningún representante de este género durante la elaboración y la maduración del QAC.

Al realizar igual comparación con los resultados publicados para distintas variedades de quesos elaborados en Europa, se aprecia también una coincidencia respecto de la presencia significativa de los géneros *Candida* y *Debaryomyces* junto con la menor frecuencia de los géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Pichia*<sup>9,16,24</sup>. Sin embargo, la ausencia total de representantes de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, de alta prevalencia en los quesos europeos<sup>1,14,20,25</sup>, marca también una notable diferencia con el QAC. La presencia de otros géneros, como *Staphanoascus* y *Myxozyma*, no informada en publicaciones previas<sup>1,9,14,15,20,24</sup>, se suma a las disimilitudes.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Financiación

Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste por financiar la presente

investigación a través de los Proyectos de Investigación y por las becas otorgadas.

## Bibliografía

1. Alvarez-Martín P, Floreza AB, López-Díaz TM, Mayo B. Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *Int Dairy J.* 2007;17:961–7.
2. Baraggio NG. Estudios sobre la participación de levaduras en el proceso de maduración de quesos y su interacción con las bacterias lácticas de starters. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2001. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.
3. Baraggio NG, Carrasco M, Simonetta A. Aislamiento de levaduras a partir de leche y productos lácteos. Determinación de sus características tecnológicas de interés caseario. *Rev Argent Lactol.* 2007/08;25:20–31.
4. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and identification.* Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
5. Borelli BM, Ferreira EG, Lacerda ICA, Franco GR, Rosa CA. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World J Microbiol Biotechnol.* 2006;22:1115–9.
6. Capece A, Romano P. Pecorino di Filiano cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. *Int J Food Microbiol.* 2009;132:180–4.
7. Cardoso V M, Borelli BM, Lara CA, Soares M, Pataro C, Bodevan EC, Rosa CA. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Res Int.* 2015;69:331–40.
8. Carrasco M, Moragues L, Vignatti C, Scarinci H, Simonetta A. Characterization and technological aspects of yeasts isolated from raw milk and different types of cheeses produced in Argentina. *Aust J Dairy Technol.* 2006;61:21–5.
9. Corbo MR, Lanciotti R, Albenzio M, Sinigaglia M. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int J Food Microbiology.* 2001;69:147–52.
10. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina [consultado 18 Mar 2016]. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
11. Fadda ME, Mossa V, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int J Food Microbiol.* 2004;95:51–9.
12. Ferreira AD, Viljoen BC. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int J Food Microbiol.* 2003;86:131–40.
13. Fleet GH, Mian MA. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 1987;4:145–55.
14. Gkatzionis K, Yunita D, Linforth RST, Dickinson M, Dodd CER. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *Int J Food Microbiol.* 2014;177:109–11.
15. Godić Torkar K, Vengus A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control.* 2007;19:570–7.
16. Golić N, Čadež N, Terzić-Vidojević A, Šuranská H, Beganović J, Lozo J, Kos B, Šušković J, Raspor P, Topisirović L. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional White pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and low land regions of Croatia. *Int J Food Microbiol.* 2013;166:294–300.
17. International Standard FIL-IDF. 50 C: 1995. Milk and milk products. Guidance on sampling.
18. International Standard FIL-IDF. 122C:1996. Milk and milk products. Preparation of samples and dilutions for microbiological examination.

19. Kreger-van Rij NJW. *The yeast, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1984.
20. Laurenčík M, Sulo P, Sláviková E, Piecková E, Seman M, Ebringer L. The diversity of eukaryotic microbiota in the traditional Slovak sheep cheese Bryndza. *Int J Food Microbiol*. 2008;127:176–9.
21. Machota SV, Vicens MJP, de Simon MTC, Fernandez GS. Raw milk mycoflora. *Milchwissenschaft*. 1987;42:20–2.
22. Padilla B, Belloch C, López-Díez JJ, Flores M, Manzanares P. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses. *Int Dairy J*. 2013;35:122–9.
23. Passalacqua N, Cabrera J. Análisis microbiológico de alimentos. Metodología Analítica Oficial. Volumen III. Microorganismos indicadores [On line]. *ReNaLOA*; 2014. p. 75-127.
24. Pereira-Dias S, Potes ME, Marinho A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Characterization of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *Int J Food Microbiol*. 2000;60:55–63.
25. Seiler H, Busse M. The yeast of cheese brines. *Int J Food Microbiol*. 1990;11:289–304.
26. Suzzi G, Schirone R, Martuscelli M, Gatti M, Fornasari ME, Neviani E. Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Res*. 2003;3:159–66.
27. Tudor E, Board R. Food-spoilage yeasts. En: Rose A, Harrison J, editors. *The Yeasts*, 5. London: Academic Press; 1993. p. 435–508.
28. Vasek OM. Fermento autóctono para la elaboración de queso artesanal de Corrientes. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas 2003. Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste.
29. Viljoen BC. The ecological diversity of yeasts in dairy products. En: Jakobsen M, Narvhus J, Viljoen BC, editores. *Yeasts in the dairy industry: Positive and negative aspects*. Brussels, Belgium: Proceedings of the symposium organised by Group F47. FIL, IDF; 1998. p. 70–7.
30. Viljoen BC, Greyling T. Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *Int J Food Microbiol*. 1995;28:79–88.
31. Welthagen JJ, Viljoen BC. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiol*. 1999;16:63–73.