

DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA FÚNGICA DEL QUESO PAIPA FABRICADO EN PACHO, CUNDINAMARCA

DIVERSITY OF FUNGAL MICROBIOTA IN PAIPA CHEESE PRODUCED IN PACHO, CUNDINAMARCA

ALFREDO LÓPEZ MOLINELLO

Grupo de investigación Ingeniería de Alimentos. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
alopez@unisalle.edu.co

Fecha Recepción: 7 de septiembre de 2010

Fecha Aceptación: 25 de marzo de 2011

RESUMEN

Se investigó la diversidad de los hongos presentes en el queso Paipa, único queso típico madurado de Colombia y la leche utilizada para su preparación, del municipio de Pacho. Se muestrearon quesos de 1, 5 y 10 días de maduración. El recuento promedio de hongos filamentosos en estos quesos presentó un rango de 1,48 y 3,67 $\log_{10}$ ufc/g y las levaduras en 4,15 y 5,93 $\log_{10}$ ufc/g. En la muestra de leche los hongos filamentosos y levaduras estuvieron entre 1,84 y 1,95 $\log_{10}$ ufc/g y 3,3 y 4,96 $\log_{10}$ ufc/g, respectivamente. Dentro de los hongos identificados se encuentran: *Penicillium* el cual posee especies tanto benéficas como perjudiciales; el género *Aspergillus* donde se han reportado especies que son toxigénicas; *Fusarium*, *Phoma*, *Cladosporium* y *Botrytis* donde la mayoría, presentes en los quesos, son contaminantes y *Geotrichum* responsable de las características organolépticas en quesos madurados. Las levaduras determinadas en esta investigación fueron, *Trichosporum beigeli*, *Cryptococcus albidus*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, responsables de otorgar características organolépticas en este tipo de quesos; además se identificaron *Rhodotorula minuta* y *Rhodotorula rubra*, *Candida rugosa*, las cuales son generalmente contaminantes en el proceso de producción.

Palabras clave: identificación, hongos filamentosos, levaduras, maduración, queso artesanal.

ABSTRACT

The fungi diversity in Paipa cheese (the only typical mature cheese of Colombia) and the milk used in its preparation in the town of Pacho were studied. Samples of cheeses were taken on the first, fifth and tenth day of maturation. The mean count of filamentous fungi in these cheese was between 1.48 and 3.67 $\log_{10}$ cfu/g and between 4.15 and 5.93 $\log_{10}$ cfu/g for yeasts. In the milk sample, the filamentous fungi and yeasts were between 1.84 and 1.95 $\log_{10}$ cfu/g and 3.3 and 4.96 $\log_{10}$ cfu/g, respectively. Among the identified fungi, we found *Penicillium* (which has both beneficial and harmful species), *Aspergillus* (in which toxigenic species have been reported), *Fusarium*, *Phoma*, *Cladosporium* and *Botrytis* (where most species found in cheeses are contaminants), and *Geotrichum* (responsible for the organoleptic characteristics of matured cheeses). The yeasts identified in this research are: *Trichosporum beigeli*, *Cryptococcus albidus*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, all responsible for providing organoleptic characteristics in this type of cheese; *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra* y *Candida rugosa*, also identified in this study, are generally contaminants in the production process.

Keywords: identification, filamentous fungi, yeasts, ripening, artisanal cheese.

INTRODUCCIÓN

El sabor característico de aroma y textura de los diferentes quesos es el resultado de la presencia de microbiota natural, así como al debido proceso biotecnológico tradicional de fabricación [1]. La diversidad de las poblaciones microbianas que se han desarrollado en cada ambiente de fabricación de cada queso, en gran medida no han sido caracterizados [2]. Sin embargo se han realizado diferentes estudios para identificar los microorganismos de diversos tipos de quesos típicos [2, 3, 4, 5]. El queso Paipa es el único queso autóctono madurado que se produce en el país. Se elabora artesanalmente a partir de leche cruda y es originario de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca especialmente en los municipios de Pacho (latitud N 05°07.727) y Ubaté (latitud: 005° 18' 24" N) [6]. Debido a este tipo de preparación y que los tiempos de maduración de mínimo 30 días no son cumplidos, su calidad microbiológica durante y al final del proceso es deficiente [7]. Estas características podrían conllevar a un potencial riesgo para la salud del consumidor, además de problemas para la distribución y comercialización del producto, debido a que no cumple las normas microbiológicas adecuadas para este tipo de alimento, lo cual conllevaría a pérdidas económicas para los pequeños productores quienes en su mayoría utilizan estos procesos como sustento familiar. Asimismo, con el tiempo podría llevar a la desaparición de este queso típico. Una posible solución a este problema es aislar los microorganismos que intervienen en los procesos de fabricación y maduración del queso, pasteurizar la leche y adicionarlos posteriormente para obtener un producto con las mismas características organolépticas originales y una calidad microbiológica aceptable. Por esta razón Neira y Hernández, [8] aislaron y caracterizaron las bacterias lácticas presentes en el queso Paipa. Sin embargo, no son los únicos microorganismos implicados en los procesos de fabricación y maduración de los quesos, además de este tipo de bacterias, se encuentran varios géneros de hongos (filamentosos y levaduriformes) que actúan como microbiota secundaria y ayudan a dar las características organolépticas específicas a este tipo de quesos [5, 9]. Por lo anterior, en este trabajo se aisló e identificó la microbiota fúngica involucrada en el proceso de obtención de queso Paipa en el municipio de Pacho, con el fin de producir un cultivo iniciador que pueda ser utilizado

en un futuro, junto a las bacterias lácticas por los productores y que permita obtener un queso Paipa con las mismas características y una adecuada calidad microbiológica.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestreo

Entre el periodo de octubre del 2008 y abril del 2009, se recolectaron aleatoriamente 9 muestras de queso Paipa de uno, cinco y diez días de maduración, cada una de 500 g y una muestra de 1 litro de leche utilizada como materia prima, para la fabricación del queso de los dos principales productores, los cuales se encuentran en el Municipio de Pacho localizado en el departamento de Cundinamarca. Este posee una temperatura de 19°C y una altura promedio de 2,136 m.s.n.m. [10].

Procesamiento

Con base en la metodología descrita por Hayaloglu, [5] y Lopandic, [11] se tomaron 10g para las muestras de queso y 10 ml para las muestras de leche y se realizaron 4 diluciones seriadas del queso Paipa utilizando agua peptonada estéril. Se tomó 0.1 ml de la dilución 10^{-1} y 10^{-2} y se realizó la siembra en superficie en agar extracto de malta (Oxoid Ltd.) para el aislamiento de mohos y 0,1 ml de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en agar YGC (extracto de levadura Oxoid Ltd, Glucosa Oxoid, Cloranfenicol Merck) para el aislamiento de levaduras. Posteriormente se incubaron a 25 °C durante 7 días. Pasado este tiempo, se realizó el recuento del número de colonias de mohos y levaduras, y se reportó el número de colonias por gramo de muestra (ufc/g). Los conteos son presentados como el promedio del logaritmo en base 10 de ufc/g de cada una de las muestras analizadas.

Aislamiento

Después del periodo de incubación, los aislamientos obtenidos se subcultivarán en agar extracto de malta (Oxoid Ltd.), agar PDA (Merck) y agar arroz al 20% (agar agar Difco) para mohos y en agar YGC para levaduras utilizando las mismas condiciones del procesamiento en cuanto a tiempos y temperatura de incubación, hasta la obtención de cultivos puros [5, 11, 12]. Posteriormente se procedió a la observación

macroscópica de las colonias teniendo en cuenta color anverso, color reverso, textura y presencia de pigmento difusible. La identificación microscópica de las colonias que presentaban características diferentes, se realizó utilizando un montaje sobre portaobjetos con azul de lactofenol (Merck), para identificar las estructuras de los mohos en especial estructuras vegetativas: hifas (septadas, cenocíticas- demateaceas, hialinas) y estructuras de reproducción (esporas y conidias) según Samson [12]. Para la identificación macroscópica de las levaduras se observaron características propias de las colonias como la apariencia, textura, color, borde, tamaño, producción de pigmento. Posteriormente se realizó una identificación microscópica inicial de estos aislamientos utilizando coloración tinta china para observar posible presencia de cápsula.

Identificación bioquímica de levaduras

Luego de la identificación inicial, a las levaduras obtenidas se les realizó la identificación bioquímica usando dos kits basados en reacciones bioquímicas. El primero es el kit API 20 C AUX®(bioMérieux): la lectura de estas reacciones se realiza por comparación con los testigos de crecimiento y la identificación se obtiene con la ayuda del catálogo analítico o del software de identificación. La prueba se fundamenta por la presencia de turbidez. El segundo kit es el RAPID YEAST PLUS®(Remel): cuenta con 18 pocillos, su incubación se realiza por 4 horas a 30°C. La lectura de estas reacciones se obtiene con la ayuda del Catálogo Analítico o del software de identificación. La prueba se fundamenta por cambios colorimétricos utilizando dos reactivos específicos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los datos tomados fueron analizados estadísticamente usando el análisis de varianza (test de ANOVA). El nivel de significación establecido previamente fue de $p < 0,05$. Las medias fueron comparadas usando Test-t Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media log del recuento hongos filamentosos por gramo en el queso durante el proceso de maduración estuvo dentro de los límites de 1,48 y 3.67 $\log_{10}$ ufc/g, teniendo en cuenta que

los conteos más altos estuvieron en los quesos con mayor tiempo de maduración, como fue reportado también por Hayaloglu y Airbag [5] y Viljoen y col. [13]. En cuanto a los conteos en levaduras la media se manejó entre los límites de 4.15 y 5.99 $\log_{10}$ ufc/g. Las diferencias entre los recuentos obtenidos se deben posiblemente a los cambios climáticos que ocurren a través del año y que afectan la humedad ambiental [1]. El aumento en el recuento de hongos filamentosos y levaduras a medida que aumenta el periodo de maduración también ha sido descrito para diferentes quesos típicos de otros países como el Camembert y Brie [13]. En las Figuras 1, 2, 3, 4 y 5 se observan algunos de los géneros de hongos filamentosos identificados en los análisis macroscópicos y microscópicos como: *Penicillium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Botrytis*, *Geotrichum* a partir de las muestras de leche y queso. Además se identificaron especies de los géneros *Aspergillus* y *Cladosporium* dentro de este grupo algunas especies han sido reportadas como de hongos benéficos debido a su importancia en la maduración de un amplio rango de quesos, ya que durante los primeros días, crecen sobre la superficie y la desacidifican oxidando el lactato y actuando en procesos proteolíticos; además poseen un complejo sistema de enzimas que contribuyen con la textura, color y sabor [9]. Sin embargo existen otras especies que han sido descritas como contaminantes y patógenos.

En el caso del género *Penicillium*, se han descrito algunas especies como contaminantes de alimentos, como es el caso de *P. commune* que ha sido reportado como agente deteriorante en el queso Cheddar y en los quesos Italianos Goats y Sheep's y la especie *P. verrucosum* la cual se ha encontrado como un contaminante visible de quesos en los sitios de comercialización [5]. Sin embargo varias especies de este género se destacan por crecer en los quesos madurados, tal es el caso de *P. roqueforti*, el cual se ha sugerido que produce metilcetonas que son inhibitorias para el crecimiento en exceso de otros tipos de mohos e influyen en sus características organolépticas [14]. Las especies del género *Aspergillus* se han descrito por lo general como indeseables ya que pueden influenciar en las características organolépticas, además de producir micotoxinas y representar un potencial riesgo para la salud [15].

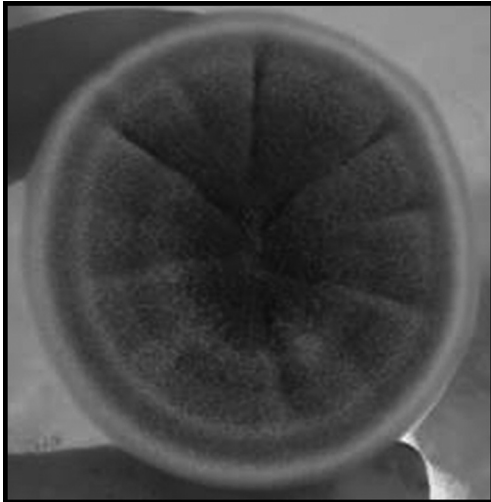
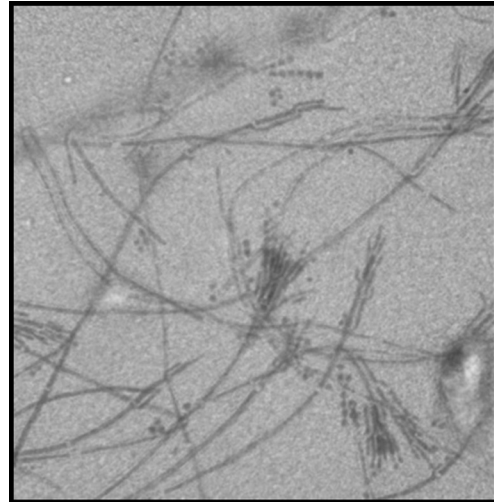


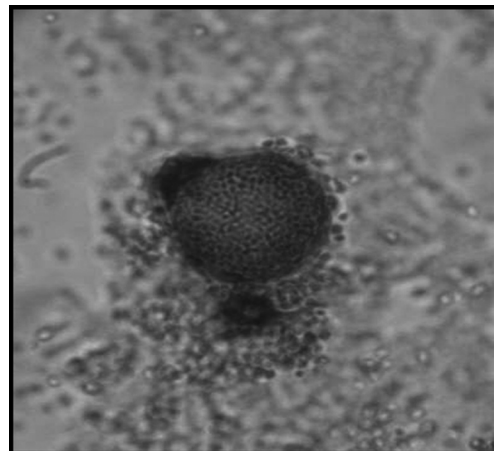
Figura 1. Descripción macroscópica de *Penicillium* spp



Descripción microscópica de *Penicillium* spp



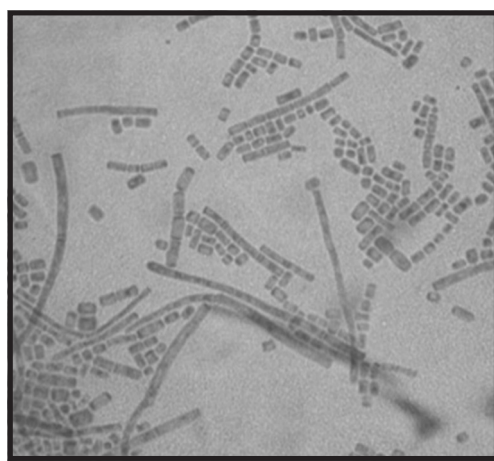
Figura 2. Descripción macroscópica de *Phoma* spp



Descripción microscópica de *Phoma* spp



Figura 3. Descripción macroscópica de *Geotrichum* spp



Descripción microscópica de *Geotrichum* spp

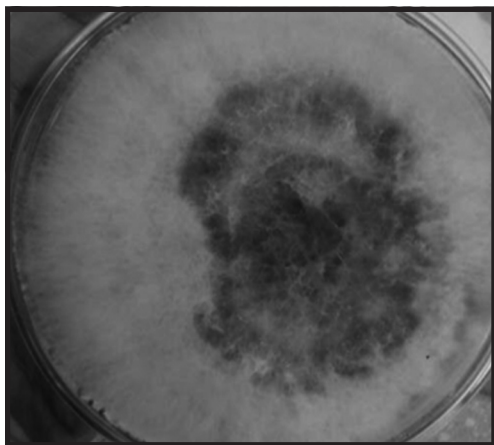
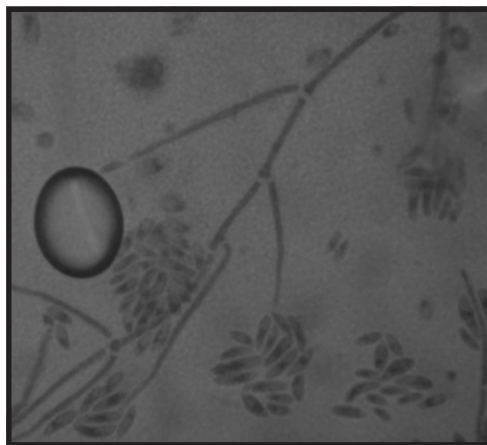


Figura 4. Descripción macroscópica de *Fusarium spp*



Descripción microscópica de *Fusarium spp*

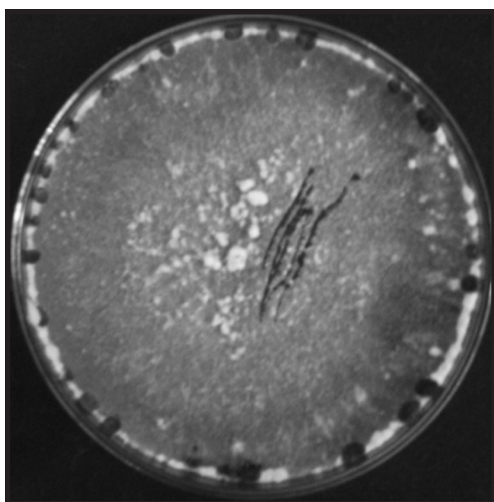
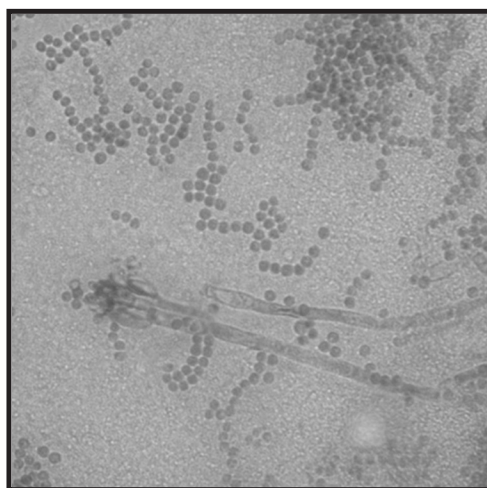


Figura 5: Descripción macroscópica de *Botrytis spp*



Descripción microscópica de *Botrytis spp*

En el género *Fusarium* se encuentra la especie *F. moniliforme*, la cuál ha sido reportada en la superficie de los quesos, sugiriendo un alto riesgo de infección cuando se consumen frescos y una potencial producción de metabolitos tóxicos cuando se los estaciona [16], aunque el mismo autor reporta sobre quesos artesanales de características similares que si bien estuvieran presentes especies potencialmente toxigénicas de este género, no habría riesgo alguno si los recuentos son bajos. El género *Phoma* se ha encontrado en este estudio, aunque en baja proporción. Según diferentes reportes de investigación, se muestran en muy poca cantidad y se cree que son contaminantes y que no participan en los procesos de maduración de este tipo de quesos [4, 5, 17, 18], como en el caso de

algunas especies que pueden ser toxigénicas como *P. exigua* y *P. sorghina* produciendo la micotoxina ácido tenuazónico y *P. herbarum* elaborando citocalasinas [19]. En el género *Cladosporium* las especies que más predominan son *C. cladosporioides* y *C. herbarum*. Se han aislado con frecuencia en muestras de queso, aunque con un predominio alto en ambientes de la fábrica y de las cavas de maduración. Se presentan en la superficie del queso produciendo unas manchas que posiblemente contribuyen con la apariencia externa del queso [20]. Vale aclarar que según las publicaciones de Samson [12] y CAST [21] no se han descrito propiedades toxigénicas en quesos de este género. El género *Botrytis* ha sido reportado muy pocas veces en queso, sin embargo la especie

B. cinérea fue detectada, en baja cantidad, como contaminante en ambientes de fábricas queseras en Noruega [18]. Finalmente el género *Geotrichum* el cual posee una característica particular ya que tiene propiedades tanto de mohos como de levaduras [9]. La especie más importante en quesos madurados es *G. candidum* quien afecta la bioquímica del queso durante la maduración. La liberación de lipasas y proteasas dentro de la matriz del queso, reduce la amargura, contribuye con el aroma del queso, neutraliza la acidez de la cuajada producida por las bacterias ácido-lácticas y estimula el crecimiento de bacterias superficiales como *Brevibacterium* spp [5]. La presencia de *G. candidum* en la leche utilizada como materia prima en la fabricación de queso madurado ha sido esencial para el desarrollo de la apariencia y el aroma [22]. Cabe destacar que algunos hongos no se pudieron identificar ya que solo exhibieron micelio estéril o con presencia de clamidosporas (*Agonomycetes*).

Análisis macroscópicos permitieron obtener 13 cepas de levaduras, las cuales fueron evaluadas por reacciones bioquímicas. No obstante sólo se pudieron identificar: *Candida rugosa*, *Trichosporum beigeli*, *Cryptococcus albidus*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Rhodotorula minuta* y *Rhodotorula rubra*. Los demás aislamientos posiblemente corresponden a un género y especie que no posee la batería de las pruebas bioquímicas. Estos podrían corresponder a géneros muy importantes que se han reportado en diferentes investigaciones como levaduras de gran valía en la maduración de los quesos. Entre ellas se podrían encontrar: *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* [9] *Pichia*, *Zygosaccharomyces* y *Torulaspora* [13].

En cuanto a las levaduras encontradas estas también han sido reportadas como dominantes en quesos madurados [13]. Estos organismos muestran una capacidad metabólica (incluyendo actividades proteolíticas y lipolíticas) las cuales juegan un papel substancial en el desarrollo de aromas y sabores en algunas cepas agradables [9], sin embargo también han sido reportadas como especies contaminantes presentes en el ambiente y que llegan a los quesos durante su producción y maduración [13]. Las especies de *Rhodotorula* por lo general son reportadas como fuente de origen de contaminación a partir del

ambiente tanto del cuarto de producción como de maduración al igual que contaminante natural [13]. Según Suzzi y col [23] se evidenció que la especie *R. mucilaginosa* junto a la levadura *C. rugosa* producen aminos biogénicos, sustancias provenientes de la diseminación de proteínas y que pueden causar intoxicaciones químicas.

CONCLUSIONES

Los géneros de hongos identificados en este trabajo también han sido reportados para otros tipos de queso madurados como responsables de otorgar sus características organolépticas.

Sin embargo, también se presentan géneros, como el caso de *Penicillium* y *Aspergillus* que poseen especies que podrían llegar a ser contaminantes y convertirse en un problema de salud pública. Es importante nombrar que los aislamientos que no pudieron ser determinados, podrían ser hongos que solo se presentan en la elaboración del queso Paipa. La población de hongos en la leche no fue significativa con respecto a las encontradas en el queso, motivo por el cual se puede pensar que la presencia de la mayoría de microorganismos encontrados se debe a condiciones ambientales, o también por inadecuadas prácticas de manufactura durante su procesamiento luego de cuajar la leche para la elaboración del queso. Los resultados obtenidos en la identificación de las levaduras muestran una vez más la importancia de las pruebas morfológicas y sexuales con el fin de llevar a cabo una identificación fiable. A pesar de que se realizó un buen filtro al tener una gran cantidad de hongos identificados en el grado de género, se continuará con la identificación molecular de los todos los aislamientos para llegar a establecer las especies, pudiendo eliminar los hongos patógenos y contaminantes y utilizar los benéficos para la posible elaboración de un cultivo iniciador que contribuya a la estandarización del proceso de obtención de un queso Paipa inocuo y de calidad.

REFERENCIAS

- [1] 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. of Food Microbiol., 127, 2008, 176–179.

- [2] Marcellino, N; Beuvier, E; Grappin, R; Guéguen, M; Benson, D.R. "*Diversity of Geotrichum candidum strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France*". Applied and Environmental Microbiology, 67, 2001, 4752-4759
- [3] Calleja, Alonso. "*Changes in the microflora of Valdeteja raw Goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening*". Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 35, 2000, 222-232.
- [4] Finne C; Skaar, I. "*Mould growth on the Norwegian semi – hard cheeses Norvegia and Jarlsberg*". International Journal of food Microbiology, 62, 2000, 133-137.
- [5] Hayaloglu A; Airbag S. "*Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese*". International Journal of Food Microbiology, 115, 2007, 376-380.
- [6] Banco ganadero e instituto de ciencia y tecnología de alimentos. Guía para producción de quesos colombianos. Colombia: Banco Ganadero,. 1994, 7-11, 110-113.
- [7] Neira, E; Silvestri, J. "*Análisis del ordeño y de la calidad higiénica de la leche utilizada en la fabricación del queso Paipa en el municipio Paipa (Boyacá), Colombia*". Revista de investigación Universidad La Salle, Julio-Diciembre, 6, 2002, 163-170.
- [8] Neira, E; Hernández, J. "Aislamiento, identificación, conservación y caracterización molecular de bacterias ácido lácticas presentes en el queso Paipa". XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Quito, Ecuador. Octubre de 2008.
- [9] Beresford, T; Fitzsimons, N; Brennan, N; Cogan, T. "*Recent advances in cheese microbiology*". International Dairy Journal, 11, 2001, 259-274.
- [10] Sitio oficial de Pacho Cundinamarca <http://www.pacho-cundinamarca.gov.co/index.shtml>. Fecha de consulta: Julio de 2010.
- [11] Lopandic, K; Zaeger, S; Bánzky, L; Eliskases-Lechner, F; Prillinger, H. "Identification of yeast associated with milk products using tradicional and molecular techniques". Food Microbiology, 23, 2006, 341-350.
- [12] Samson R; Hoekstra E. *Introduction to food and airborne fungi*. Septima edición. Editorial CBS. Holanda. 2004, 389.
- [13] Viljoen, B; Khoury, A; Hattingh, A. "*Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses*". Food Research International, 36, 2003, 275-283.
- [14] Vásquez B; Fente C; Franco C; Cepeda A. "*Penicillium y Aspergillus spp. En queserías de la zona de Arzúa (Galicia, España)*". Ciencia y Tecnología Alimentaria, 3, 2001, 96-101.
- [15] Torkar K; Vengust A. "*The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia*". Food Control., 19, 2008, 570-577.
- [16] Vasek, O; Cabrera R; Coronel G; Giori G; Vusco A. "*Análisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de corrientes (Argentina)*". Facena, 20. 2004, 13-22.
- [17] Godic K; Vengus T. "*The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia*". Food Control, 19, 2008, 570-577.
- [18] Finne C; Skaar I; Brendehaug J. "*Mould contamination in production of semi-hard cheese*". International Journal of Food Microbiology, 93, 2004, 41- 49.
- [19] Carrillo, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional De Salta. Cuidad Argentina. 2003.
- [20] Fente-Sampayo C; Vazquez B; Rodríguez J; Franco C; Quinto E; Cepeda A. "*Microflora predominante en las queserías de arzúa (España)*". Cienc. Tecnol.Aliment, 3, 2002, 271-276.
- [21] CAST. "Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Council for Agricultural Science and Technology", Ames, Iowa, USA. 2003

- [22]Bockelmann W; Willems K; Neve K; Heller H.
“*Cultures for the ripening -of smear cheeses*”.
International Dairy Journal, 15, 2005, 719-732.
- [23]Suzzi G; Schirone M; Martuscelli M;
Gatti M; Fornasari M. E.; Neviani E.
“*Yeasts associated whit Manteca*”. FEMS
Yeast Research. 3, 2003, 159-166