

**LA MICROBIOTA BACTERIANA ÚNICA DEL QUESO COTIJA Y SU  
POTENCIAL METABÓLICO, REVELADOS MEDIANTE METAGENÓMICA**

## I. Resumen

El queso Cotija, originario de la sierra limítrofe de Jalisco y Michoacán, se elabora artesanalmente, sin la adición de cultivos iniciadores ni la utilización de procesos térmicos. Se somete a un proceso de maduración que dura al menos 3 meses y que da como resultado un queso con características sensoriales distintivas y microbiológicamente inocuo, lo que se asocia con la actividad bioquímica microbiana durante este periodo. Experimentos dependientes e independientes de cultivo previos, indicaron que la diversidad bacteriana en el alimento había sido subestimada. Las tecnologías de secuenciación masiva de ADN y el análisis bioinformático de los resultados metagenómicos permiten conocer la diversidad de especies y el potencial metabólico de cualquier consorcio microbiano. El objetivo de este trabajo fue explorar la diversidad bacteriana en una muestra representativa de queso Cotija artesanal madurado, a través del análisis de información metagenómica, enfocado a elucidar su potencial metabólico en relación con la producción de compuestos asociados al perfil sensorial del alimento y la posible producción de bacteriocinas. El análisis de diversidad a través del gen ribosomal 16S permitió identificar a los géneros *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc* como dominantes y a más de 500 géneros no dominantes, pertenecientes a 31 *Phyla* de bacterias y *Archaeas*. No se encontraron genes de bacterias patógenas como *L. monocytogenes*, *Brucella* spp. o *Salmonella* spp. El ensamble de las secuencias permitió la reconstrucción de los genomas de las especies dominantes: *L. plantarum*, *W. paramesenteroides* y *L. mesenteroides*. Por medio de la anotación funcional de genes, se identificó la capacidad del consorcio para sintetizar una amplia gama de compuestos de aroma, productos del metabolismo de ácidos grasos libres y aminoácidos de cadena ramificada, principalmente. Se encontraron 52 genes codificantes para bacteriocinas, principalmente de la clase IIa, que se han descrito como antilisteriales. La utilización de un análisis metagenómico permitió realizar una caracterización taxonómica y funcional del microbioma del queso Cotija a un nivel altamente detallado que ayuda a explicar sus características sensoriales y de inocuidad.

## **II. Importancia científica de los nuevos hallazgos y sus aplicaciones**

El queso Cotija tiene importancia cultural y económica en una región de tradición lechera del país. Últimamente se cuestionó su inocuidad microbiológica, por elaborarse con leche cruda, lo que puso en peligro la continuidad en su producción. Nos interesó abordar el problema desde un enfoque con alto poder de resolución, que nos permitiera conocer la identidad de las bacterias que forman parte de su microbiota. La hipótesis consistió en que el potencial metabólico de la comunidad microbiana, no sólo contribuye al perfil sensorial del producto, sino a la inocuidad del mismo. Una alternativa novedosa fue la secuenciación masiva del ADN del consorcio bacteriano del queso, utilizando el estado del arte de la tecnología y herramientas bioinformáticas, para averiguar aspectos taxonómicos y funcionales. Se desarrolló una estrategia de análisis bioinformático, que ya hicimos pública en un artículo de alcance internacional, que al hacer uso de *software* libre permitiría la reproducción del análisis o bien su aplicación a otro tipo de alimentos fermentados para obtener alcances similares. Vale la pena mencionar que existen muy pocos estudios que apliquen el enfoque metagenómico al análisis microbiológico y bioquímico de alimentos. Nuestros resultados apoyan la inocuidad microbiológica del queso artesanal madurado, por la ausencia de material genético proveniente de bacterias patógenas, aun cuando el queso está elaborado con leche cruda. Se demostró la complejidad del consorcio bacteriano del queso y la presencia de una capacidad metabólica que explica, parcialmente, el perfil sensorial del producto. De aquí la importancia de mantener su elaboración artesanal, las prácticas higiénicas de elaboración y lo infructuoso que sería diseñar un cultivo iniciador. Por otra parte, mediante la anotación de genes, encontramos que en el consorcio hay un repertorio de bacteriocinas, que podrían ser de interés biotecnológico, y el alto número de genes de inmunidad a bacteriocinas detectado sugiere una estrategia de supervivencia bacteriana basada en su conservación. Finalmente, los hallazgos sobre la diversidad taxonómica del microbioma podrían apoyar a la obtención de la Denominación de Origen del queso Cotija, por su particularidad.

### III. Introducción y antecedentes

Desde la época colonial, el queso Cotija se ha producido en algunos municipios de los estados de Jalisco y Michoacán, siendo de gran importancia comercial en esta región del país. Ha ganado fama debido a que es reconocido internacionalmente por su sabor y calidad, y se produce por un poco más de 300 familias que continúan su elaboración artesanal. Recientemente, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial les otorgó la Marca Colectiva “Queso Cotija Región de Origen”. La materia prima principal en la elaboración de este queso además del cuajo y la sal de mar, es la leche de vaca, misma que no se pasteuriza, por lo que es la fuente inicial de microorganismos en el queso. El proceso de elaboración implica la manipulación directa de los ingredientes en pasos clave como el quebrado, salado y moldeado de la cuajada. Esto enriquece y modifica la carga microbiana del alimento antes de la maduración, siendo fuente de bacterias coliformes, las cuales disminuyen hasta desaparecer a los 60 días de maduración (Bravo, 2008). En nuestro grupo de trabajo, se han identificado en muestras de queso con un tiempo de maduración de al menos 3 meses, cepas con actividades proteolítica, lipolítica y con capacidad antimicrobiana, de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*, respectivamente (Hernández, 2007; García, 2006 y 2011; Olvera, 2013). Por métodos moleculares independientes de cultivo, se calculó que ninguno de dichos géneros era dominante y que juntos no representaban más del 11% de la abundancia total relativa (Escobar, 2012). Adicionalmente, se tenían identificados otros 6 géneros de bacterias como parte del consorcio, aunque poco se sabía de su abundancia y capacidades metabólicas. Entonces surgió el interés de conocer la identidad del resto de la población bacteriana y su papel en el proceso de maduración (fermentación) del queso. Es ampliamente reconocida la importancia de la composición de los consorcios microbianos asociados a una matriz alimentaria, ya que influye en la calidad y singularidad del producto final. Esto es claro en alimentos fermentados de manera tradicional, donde la biodiversidad microbiana proviene de la materia prima y su desarrollo depende de las condiciones ambientales de fermentación.

#### **IV. Justificación**

Los alimentos fermentados en general, y los quesos elaborados artesanalmente en particular, constituyen un reservorio de microorganismos, algunos de los cuales no siempre son cultivables, con actividades metabólicas interesantes desde el punto de vista alimentario. El análisis bioinformático del metagenoma de una muestra representativa de queso Cotija de tres meses de maduración, permitirá la caracterización de su consorcio bacteriano, con una alta sensibilidad, así como la detección de funciones metabólicas relacionadas con la producción de compuestos de olor y sabor y otras relacionadas con su inocuidad.

En la actualidad existen pocos reportes de análisis metagenómicos en alimentos de fermentación natural y muy pocos sobre quesos madurados, por lo que los resultados que se obtengan serán una aportación relevante en el campo de la biotecnología y microbiología de alimentos.

#### **V. Objetivos del trabajo**

- Describir la riqueza y abundancia de especies bacterianas con base en marcadores filogenéticos como el gen ribosomal 16S y otros marcadores de copia única.
- Determinar la inocuidad del queso mediante la búsqueda de bacterias patógenas a nivel de ADN.
- Llevar a cabo la descripción del perfil metabólico de la comunidad mediante la anotación funcional de marcos de lectura abiertos, enfocándose en la búsqueda de genes relacionados con la producción de compuestos de olor y sabor, así como de genes codificantes para bacteriocinas.
- Reconstruir los genomas de las especies dominantes.

## VI. Metodología

### *Muestreo de queso Cotija Región de Origen y tratamiento de la muestra*

Se utilizaron 25 quesos Cotija “Región de Origen”, elaborados por diferentes productores que cumplieran con la NMX-F-735-COFOCALEC, 2011. Se pesaron 100 g de cada uno y se molieron para obtener un tamaño de partícula de aprox. 2 mm. Posteriormente, se hizo una mezcla homogénea con los 100 g ya molidos de las 25 unidades de análisis. Para la extracción de paquete celular bacteriano se pesaron 15 g de la mezcla de quesos en la campana de flujo laminar y se procedió de acuerdo a Zúñiga (2009). Cada paquete celular se resuspendió en 1 mL de buffer para DNasa I (100 mM Tris pH 7.5, 25 mM de MgCl<sub>2</sub> y 5 mM de CaCl<sub>2</sub>) y se adicionó 1 U de Dnasa I (Thermo Scientific) para eliminar el ADN contaminante de vaca (Willner et al., 2009). Las mezclas se incubaron durante 10 min en agitación a 300 rpm y la DNasa I se inactivó a 75°C por 10 min. Los tubos se centrifugaron a 18,200 X g durante 10 min y se congelaron a -20°C por una noche. Los pellets se resuspendieron en 450 µL de buffer TE y se adicionaron 50 µL de lisozima (Sigma-Aldrich) (10 mg/mL en buffer 100 mM Tris-HCl y 50 mM de EDTA, pH 8.0); y 10 µL de mutanolisina (Sigma-Aldrich) (1 U/µL en buffer TE). Las muestras se agitaban en vórtex por 1 min y se incubaron durante 1 h a 37°C en agitación a 200 rpm. A cada tubo se adicionó RNasa A de páncreas bovino (Thermo Scientific) (0.6 µg/mL) y se incubó durante 30 min a 37°C. Finalmente, se adicionaron 50 µL de proteinasa K (Sigma-Aldrich) (10 mg/mL en buffer 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) y los tubos se incubaron durante 50 min a 50°C y luego por 10 min a 65°C (Ampe et al., 1999; Yuan et al., 2012). La mezcla se dejó enfriar hasta 37°C y se adicionaron 50 µL de SDS al 10% p/v y se incubó a 37°C por 40 min más. Una vez a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de NaCl 6M, mezclando por inversión.

### *Extracción de ADN metagenómico y secuenciación masiva*

El ADN fue extraído y purificado por el método fenol-cloroformo-isoamílico (Ausubel et al., 1995) con dos pasos más de lavado con cloroformo y un paso extra de purificación con el kit QIAquick de Qiagen (Qiagen Inc.). Para minimizar el sesgo del análisis de diversidad debido al proceso de extracción de ADN, se hicieron 5 extracciones independientes, mismas que se mezclaron posteriormente

para la construcción de una sola biblioteca en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (USMB) del Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM en Cuernavaca, Mor., con el kit TruSeq v2 (Illumina Inc.). La secuenciación se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica y Diversidad en Irapuato, Gto., en el equipo HiSeq2000 con configuración de lecturas pareadas de 100 pares de bases cada una.

#### *Análisis bioinformático de secuencias*

El control de calidad de las secuencias fue realizado con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) y para remover las secuencias provenientes del ADN bovino, las lecturas se mapearon contra el genoma de *Bos taurus* con BWA v0.7.9 (Li y Durbin, 2009). Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos publica SRA del NCBI con el identificador de Bioproyecto SAMN03771674.

#### *Anotación taxonómica*

La asignación de identidad taxonómica y el cálculo de abundancias se llevó a cabo mediante dos programas, de acceso libre, sobre las lecturas sin ensamblar. El primero es MOCAT v1.3 (Kultima et al., 2012), que filtra las lecturas por calidad para posteriormente hacer la búsqueda de genes marcadores de copia única, con un valor de corte de 97% de identidad contra la base de datos mOTU v1. La asignación taxonómica a nivel de especie, se obtiene por alineamiento contra la base de datos RefMG.

La segunda herramienta es Parallel-Meta v2.4 (Su et al., 2014), que predice secuencias ribosomales extrapolando modelos ocultos de Markov (HMM) construidos a partir de referencias e interrogando con el algoritmo BLAST a alguna de las bases de datos de genes ribosomales, RDP (Cole et al., 2014) en nuestro caso, con un valor esperado de corte (valor-E) de  $1e^{-15}$ . A partir de las tablas de anotación taxonómica se calcularon los estimadores de diversidad con el paquete Phyloseq v1.12.2 (McMurdie y Holmes, 2013), disponible por Bioconductor, de R.

#### *Anotación funcional*

El análisis funcional se realizó con varios pasos independientes. El primero fue el ensamble de las lecturas con el *software* para metagenomas IDBA-UD v1.1.1

(Peng et al., 2012). Para obtener una estadística sobre el número de lecturas utilizadas en el ensamble, éstas se mapearon sobre los *contigs* usando BWA v0.7.9. La predicción de genes codificantes se realizó sobre el ensamble con el programa MetaGeneMark v2.1.0 (Zhu et al., 2010). Las secuencias en aminoácidos se anotaron por homología contra la base de datos de UniProtKB/Swiss-Prot con umbral esperado de 1e-05 primero con UBLAST (Edgar, 2010) y aquellas sin ninguna correspondencia se anotaron con blastp de BLAST v2.2.28+ (Camacho et al., 2009). A la par, se generaron resultados de búsquedas de dominios conservados mediante el algoritmo hmmerScan del paquete HMMER v3.1b1 (Eddy, 2011) contra la base de datos Pfam-A (Finn et al., 2014). Los resultados se integraron adaptando el software Trinotate v2.0.1 (Grabherr et al., 2011) y la reconstrucción de rutas metabólicas se realizó con GhostKOALA v2.0 (Kanehisa et al., 2016).

A partir del resultado de la anotación por homología, y de la reconstrucción de rutas metabólicas, se realizó la búsqueda de funciones de interés relacionadas con la producción de compuestos de olor y sabor; mientras que para la identificación de bacteriocinas, se extrajeron los identificadores de Pfam presentes en las proteínas estructurales así como en otras relacionadas con su síntesis, procesamiento y sistema de inmunidad, y dicho escrutinio se complementó con los resultados generados por BAGEL3 (van Heel et al., 2013).

#### *Reconstrucción de genomas*

Las referencias que se usaron en la reconstrucción de genomas fueron las siguientes: *L. plantarum* WCFS1, *L. mesenteroides* ATCC 8293 y *W. paramesenteroides* ATCC 33313, con números de acceso en el NCBI NC\_004567.2, NC\_008531.1 y NZ\_ACKU00000000.1, respectivamente. Para orientar a los *contigs* sobre dichas referencias se utilizó el programa ABACAS v1.3.1 (Assefa et al., 2009) y para el mapeo de las lecturas se usó BWA v0.7.9.



## VII. Resultados y discusión

### Control de calidad de la secuenciación masiva

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron un total de 226,458,970 lecturas pareadas, con longitud promedio de 100 bp. Éstas mostraron un promedio de calidad (score Phred) >28, que equivale a una probabilidad de error promedio por base 0.001%, lo que indica una alta calidad en el proceso de secuenciación. Alrededor de un 5% de las lecturas mapearon sobre el genoma de *Bos taurus*, es decir, que el tratamiento con Dnasa I antes de la ruptura de las células en la extracción de ADN fue adecuado. Dichas lecturas se eliminaron del análisis.

### Anotación taxonómica

La anotación de las secuencias metagenómicas con genes marcadores de copia única permitió identificar una riqueza de 86 especies diferentes de 45 géneros bacterianos, la mayoría de ellas *Firmicutes* (99.8%) y algunas de los *Phyla Actinobacteria* (~0.1%) y *Proteobacteria* (~0.01%). Se consideró como dominantes a todos aquellos cuya abundancia fuera >10%; subdominantes si estaba entre el 1 y el 10% y pobremente representados a los que tuvieron <1% de abundancia total relativa. La población dominante estuvo compuesta por 3 géneros, la subdominante por 4 géneros (Tabla 1 y nodos terminales en color verde de la Figura 1), y 38 en la fracción no dominante. En contraste a lo obtenido en el análisis por genes marcadores de copia única, la anotación con el gen ribosomal 16S detectó una riqueza de 574 géneros bacterianos, un orden de magnitud más que con el enfoque anterior, de los cuáles el 98% fueron *Firmicutes* y el resto fueron identificados en los *Phyla Actinobacteria*, *Proteobacteria* de todas las clases, *Acidobacteria* y *Bacteroidetes*. Adicionalmente, se identificaron algunos géneros dentro del dominio *Archaea* (Figura 1). Cabe mencionar que por este enfoque sólo se llega a la resolución de género, mientras que por marcadores de copia única se puede elucidar la especie. Ambos enfoques de anotación taxonómica arrojan proporciones congruentes y son complementarios entre sí, sobre todo para las poblaciones dominantes.

Tabla 1. Anotación taxonómica de la fracción del microbioma dominante y subdominante.

Abundancia	Marcadores de copia única		Gen 16S ADNr Género <sup>a</sup>	
	Género <sup>a</sup>	Especie <sup>b</sup>		
Dominantes	<i>Lactobacillus</i> (33.4)	<i>plantarum</i> (95.9)	<i>Lactobacillus</i> spp. (20.7)	
		<i>farciminis</i> (2.0)		
		<i>brevis</i> (0.7)		
		<i>rhamnosus</i> (0.7)		
		<i>casei</i> (0.5)		
		<i>paracasei</i> (0.05)		
		<i>coryniformis</i> (0.01)		
		<i>buchneri</i> (<0.01)		
		<i>paramesenteroides</i> (99.98)		<i>Weissella</i> spp. (29.6)
		<i>cibaria</i> (0.02)		
<i>Leuconostoc</i> (21.9)	<i>mesenteroides</i> (99.9)	<i>Leuconostoc</i> spp. (11.3)		
	<i>citreum</i> (0.03)			
	<i>kimchii</i> (<0.01)			
	sp. C2 (<0.01)			
	<i>viridans</i> (100)			
Subdominantes	<i>Aerococcus</i> (8.3)	<i>faecium</i> (51.0)	<i>Aerococcus</i> spp. (8.9)	
		<i>italicus</i> (29.7)		
	<i>Enterococcus</i> (6.3)	<i>faecalis</i> (16.8)	<i>Enterococcus</i> spp. (3.4)	
		<i>casseliflavus</i> (1.5)		
		<i>gallinarum</i> (0.7)		
		sp. 7L76 (0.3)		
		<i>garvieae</i> (71.2)		<i>Lactococcus</i> spp. (2.5)
		<i>lactis</i> (28.8)		
		<i>Staphylococcus</i> (1.1)		<i>aureus</i> (84.9)
	<i>saprophyticus</i> (13.7)			
	<i>carnosus</i> (0.7)			
	<i>epidermidis</i> (0.5)			
	<i>haemolyticus</i> (0.1)			
	<i>hominis</i> (0.05)			
	<i>lugdunensis</i> (0.01)			
			<i>Bavariicoccus</i> spp. (2.2)	
			<i>Marinilactibacillus</i> spp. (2.2)	
			<i>Pediococcus</i> spp. (2.0)	
		<i>Bacillus</i> spp. (1.9)		
	<i>Fructobacillus</i> spp. (1.4)			
	<i>Alkalibacterium</i> spp. (1.4)			
	<i>Carnobacterium</i> spp. (1.0)			

<sup>a</sup> En paréntesis la abundancia relativa de cada género con respecto a la abundancia total.

<sup>b</sup> En paréntesis la abundancia relativa con respecto al 100% de su género respectivo.



Figura 1. Cladograma de la anotación taxonómica del gen ribosomal 16S. Clados resaltados en nodos terminales: rosa, halófilas; azul, coliformes y verde aquellos géneros que representan >1% de abundancia total relativa. Figura generada con GraPhlAn v0.9.7 (Asnicar et al., 2015).

De acuerdo a la anotación taxonómica obtenida con el marcador 16S ADN<sub>r</sub>, se calcularon los índices de diversidad que permiten hacer una evaluación de la complejidad de la comunidad bacteriana y del esfuerzo de muestreo (Tabla 2). Los estimadores no paramétricos Chao1 y ACE conceptualizan la diversidad como riqueza total de especies. Ambos estimadores indican un número máximo de taxa muy cercano al observado (~600), es decir que la profundidad con la que se llevó a cabo la secuenciación del metagenoma permitió detectar a la mayoría de los miembros del consorcio.

Tabla 2. Estimadores de diversidad calculados para la comunidad bacteriana descrita con el gen ribosomal 16S

Riqueza observada	Chao1	ACE	Simpson (1-D)	Shannon (H)
598	629.63	660.48	0.84	2.52

Por otro lado, los índices de Simpson (1-D) y Shannon (H) permiten evaluar numéricamente qué tan diversa es una muestra. Para la comunidad bacteriana del queso Cotija, el índice de Simpson, con valor  $>0.5$ , indica que se trata de una comunidad con diversidad de baja a media; mientras que el índice de Shannon, de 2.52, indica que se trata de una muestra de diversidad baja. Los valores de H reportados para muestras de estadios tempranos de la elaboración de quesos van de 0.47 a 2.60 (Filippis et al., 2014), mientras que, en el caso de muestras muy complejas, como suelos forestales, dicho índice alcanza valores  $>8$  (Kato et al., 2015). Es decir que la microbiota del queso Cotija presenta diversidad de media a baja, aunque con alta riqueza de especies; esto se debe a la gran disparidad en las abundancias de taxa.

#### *Descripción de grupos de interés en la microbiota del queso Cotija*

La presencia del género *Lactobacillus* es común en quesos frescos y madurados (Bautista-Gallego et al., 2014; Ercolini et al., 2012). En particular, *L. plantarum* es una especie con metabolismo heterofermentativo importante en el desarrollo del perfil sensorial de quesos (Axelsson, 2004) y cuya presencia se asocia a un incremento en la proteólisis secundaria en la maduración (Milesi et al., 2008). Otros géneros descritos frecuentemente en quesos elaborados con leche no pasteurizada, madurados naturalmente, y que fueron encontrados en el queso Cotija como parte de la población subdominante son: *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Duthoit et al., 2003; Fuka et al., 2013; Masoud et al., 2012; Quigley et al., 2012). En contraste, los géneros *Leuconostoc* y *Weissella* no se asocian comúnmente a quesos madurados y nunca habían sido identificados como población dominante (Fuka et al., 2013; Masoud et al., 2012), por lo que esto puede considerarse como una firma distintiva del queso Cotija Región de Origen. En un trabajo reciente, se identificaron a *Leuconostoc* y *Weissella* por PCR-DGGE de las regiones variables V7-V8 del gen ribosomal 16S en queso Cotija Región de Origen (Chombo-Morales et al. 2016) lo que apoya nuestros resultados metagenómicos.

Al inicio de cualquier fermentación láctica, las especies más abundantes o exitosas son las bacterias ácido lácticas iniciadoras (SLAB por sus siglas en

inglés), que son productoras importantes de lactato, tales como *Lactococcus lactis* y algunas especies de lactobacilos como *L. farciminis*, ambas presentes en la fracción subdominante del queso Cotija. Conforme la maduración progresa, la población de SLAB disminuye y la de NSLAB (LAB no iniciadoras) se incrementa, dando paso al crecimiento de bacterias con metabolismo heterofermentativo, tales como *Leuconostoc*, *Weissella* y otras especies de lactobacilos como *L. plantarum*, lo que permitiría una producción importante de compuestos de olor y sabor (Beresford y Williams, 2004; Björkroth y Holzapfel, 2006; McSweeney, 2004).

Dentro de la fracción subdominante se encontraron los géneros *Marinilactibacillus* y *Alkalibacterium*, reconocidos como bacterias halófilas, alcalófilas, lácticas de origen marino (Ishikawa et al., 2013 y 2007). El otro género que forma parte de este grupo es *Halolactibacillus*, que también se encuentra en el queso Cotija en la población pobremente representada. La lista de halófilos (nodos terminales en rosa en la Figura 1), incluye a géneros del *Phylum Firmicutes* (*Halolactibacillus*, *Halanaerobiales*, *Thermohalobacter*, *Tetragenococcus*, *Halobacillus* y *Dehalobacter*); *Actinobacteria* (*Haloglycomyces*), *Proteobacteria* (*Thiohalomonas*, *Desulfohalobium* y *Halomonas*) y *Tenericutes* (*Haloplasma*); así como a algunas del dominio *Archaea* (*Halobacterium* y *Haloquadratum*). Todos ellos en abundancia <1%, que probablemente fueron inoculados durante el salado de la cuajada.

Dentro de los no dominantes se encontraron bacterias coliformes (nodos azules en la Figura 1), en muy baja abundancia total relativa: *Enterobacter*, 0.0007%; *Klebsiella*, 0.0004%; *Citrobacter*, 0.0002% y *E. coli*, 0.0007%. Considerando que la carga bacteriana en el queso Cotija es de  $1 \times 10^5$  células/g (Escobar, 2012), la proporción de enterobacterias correspondería a 1-2 células/g, lo que no representa un riesgo para el consumidor (NMX-F-735-COFOCALEC, 2011; NOM-243-SSA1, 2010). Para el caso de *E. coli*, se buscaron genes asociados a virulencia en la tabla de anotación de Trinotate, y no se encontró coincidencia alguna, por lo que la presencia de *E. coli* en el queso no representaría un riesgo para la salud del consumidor. Otros patógenos que no se detectaron en el queso por ninguno de los dos métodos de anotación taxonómica son *L. monocytogenes*, *P. aeuruginosa*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* ni *Brucella spp.*

## Anotación funcional

Una vez ensambladas las lecturas, el mapeo de las mismas sobre los fragmentos reconstruidos demostró que el 96.75% de éstas fueron utilizadas en el ensamblaje. Posteriormente, la predicción de secuencias codificantes permitió recuperar más de 140,000 marcos de lectura abiertos (ORFs) con una longitud promedio de 630 nucleótidos (Tabla 3).

Tabla 3. Estadísticas del ensamblaje y anotación del metagenoma de queso Cotija

Ensamblaje	
Número total de bases ensambladas (Mb)	104.9
Número total de <i>contigs</i>	65,162
Tamaño promedio de los <i>contigs</i> (bp)	1,610
N50 / N90 (bp)	3,854 / 547
Anotación	
Total de secuencias codificantes predichas	143,736
ORFs con anotación de HMMER/Pfam	97,063
ORFs con anotación de BLAST/Swiss-Prot	75,989
ORFs con asignación de número K por GhostKOALA	57,747

### *El perfil sensorial del queso Cotija comprendido desde el potencial metabólico de su consorcio bacteriano*

Con la anotación de GhostKOALA, se reconstruyeron las rutas metabólicas relacionadas con la producción de metabolitos de olor y sabor en quesos (Figura 2 y Tabla 4), que incluyen el metabolismo de aminoácidos, catabolismo de ácidos grasos libres, compuestos aromáticos y algunos azufrados.

Por otro lado, en la anotación de BLAST, se encontró una gran cantidad de aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada que generaría su respectivo  $\alpha$ -cetoácido, pero ninguna aminotrasferasa para tirosina y triptófano, lo que resulta interesante dado que algunos de sus productos de degradación, como el escatol, tienen perfiles de olor desagradables (Yvon y Rijnen, 2001). Los  $\alpha$ -cetoácidos generados en el queso son degradados a aldehídos por las  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasas, enzimas para las que también se encontró anotación. Es probable entonces que la fracción aldehídica en la mezcla de compuestos esté enriquecida en metabolitos producidos por el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y fenilalanina, así como de acetaldehído derivado del metabolismo de treonina debido a la acción de la L-Tre aldolasa.

Tabla 4. Rutas metabólicas involucradas en la síntesis del perfil sensorial en quesos

Ruta metabólica (KEGG id)	Compuesto <sup>a</sup>	Aroma / sabor <sup>b</sup>
Metabolismo de propanoato (00640)	Ácido propiónico Propionaldehído 1-propanol	Pungente, rancio / agrio a queso Frutal, pungente / no reportado Mohoso, alcohólico / maduro, frutal
Metabolismo de butanoato (00650)	2,3-butanodiona (diacetilo) Acetoína Butirato Butanal 1-butanol	Mantequilla rancia / mantequilla Mantequilla, yogurt Rancio / grasa butírica Pungente, olor aldehídico Rancio, dulce, banana, fusel
Degradación de compuestos aromáticos (01220)	Benzaldehído Ácido benzoico	Almendras amargas Amargo muy débil
Glicolisis/gliconeogénesis (00010) Metabolismo de piruvato (00620)	Etanol Ácido láctico Ácido acético Acetaldehído	Etéreo / ardiente Inoloro / acre Pungente, agrio, vinagre / ardiente Pungente, afrutado
Metabolismo de nitrógeno (00910)	Amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Empalagoso, pungente, irritante
Degradación de ácidos grasos (00071)	Formación del respectivo aldehído y 1-alcohol	Frutal, floral, notas verdes / frutal Dulce, fresco, floral dulce (alcoholes derivados de 4-10 carbonos) Graso (alcoholes derivados de ácidos grasos de cadena larga)
Metabolismo de Cys y Met (00270)	Metanotiol	Pungente, col podrida, sulfuroso, ajo
Metabolismo de fenilalanina (00360)	2-feniletanol Fenilacetaldehído	Rosas / amargo, dulce, a melocotón Floral a rosas <sup>a</sup> / no reportado

<sup>a</sup> Compuestos identificados más frecuentemente en quesos (Smit et al., 2005).

<sup>b</sup> Información disponible para cada compuesto en el sitio de PubChem del NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/#collection=compounds>).

Otra fuente de compuestos de olor y sabor en el queso Cotija sería la degradación de ácidos grasos libres generados por la presencia de genes codificantes para esterasas. De acuerdo a lo observado en la anotación funcional del metagenoma del queso Cotija, los ácidos grasos libres son sustrato para reacciones de esterificación con alcoholes y tioles en la producción de ésteres y tioésteres. Además, la degradación de ácidos grasos por  $\alpha$ -oxidación con la generación concomitante de metilcetonas (Collins et al., 2003), llevaría a la degradación de estas últimas a su respectivo alcohol secundario por acción de la carbonil reductasa I. Todas estas enzimas forman parte de la batería metabólica del consorcio del queso Cotija. Por último, cabe resaltar la gran cantidad de aldehído y alcohol deshidrogenasas encontradas en la tabla de Trinotate, lo que indica que el consorcio bacteriano tiene la capacidad para generar una mezcla compleja de

compuestos que incluiría una amplia variedad de cetonas, aldehídos y ácidos orgánicos.

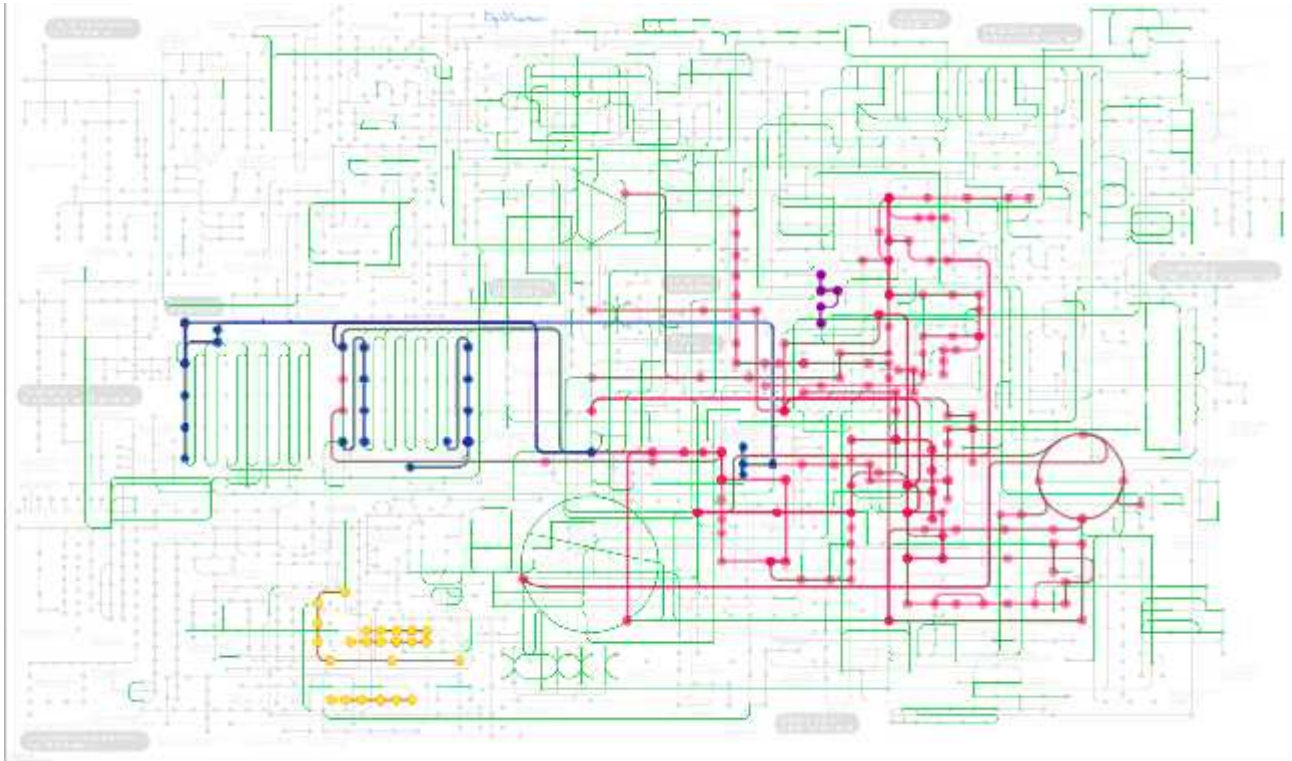


Figura 2. Mapa metabólico universal de la KEGG en fondo gris. Rutas metabólicas identificadas en el metagenoma del queso Cotija resaltadas en verde. Módulos de interés en la producción de compuestos de olor y sabor: Amarillo, degradación de compuestos aromáticos; morado, metabolismo de azufre; azul, metabolismo de ácidos grasos; rosa, metabolismo de aminoácidos.

### *Péptidos antimicrobianos e inmunidad*

La habilidad de las BAL para producir bacteriocinas es de importancia básica en estrategias de bioconservación en alimentos, en los que se busca extender la vida de anaquel y asegurar su inocuidad (Ross et al., 2002). En el metagenoma del queso se identificaron un total de 126 *contigs* con al menos un gen con la anotación de interés, de los cuales, 43 tuvieron al menos un gen codificante para bacteriocina, 74 tuvieron sólo genes con anotación de proteínas de inmunidad a bacteriocina, y sólo en 17 fue posible identificar tanto el gen de la bacteriocina como el de inmunidad (algunos ejemplos se muestran en la Figura 3). En el análisis de los clusters de genes con anotación relacionada a la producción de bacteriocinas, se esperaba observar el gen de la proteína de inmunidad adyacente al gen estructural de la bacteriocina, ya que ambos son comúnmente cotranscritos



(Kjos et al., 2011), pero esto no ocurrió en la mayoría de los *contigs*. Sin embargo, también hubo muchos casos de presencia de genes sin anotación o de proteínas hipotéticas en los clusters (Figura 3). Éstos son de especial interés, sobre todo en los frecuentes casos donde los genes sin anotación se encontraron flanqueando genes de proteínas de inmunidad, pues indicaría que probablemente codifican para bacteriocinas con nuevos dominios funcionales. Adicionalmente, se observó una cantidad desproporcionada de genes de inmunidad (104 en total) con respecto al número de anotaciones para bacteriocinas (52 genes), lo que podría implicar que, para las bacterias posiblemente las proteínas de inmunidad son tan útiles o más que la propia bacteriocina. Incluso, en el ensamblaje del metagenoma del queso Cotija se observó el caso interesante de un *contig* con cuatro copias del gen de inmunidad y ningún gen codificante para la bacteriocina. Este fenómeno se podría explicar por el mimetismo de inmunidad (Draper et al., 2009) o por inmunidad cruzada (Kjos et al., 2010), fenómenos que podrían jugar un papel importante como estrategias de sobrevivencia para las cepas bacterianas exitosas, que son capaces de prevalecer al tiempo final de la maduración del queso Cotija, dada su alta frecuencia de aparición.

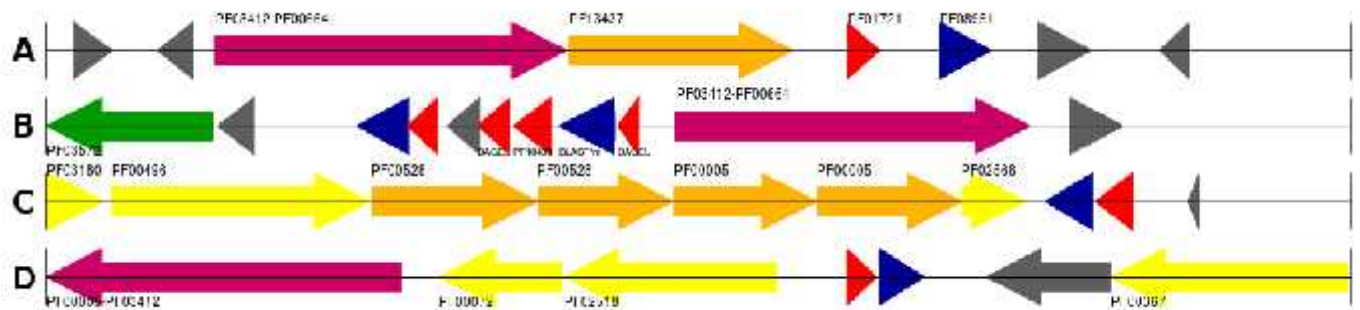


Figura 3. A-C) Clusters identificados en el metagenoma del queso Cotija; D) Cluster de bacteriocina en el genoma de *Pediococcus pentosaseus* ATCC 25745. Código de color: rojo, gen estructural de la bacteriocina; azul, gen de inmunidad; naranja, gen con dominio de transportador; verde, gen con dominio de peptidasa; rosa, gen con dominios de transporte y peptidasa; amarillo, otra anotación; gris, gen hipotético o sin anotación.

### Reconstrucción de genomas de las especies dominantes

Debido a que el metagenoma fue secuenciado con alta profundidad, fue posible reconstruir los genomas de las tres especies dominantes (ver estadísticas en Tabla 5) con una cobertura estimada de más de 1400 veces y en ningún caso el número

de espacios vacíos fue >78, lo que indica una alta calidad de secuenciación (Chain et al., 2009). Con el fin de establecer si las especies dominantes en el metagenoma son potencialmente productoras de bacteriocinas, se hizo una búsqueda de genes con dicha anotación en los genomas reconstruidos. De esta búsqueda resultó que el genoma de *W. paramesenteroides* no contiene regiones genómicas codificantes para bacteriocinas ni genes de inmunidad o algún otro relacionado. En el genoma de *L. mesenteroides* se identificó una bacteriocina putativa acompañada de siete ORFs de proteínas hipotéticas adyacentes, además de dos clusters con genes de inmunidad, pero sin gen codificante para bacteriocina. Finalmente, en el genoma de *L. plantarum* no se encontraron genes con anotación para bacteriocinas, pero sí 11 genes en diferentes *contigs* con anotación para proteínas de inmunidad, donde sólo uno de ellos tuvo proteínas hipotéticas adyacentes. Se sugiere realizar trabajo experimental para corroborar que alguno de estos genes corresponde a una bacteriocina nueva.

Tabla 5. Estadísticas de la reconstrucción de genomas con respecto a referencias del NCBI

	<i>L. plantarum</i> WCFS1	<i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	<i>W. paramesenteroides</i> ATCC 33313
Lecturas mapeadas (% del total)	38.74	11.27	26.85
Cobertura estimada	1,863 x	1,473 x	2,135 x
Número total de contigs	1,560	297	992
Número de gaps	78	40	42
N50 / N90 (bp)	4,985 / 825	36,455 / 2,977	3,148 / 1,002
Tamaño promedio de contig	2,201	6,744	2,196
Contenido de GC (%)	44.37	37.90	38.27
Número de genes	3,998	2,141	2,755

## VIII. Conclusiones

La microbiota bacteriana del queso Cotija a los tres meses de maduración está conformada casi en su totalidad por *Firmicutes* y tres géneros son los dominantes: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella*, cuyos genomas se reconstruyeron con un alto grado de integridad. La dominancia de *Leuconostoc* y *Weissella* es atípica en los quesos madurados, por lo que su presencia y abundancia pueden ser considerados como una firma distintiva del queso Cotija Región de Origen. Se observó que el metagenoma de este queso está compuesto por más de 500 taxa no dominantes, entre los que se incluyen bacterias y arqueas halófilas, lo que refleja la complejidad de la comunidad y lo infructuoso que resultaría intentar diseñar un cultivo iniciador con el fin de elaborar un queso idéntico fuera de la región de origen. La alta profundidad de secuenciación permitió corroborar que el alimento está libre de bacterias patógenas y que las cuentas de coliformes están dentro de lo establecido por las normas, es decir que el consumo del queso Cotija no representaría un riesgo para la salud del consumidor, aun cuando es elaborado con leche no pasteurizada. El consorcio posee el potencial metabólico para generar una mezcla de compuestos a partir del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y ácidos grasos libres, principalmente, así como de una gran variedad de aldehídos y alcoholes, que en conjunto forman parte del perfil sensorial del queso. Ninguna de las especies dominantes posee un arsenal importante de genes codificantes para bacteriocinas; sin embargo, dentro del consorcio existe una amplia variedad de genes que codifican para proteínas de inmunidad a bacteriocinas, lo que sugiere que ésta es una estrategia de sobrevivencia para las bacterias de la microbiota del producto madurado.

## IX. Bibliografía

- Ampe F, ben Omar N, Moizan C, et al. (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* 65:5464–5473.
- Asnicar F, Weingart G, Tickle TL, et al. (2015) Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.1029
- Assefa S, Keane TM, Otto TD, et al. (2009) ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* 25:1968–1969. doi: 10.1093/bioinformatics/btp347
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, et al. (1995) Short protocols in molecular biology. *Biochem Educ* 24:2–3. doi: 10.1002/bmb.1996.5690240143
- Axelsson L (2004) Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (eds) *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 3rd edn. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 1–66
- Bautista-Gallego J, Alessandria V, Fontana M, et al. (2014) Diversity and functional characterization of *Lactobacillus* spp. isolated throughout the ripening of a hard cheese. *Int J Food Microbiol* 181:60–66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.020
- Beresford T, Williams A (2004) The Microbiology of Cheese Ripening. In: Patrick F. Fox PLHM Timothy M Cogan and Timothy P Guinee (ed) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, pp 287–317
- Björkroth J, Holzapfel W (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dr MDP, Falkow S, Rosenberg E, et al. (eds) *The Prokaryotes*. Springer US, pp 267–319
- Bravo MA (2008) Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
- Chain PSG, Grafham DV, Fulton RS, et al. (2009) Genome Project Standards in a New Era of Sequencing. *Science*. doi: 10.1126/science.1180614
- Chombo-Morales P, Kirchmayr M, Gschaedler A, et al. (2016) Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT - Food Science and Technology* 65:1153–1161. doi: 10.1016/j.lwt.2015.09.044
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:D633–D642. doi: 10.1093/nar/gkt1244

- Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13:841–866. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2
- Draper LA, Grainger K, Deegan LH, et al. (2009) Cross-immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lactacin 3147. *Mol Microbiol* 71:1043–1054. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06590.x
- Duthoit F, Godon J-J, Montel M-C (2003) Bacterial Community Dynamics during Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16S rRNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:3840–3848. doi: 10.1128/AEM.69.7.3840-3848.2003
- Eddy SR (2011) Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* 7:e1002195. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002195
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Ercolini D, De Filippis F, La Stora A, Iacono M (2012) “Remake” by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl Environ Microbiol* 78:8142–8145. doi: 10.1128/AEM.02218-12
- Escobar ZA (2012) Estudio de la distribución espacial de la microbiota bacteriana en queso Cotija por la técnica de FISH. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México
- Filippis FD, Stora AL, Stellato G, et al. (2014) A Selected Core Microbiome Drives the Early Stages of Three Popular Italian Cheese Manufactures. *PLOS ONE* 9:e89680. doi: 10.1371/journal.pone.0089680
- Finn RD, Bateman A, Clements J, et al. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucl Acids Res* 42:D222–D230. doi: 10.1093/nar/gkt1223
- Fuka MM, Wallisch S, Engel M, et al. (2013) Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe’s Milk Cheeses. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0080734
- García SV (2006) Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso cotija. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México
- García SV (2011) Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de elaboración de un queso artesanal, mediante técnicas moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29:644–652. doi: 10.1038/nbt.1883

- Hernández MN (2007) Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México
- Ishikawa M, Kodama K, Yasuda H, et al. (2007) Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Lett Appl Microbiol* 44:308–313. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02073.x
- Ishikawa M, Yamasato K, Kodama K, et al. (2013) *Alkalibacterium gilvum* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterium isolated from soft and semi-hard cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1471–1478. doi: 10.1099/ijs.0.042556-0
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology* 428:726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006
- Kato H, Mori H, Maruyama F, et al. (2015) Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Res* dsv023. doi: 10.1093/dnares/dsv023
- Kjos M, Snipen L, Salehian Z, et al. (2010) The Abi Proteins and Their Involvement in Bacteriocin Self-Immunity. *Journal of Bacteriology* 192:2068–2076. doi: 10.1128/JB.01553-09
- Kjos M, Borrero J, Opsata M, et al. (2011) Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256–3267. doi: 10.1099/mic.0.052571-0
- Kultima JR, Sunagawa S, Li J, et al. (2012) MOCAT: A Metagenomics Assembly and Gene Prediction Toolkit. *PLoS ONE* 7:e47656. doi: 10.1371/journal.pone.0047656
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Masoud W, Vogensen FK, Lillevang S, et al. (2012) The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 153:192–202. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.014
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- McSweeney PLH (2004) Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57:127–144. doi: 10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x
- Milesi MM, McSweeney PIH, Hynes ER (2008) Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of Applied Microbiology* 105:884–892. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03813.x

NMX-F-735-COFOCALEC (2011) Norma Mexicana. Sistema producto Leche-Alimentos-Lácteos-Alimento Lácteo Regional-Queso Cotija Artesanal Madurado-Denominación, Especificaciones y Métodos de Prueba.

NOM-243-SSA1 (2010) Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Olvera GM (2013) Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.

Peng Y, Leung HCM, Yiu SM, Chin FYL (2012) IDBA-UD: a *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28:1420–1428. doi: 10.1093/bioinformatics/bts174

Quigley L, O'Sullivan O, Beresford TP, et al. (2012) High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Appl Environ Microbiol* 78:5717–5723. doi: 10.1128/AEM.00918-12

Ross RP, Morgan S, Hill C (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol* 79:3–16.

Smit G, Smit BA, Engels WJM (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* 29:591–610. doi: 10.1016/j.femsre.2005.04.002

Su X, Pan W, Song B, et al. (2014) Parallel-META 2.0: enhanced metagenomic data analysis with functional annotation, high performance computing and advanced visualization. *PLoS ONE* 9:e89323. doi: 10.1371/journal.pone.0089323

van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, et al. (2013) BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res* 41:W448-453. doi: 10.1093/nar/gkt391

Willner D, Furlan M, Haynes M, et al. (2009) Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS ONE* 4:e7370. doi: 10.1371/journal.pone.0007370

Yuan S, Cohen DB, Ravel J, et al. (2012) Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS ONE* 7:e33865. doi: 10.1371/journal.pone.0033865

Yvon M, Rijnen L (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11:185–201. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00049-8

Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M (2010) *Ab initio* gene identification in metagenomic sequences. *Nucl Acids Res* 38:e132–e132. doi: 10.1093/nar/gkq275

Zúñiga AB (2009) Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México