

**POTENCIAL PROBIÓTICO Y TECNOLÓGICO DE LEVADURAS AUTÓCTONAS
AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS DEL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE
BUENOS AIRES (NOBA)**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Junín, 22 de noviembre de 2025

**POTENCIAL PROBIÓTICO Y TECNOLÓGICO DE LEVADURAS AUTÓCTONAS
AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS DEL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE
BUENOS AIRES (NOBA)**

Trabajo Final de Grado
de la alumna

LUISINA ESCUDERO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Co-Director/a

(Nombre y Apellido)
Director/a

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Junín, 22 de noviembre de 2025

RESUMEN

En la producción de alimentos fermentados artesanales, los microorganismos autóctonos o nativos desempeñan un papel esencial en la fermentación y maduración ya que contribuyen al desarrollo de características sensoriales únicas, al mismo tiempo que colaboran en la competitividad frente a patógenos. Su estudio y caracterización resultan relevantes para la preservación de la biodiversidad microbiana regional y la conservación del patrimonio biológico. Este trabajo consistió en el aislamiento y la caracterización tecnológica y funcional de levaduras autóctonas de la región del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires con el objetivo de evaluar su potencial como fermentos en la producción de quesos y/o como probióticos que otorguen un valor sensorial y funcional agregado. A partir de la evaluación morfológica macro y microscópica, se seleccionaron 17 aislamientos que fueron nombrados como: QL, LE, TR, QVA1, QVA2, QVA3, QVA4, LT2, LT3, LT4, LT5, VVA1, VVA2, VA22, VA24, CL22 y CL24, provenientes de quesos y leches regionales. La caracterización genotípica mediante PCR de la región ITS evidenció variaciones de tamaño en los fragmentos generados, con resultados que sugieren la pertenencia a géneros comúnmente hallados en lácteos. La evaluación de las propiedades tecnológicas reveló que los aislados QVA1 y QVA2 poseen características promisorias para ser empleados fermentos adjuntos en la elaboración de quesos. Ambos mostraron alta robustez frente a condiciones de salinidad y pH, tolerando concentraciones de cloruro de sodio del 2,5 a 10 % de cloruro de sodio a pH 5,5. Además, presentaron actividad proteolítica en agar leche, capacidad de asimilar citrato en agar Simmons y degradar los aminoácidos evaluados, lo que sugiere su potencial para generar compuestos de interés sensorial. A su vez, los aislados TR, CL24 y VA22 mostraron resultados positivos para producción de diacetilo-acetoína mediante la prueba de Voges-Proskauer y actividad lipolítica en agar manteca y en agar Tween 80. La caracterización del potencial probiótico *in vitro* relevó una elevada supervivencia a las condiciones simuladas de digestión en los aislados VA24 y QL. Ambos mostraron altos niveles de coagregación frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* predominaron niveles intermedios. Además, presentaron actividad antimicrobiana positiva frente a *E. faecalis* según el ensayo de difusión en agar Muller-Hinton. Por su parte, VA24 mostró altos valores de autoagregación e hidrofobicidad. A futuro los aislados que presentaron características promisorias en este trabajo podrían emplearse como fermentos adjuntos en quesos y evaluar su contribución al perfil sensorial y funcional, así como también validar su eficacia probiótica *in vivo*. Además, la confirmación de su identidad mediante análisis genético permitirá completar su selección y estudio.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me acompañaron durante esta etapa y a lo largo de mi formación, tanto desde lo académico, como desde lo personal.

A mis padres, Ana y Luis, por enseñarme a luchar por mis sueños, por acompañarme con paciencia y amor, y por impulsarme a seguir cuando el camino se volvía difícil. Valoro el esfuerzo y sacrificio que hicieron para que pudiera estudiar y la confianza incondicional que depositaron en mí. Este logro también es de ustedes.

A mis hermanas, Fran y Maia, por todos estos años compartidos, por la convivencia, su compañía, los fines de semana lejos de casa, pero juntas, por escucharme, darme ánimo y alegrar mis días. Gracias por escuchar mis monólogos sobre genética, ahora son expertas en el tema.

A mi compañero, Heber, que llegó justo cuando más lo necesitaba y se convirtió en un sostén fundamental para mí. Gracias por darme calma, ánimo, cariño y compañía y por los gestos y detalles que me hicieron sentir acompañada en todo momento.

A mis abuelos Amalia y Pacho, por prender velitas antes de rendir un examen, los buenos deseos y por seguir presentes en mi vida, mi abuela con sus llamados eternos a la distancia y mi abuelo desde los recuerdos más lindos.

A mis amigos del pueblo, por estar siempre, por las risas, anécdotas y por entender cuando no podía volver tan seguido. Gracias por hacer que cada reencuentro valga la pena. En especial a mis amigas Ailu, Aldi, Wan y Meli, por su apoyo incondicional, charlas eternas y sus consejos sinceros, por acompañarme en todo, siempre.

A mis facuamigos, Ema, Eri, Sofi, Luisi, Flor y Esteban, con quienes compartí infinitos mates, cursadas, trabajos, parciales, nervios, días largos de estudio y las risas que nunca faltaron. Gracias por su compañerismo, las explicaciones de último minuto y por hacer de esta etapa algo mucho más lindo y llevadero. Estoy segura de que serán excelentes profesionales y es un orgullo haber transitado este camino junto a ustedes.

A mi directora Leti y a mi codirectora Valen, por confiar en mí desde el primer día y compartir conmigo sus conocimientos con claridad y dedicación. Son excelentes profesionales, pero sobre todo, excelentes personas. Gracias por su paciencia y por cada gesto, haciéndome sentir acompañada dentro y fuera del laboratorio. Disfruté inmensamente este camino gracias a ustedes.

A los demás integrantes del laboratorio, por su ayuda desinteresada y la energía tan linda que transmiten cada día. Gracias por hacer del laboratorio un lugar tan lindo para trabajar.

A la UNNOBA y educación pública, por brindarme una formación académica de calidad y ofrecerme oportunidades para crecer como profesional. A los docentes de la carrera, por su dedicación, por compartir sus conocimientos y guiarme a lo largo de estos años con compromiso.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Fermentación y microbiota de alimentos	6
1.1.1 Historia de la fermentación	6
1.1.2 Microorganismos involucrados y beneficios en alimentos fermentados.....	7
1.2 Levaduras en alimentos fermentados	8
1.2.1 Levaduras: definición, características y taxonomía	8
1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.2.3 Levaduras en la maduración y calidad de los quesos	12
1.3 Levaduras autóctonas.....	13
1.3.1 Definición y características	13
1.3.2 Ventajas de las levaduras nativas	14
1.4 Probióticos.....	14
1.4.1 Concepto y regulaciones	14
1.4.2 Mecanismos de acción de probióticos	15
1.5 Técnicas para la identificación de levaduras	17
1.5.1 Identificación fenotípica y bioquímica.....	17
1.5.2 Identificación molecular	18
2. HIPÓTESIS	19
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Aislamiento de levaduras y caracterización morfológica	20
4.2 Cultivo de los aislamientos.....	21
4.3 Caracterización genotípica.....	21
4.3.1 Extracción de ADN genómico total.....	21
4.3.2 Reacción PCR de la región espaciadora transcrita interna (ITS).....	22
4.4 Caracterización tecnológica	22
4.4.1 Propiedades tecnológicas cuantitativas	22
4.4.2 Propiedades tecnológicas cualitativas	23
4.5 Caracterización funcional (potencial probiótico in vitro).....	24
4.5.1 Supervivencia a la digestión simulada en el tracto gastrointestinal (TGI).....	24
4.5.2 Capacidad de autoagregación	25
4.5.3 Hidrofobicidad.....	26
4.5.4 Coagregación con patógenos	26
4.5.5 Actividad antimicrobiana	27

4.6	Análisis estadístico	27
5.	RESULTADOS	28
5.1	Aislamiento de levaduras y caracterización morfológica	28
5.2	Caracterización genotípica.....	30
5.3	Propiedades tecnológicas cuantitativas	31
5.4	Propiedades tecnológicas cualitativas.....	36
5.5	Propiedades funcionales.....	39
5.5.1	Supervivencia a la digestión simulada en el tracto gastrointestinal (TGI).....	39
5.5.2	Capacidad de autoagregación	40
5.5.3	Hidrofobicidad.....	41
5.5.4	Coagregación con patógenos	42
5.5.5	Actividad antimicrobiana	43
6.	DISCUSIÓN	44
6.1	Aislamiento y caracterización morfológica	44
6.2	Caracterización genotípica.....	45
6.3	Caracterización tecnológica	46
6.3.1	Caracterización tecnológica cuantitativa	46
6.3.2	Caracterización tecnológica cualitativa	46
6.4	Caracterización funcional.....	48
6.4.1	Supervivencia a la digestión simulada en el tracto gastrointestinal (TGI).....	48
6.4.2	Capacidad de autoagregación	50
6.4.3	Hidrofobicidad.....	50
6.4.4	Coagregación con patógenos	51
6.4.5	Actividad antimicrobiana	51
7.	CONCLUSIÓN.....	53
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	55

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fermentación y microbiota de alimentos

1.1.1 Historia de la fermentación

La fermentación es el proceso mediante el cual un microorganismo transforma un sustrato en otros productos, generalmente a través de la producción de ácido láctico, etanol y diversos metabolitos finales (Organización Mundial de Gastroenterología, 2023). Desde tiempos antiguos, las sociedades han aprovechado este fenómeno para elaborar distintos alimentos. Su uso se remonta aproximadamente al 10.000 a.C., coincidiendo con el surgimiento de las primeras civilizaciones en la región del Creciente Fértil (actual Oriente Medio). En aquel entonces, la fermentación se empleaba principalmente para la conservación de alimentos y la producción del pan, el vino y la cerveza, y se desarrollaba de manera espontánea, sin conocimiento del proceso bioquímico subyacente.

Recién en las décadas de 1850 y 1860, el químico y microbiólogo francés Louis Pasteur abordó su estudio sistemático, demostrando que la fermentación era consecuencia de la actividad de microorganismos y, por lo tanto, un proceso llevado a cabo por células vivas. A lo largo de la historia, la fermentación ha desempeñado un papel fundamental y puede considerarse uno de los primeros antecedentes de la biotecnología, entendida como la disciplina que crea o transforma productos mediante el uso de organismos vivos. En este contexto, los microorganismos constituyen un recurso biotecnológico de gran relevancia (Maicas, 2020; Taveira et al., 2021).

Desde el enfoque bioquímico, la fermentación es una vía en la cual las levaduras —y en ciertos casos algunas bacterias— transforman el piruvato producido durante el metabolismo de la glucosa en etanol y dióxido de carbono (**Figura 1**; Maicas, 2020).

Cabe destacar que, si bien la fermentación es uno de los métodos más antiguos de producción y conservación de alimentos, permite dar un valor agregado desde el punto de vista nutricional y sensorial.

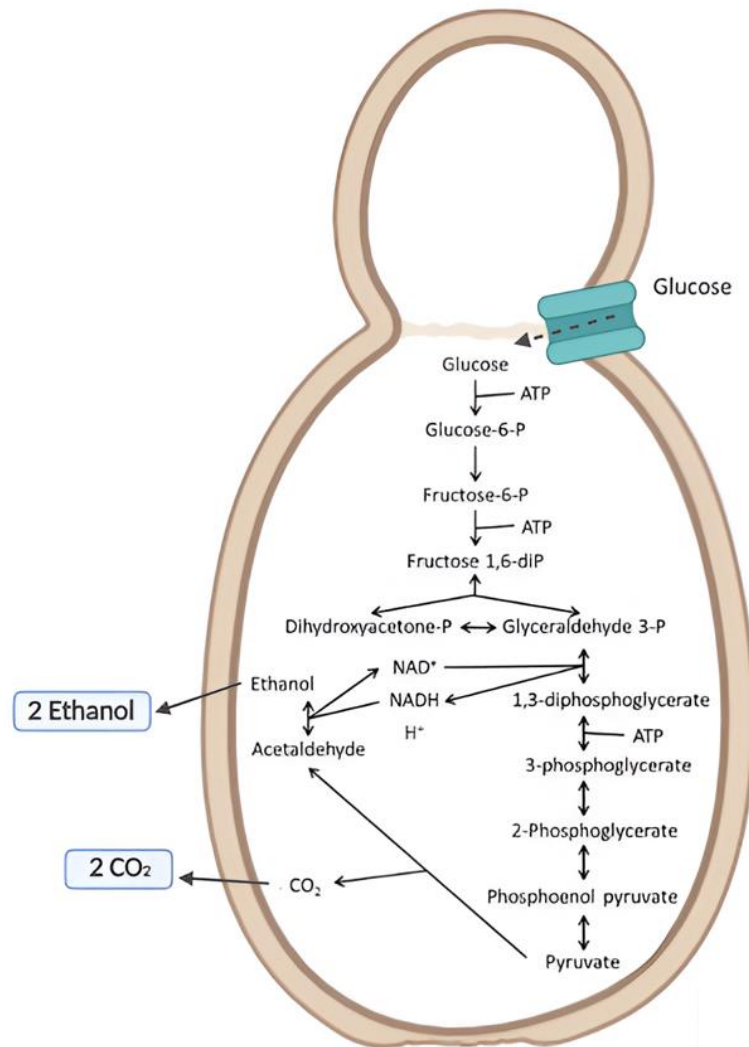


Figura 1. Metabolismo central de la fermentación en levaduras. Adaptado de Maicas, S. (2020). Modificado con BioRender.

1.1.2 Microorganismos involucrados y beneficios en alimentos fermentados

Se entiende por alimentos fermentados a aquellos alimentos o bebidas producidos gracias a la acción de microorganismos, dando lugar a cambios fisicoquímicos en su composición. Entre los microorganismos presentes en alimentos y bebidas fermentadas se encuentran principalmente bacterias ácido lácticas (BAL), siendo los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus* y *Weissella* los más frecuentes. Estos desempeñan un papel central en la producción de ácidos orgánicos, que contribuyen a la estabilidad y seguridad del alimento. En fermentaciones alcalinas, especialmente en legumbres, predominan especies del género *Bacillus*, capaces de generar compuestos que mejoran la textura y el sabor. Otros géneros bacterianos asociados a fermentaciones incluyen *Kocuria*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* (en lácteos y carnes fermentadas), así como *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium* y

Arthrobacter, presentes principalmente en quesos y embutidos. No obstante, también participan otros grupos de microorganismos como mohos y levaduras. Las levaduras, entre ellas *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*, producen etanol y metabolitos aromáticos, mientras que los mohos filamentosos, como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Monascus* y *Penicillium* aportan enzimas que degradan compuestos complejos y potencian el valor nutritivo. En conjunto, esta microbiota diversa determina las propiedades sensoriales y tecnológicas de los alimentos fermentados tradicionales en distintas culturas (Ferrari et al., 2020; Tamang et al., 2016).

Si bien la función más conocida de la fermentación es la asociada a la conservación de alimentos, mayor seguridad alimentaria o la mejora de propiedades organolépticas, en los últimos años se ha profundizado el interés en los beneficios que este proceso puede brindar a la salud de los consumidores. El aumento de la acidez en las matrices alimentarias, producto del incremento de alcohol y ácidos orgánicos durante la fermentación, inhibe tanto el crecimiento de microorganismos indeseables como la actividad enzimática, lo que retrasa el deterioro y prolonga la vida útil del alimento (Leeuwendaal et al., 2022). Otro beneficio relevante es el incremento en la concentración de compuestos antioxidantes y la modificación de su estructura molecular, lo que mejora su solubilidad y biodisponibilidad. Estos cambios se traducen en una mayor eficacia biológica, particularmente en personas con trastornos metabólicos (Seo, 2024).

Por último, cabe señalar que, si bien alimentos fermentados y microorganismos probióticos mantienen una relación estrecha –en parte porque muchos de los microorganismos presentes en alimentos fermentados están filogenéticamente vinculados con cepas probióticas–, no son conceptos equivalentes. La definición de probiótico establece que se trata de “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped” (FAO/WHO, 2002). En un alimento fermentado, en cambio, no es indispensable que los microorganismos permanezcan vivos al momento de la ingesta, y su concentración puede ser altamente variable, con especies que suelen predominar sobre otras (Ferrari et al., 2020).

1.2 Levaduras en alimentos fermentados

1.2.1 Levaduras: definición, características y taxonomía

La levadura es un microorganismo eucariota perteneciente al Reino Fungi, específicamente a la división Eumycota. A esta división pertenecen las subdivisiones Basidiomycota, y Ascomycota, representada por levaduras capaces de producir esporas dentro de ascos (denominadas ascosporas), y Deuteromycota, que actualmente se las conoce también como mitospóricos, formada por levaduras incapaces de formar esporas (Kurtzman et al., 2011). Aunque el término “levadura” carece de un significado taxonómico formal, se emplea para describir microorganismos

unicelulares de forma ovalada, generalmente incoloros o blancos, con capacidad de fermentar alimentos y bebidas. Su morfología es variable, bajo ciertas condiciones pueden desarrollar estructuras filamentosas similares a las hifas de mohos multicelulares, y luego retornar a su forma unicelular. Esta plasticidad morfológica se explica por la compleja composición genética de los eucariotas (Tullio et al., 2022).

La mayoría de los organismos en el Reino Fungi tales como mohos y hongos, son multicelulares, sin embargo, la levadura es unicelular y posee un tamaño de 5 a 40 micras, con forma redondeada u ovoide como se observa en la **Figura 2** (Jácome Pilco et al., 2023).

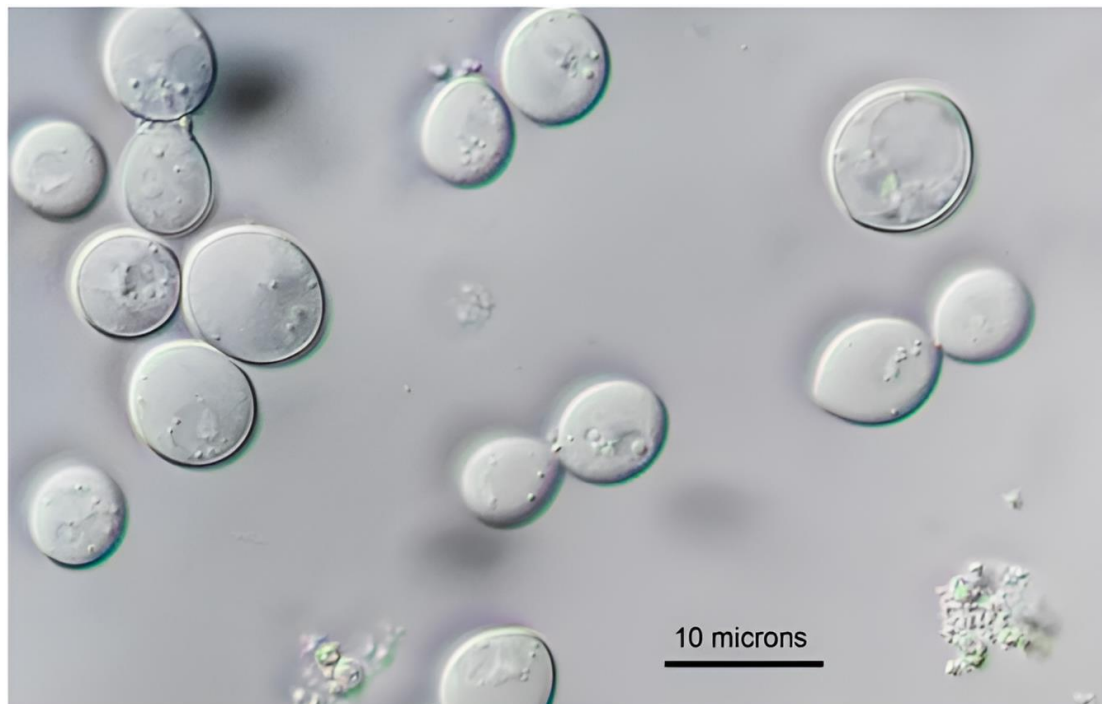


Figura 2. Células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* observadas mediante microscopía de interferencia diferencial (DIC), aumento 400X. Tomado de Microscopy of yeast, por R. Berdan (2022), Motoc America.

Existen más de 1500 especies de levaduras, y dentro de cada especie hay miles de cepas distintas (Britannica Editors, 2025). Las levaduras, ya sean ascomicetas o basidiomicetas, se caracterizan por la gemación o la fisión como medios principales de reproducción asexual, y tienen estados sexuales que no están encerrados en cuerpos fructíferos. Además, algunas especies corresponden a la fase unicelular de hongos dimórficos que alternan entre formas filamentosas y levaduriformes. La velocidad de reproducción de las levaduras varía según la especie, en condiciones ideales de crecimiento, el proceso puede durar entre 2 y 3 horas (Mejía Barajas & Saavedra Molina, 2022).

Comprender la fisiología y dinámica de crecimiento de las levaduras es fundamental para interpretar su comportamiento en procesos fermentativos. La curva de crecimiento describe la

variación del número de células a lo largo del tiempo (**Figura 3**). Se distinguen tres fases principales: La fase de latencia, es un período de adaptación sin crecimiento visible, las células incorporan oxígeno y nutrientes, y sintetizan enzimas esenciales. En la fase exponencial se produce un rápido aumento del número de células, se consumen azúcares y se produce etanol, dióxido de carbono (CO₂) y metabolitos. En la fase estacionaria no se produce crecimiento, debido a la alta concentración de desechos o al consumo total del sustrato (Alsuhaím et al., 2013).

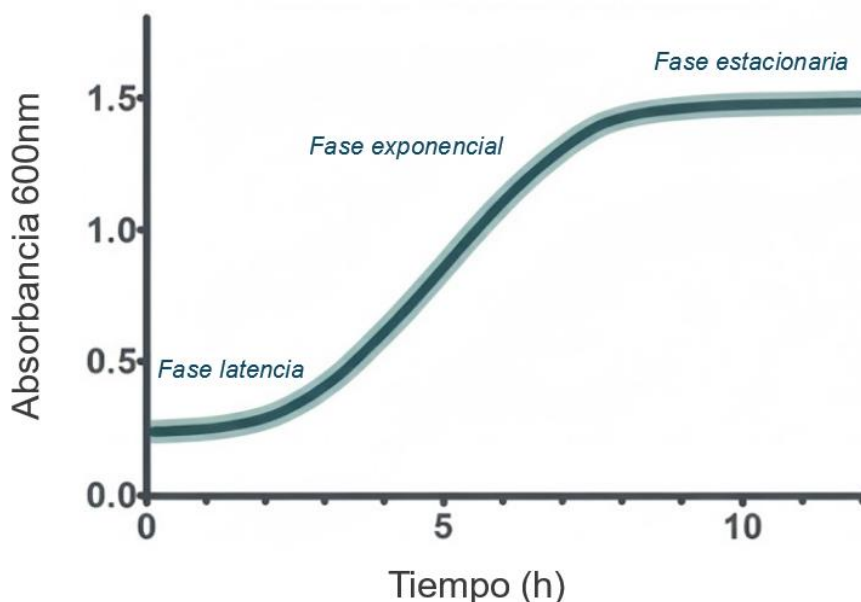


Figura 3. Curva típica de crecimiento de levaduras. Adaptada de Alsuhaím et al. (2013).

Las levaduras se encuentran presentes en ambientes sumamente diversos y han sido aislado de múltiples sustratos como plantas, insectos, animales, hábitats acuáticos, suelos, hongos, frutas, alimentos y bebidas fermentadas tradicionales. Incluso de ambientes con condiciones extremas como acidez, temperaturas frías y cálidas, radiación, alto contenido de metales pesados, entre otras (Burini, 2022). Desde el punto de vista tradicional, las levaduras presentan menos requerimientos que otros microorganismos como las BAL. Sin embargo, su desarrollo requiere la disponibilidad de nutrientes esenciales, incluyendo azúcares fermentables, aminoácidos, vitaminas, minerales y oxígeno (Maicas, 2020).

Finalmente, las levaduras se destacan por su notable capacidad para producir una amplia gama de productos biotecnológicos (**Figura 4**). Son empleadas en la obtención de biocombustibles, en procesos de biorremediación y como agentes de control biológico, además de ser fuente de compuestos y enzimas —tanto nativas como heterólogas— con aplicaciones en las industrias farmacéutica, química, alimentaria y agrícola. No obstante, su uso más antiguo y representativo continúa siendo la elaboración de alimentos fermentados como cerveza, vino, sake y productos panificados. Más allá de estos usos tradicionales, los avances en biología molecular, genómica y

biología de sistemas han ampliado considerablemente su campo de aplicación. En la actualidad, las levaduras se utilizan en la producción de proteínas recombinantes de interés farmacéutico (enzimas, vacunas, hormonas), en la biocatálisis de reacciones químicas específicas, y en la generación de metabolitos, pigmentos, aminoácidos y compuestos con valor alimentario o nutricional. Asimismo, desempeñan un papel relevante en la investigación biomédica como organismos modelo para el estudio de procesos celulares y enfermedades humanas (Kurtzman et al., 2011; Lohrmann, 2021).

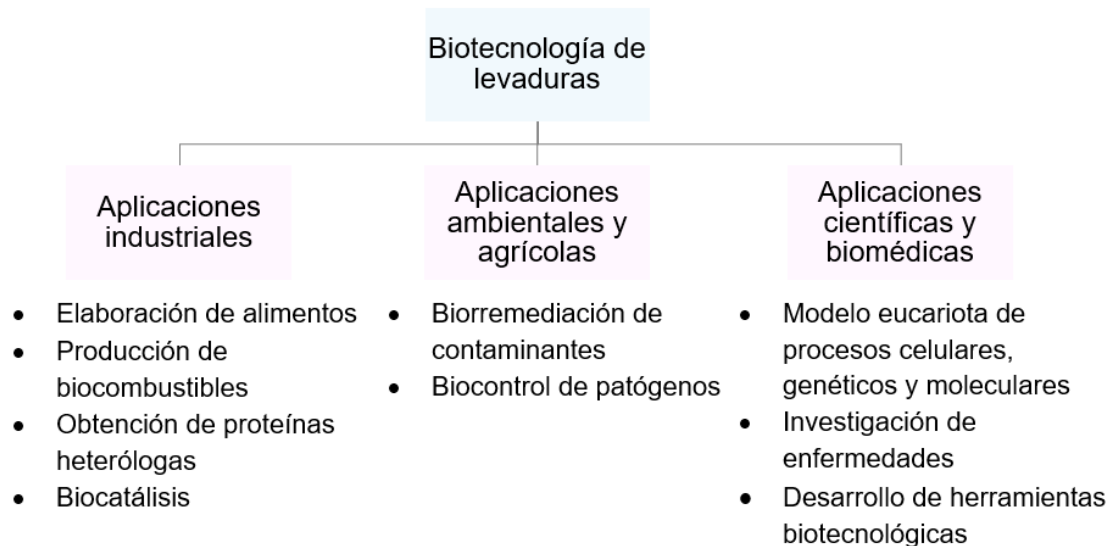


Figura 4. Campos de aplicación de la biotecnología de levaduras. Adaptado de Kurtzman et al (2011).

1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

El género *Saccharomyces* está formado por ocho especies: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricolus*, *S. eubayanus* y *S. uvarum* (Ortega, 2024). Entre dichas especies, *S. cerevisiae* es el principal organismo modelo utilizado en la investigación básica (Lohrmann, 2021) y en biotecnología a nivel global, esto se debe en gran parte a su fisiología particular y por su rol central en numerosas fermentaciones alimentarias y procesos industriales. Su metabolismo le permite desarrollarse en ambientes tanto aeróbicos como anaeróbicos. Presenta una elevada actividad metabólica, de manera que durante la fase anaerobia puede asimilar y fermentar una amplia variedad de carbohidratos de distinta complejidad, como glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa, maltotriosa e incluso dextrinas, mientras que en la fase aerobia predomina la producción de biomasa. Estas levaduras se denominan levaduras fermentativas (Kurtzman et al., 2011).

Dado su extenso uso y consumo seguro, las levaduras de la especie *S. cerevisiae* son consideradas como microorganismos Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) y

reconocidas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como inocuas. Además *S. cerevisiae* fue el primer microorganismo modificado genéticamente (OGM) empleado para la elaboración recombinante de aditivos alimentarios (Johnson, 2013).

1.2.3 Levaduras en la maduración y calidad de los quesos

Los microorganismos presentes en distintos tipos de queso son un componente fundamental, ya que participan activamente en las etapas de elaboración y en el proceso de maduración. Si bien las bacterias lácticas predominan en la microbiota del queso, las levaduras también se encuentran en cantidades significativas como flora secundaria y cumplen un rol relevante durante la maduración. Entre los géneros más representativos en quesos y leche se encuentran *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Clavispora* y *Candida* (Binetti et al., 2013; Bintsis, 2021; Cardozo et al., 2018; Kóvacs et al., 2025). Estas levaduras están presentes en diversas variedades de queso, a menudo en concentraciones elevadas, y su actividad puede resultar beneficiosa, favoreciendo el proceso de maduración, o perjudicial, provocando alteraciones en el producto. La presencia de levaduras en quesos se asocia con diversas características tecnológicas, como la capacidad de crecer a bajas temperaturas, la tolerancia a altas concentraciones de sal, la utilización o fermentación de lactosa, la resistencia a agentes sanitizantes y la adaptación a valores reducidos de actividad de agua y pH (Cardozo et al., 2018).

El queso es un alimento lácteo tradicional fresco o fermentado con una larga historia de producción. Se obtiene a partir de la coagulación de leche de vaca u otros mamíferos rumiantes, seguida de la separación del suero y su posterior maduración. En la producción de quesos se añaden fermentos primarios o “starter” constituidos generalmente por BAL quienes producen ácido láctico mediante la fermentación de lactosa (Baroni, 2021). Este proceso contribuye al desarrollo del sabor ácido, favorece la formación y contracción del coágulo, la expulsión del suero y, por lo tanto, el desarrollo de la textura característica del queso. Además, el bajo pH del producto final (aproximadamente 5,0–5,2) inhibe la proliferación de bacterias patógenas y deteriorantes. Por último, las BAL del fermento primario producen en pequeñas concentraciones compuestos aromáticos y participan en procesos proteolíticos y lipolíticos que intervienen en la maduración del queso (Gardoro, 2010). A la hora de seleccionar microorganismos como cultivos iniciadores, es importante determinar su capacidad acidificante, así como su tolerancia a la sal u otras condiciones durante la elaboración y maduración del queso para garantizar su supervivencia (Milesi et al., 2007; Ramírez Navas et al., 2016).

Además de los fermentos primarios, también se adicionan al queso los fermentos secundarios o también llamados adjuntos. Estos fermentos están constituidos por bacterias u hongos que participan en la formación de metabolitos derivados de procesos como la proteólisis, lipólisis, el metabolismo del citrato, entre otros, que contribuyen al desarrollo del *flavour*, es decir, al conjunto de atributos sensoriales determinados principalmente por el sabor y aroma y a las características funcionales durante el proceso de maduración. En dicho contexto, las levaduras desempeñan un papel clave contribuyendo al sabor, aroma y textura mediante la producción de diversos metabolitos como ácidos grasos, alcoholes, ésteres y compuestos de azufre, así como por la acción de enzimas como lipasas y proteasas (Zheng et al., 2021). A la hora de seleccionar fermentos como adjuntos es importante determinar los metabolitos que producen, dado que estos contribuyen al desarrollo del *flavour* y a la calidad final del queso.

1.3 Levaduras autóctonas

1.3.1 Definición y características

La fermentación generalmente se lleva a cabo de manera controlada, empleando microorganismos seleccionados, aunque también puede darse por microorganismos existentes de manera natural en el alimento. Las levaduras autóctonas o nativas pueden definirse como aquellas que se encuentran presentes de forma natural en el ambiente local de producción y materias primas. Estas se diferencian de las comerciales o introducidas por su adaptación al nicho ecológico específico y por reflejar las condiciones microbiológicas propias del territorio y del proceso productivo (Vera Macaya, 2020). Por su parte, las levaduras comerciales corresponden a cepas específicas de levadura que se han aislado y cultivado en laboratorio por sus características fermentativas y tecnológicas particulares (Marqués del Atrio, 2023).

Los procesos fermentativos tradicionales, de origen precolombino, contaban con una microbiota autóctona. Con la colonización y la globalización de las prácticas fermentativas, se produjo una introducción no intencional de cepas exógenas, principalmente de origen europeo, lo cual habría alterado la composición original de estas comunidades. Esta pérdida podría intensificarse debido al uso extendido de levaduras secas activas, seleccionadas en otros países, en diversas fermentaciones de interés comercial como la producción de pan, vino o cerveza. Dichas cepas foráneas pueden sustituir progresivamente a la microbiota nativa al dispersarse por medio de insectos –principalmente *Drosophila*– o a través de la actividad humana. Algunos estudios incluso señalan que, en ciertas comunidades de la Patagonia, las mujeres que elaboraban bebidas tradicionales añadían levaduras de forma intencional durante las fermentaciones (Vera Macaya, 2020).

1.3.2 Ventajas de las levaduras nativas

Al emplear microorganismos autóctonos, se puede preservar la biodiversidad microbiana local, lo cual es importante desde el punto de vista de conservación del patrimonio biológico (Flutto et al., 2024). En los sistemas lácteos artesanales, la microbiota autóctona desempeña un papel esencial en la fermentación y maduración, influenciada por factores ambientales y tecnológicos como el pH, la concentración de sal y la temperatura (Cardozo et al., 2018). Su estudio y conservación resultan relevantes para la preservación de la biodiversidad microbiana regional y para la caracterización de productos con identidad geográfica y sensorial diferenciada. Si bien las BAL, como *Lactococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*, suelen predominar en la microbiota de la leche cruda, también pueden estar presentes microorganismos no deseados, entre ellos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (incluidas bacterias, coliformes), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* e incluso *Listeria monocytogenes*, lo que implica un riesgo para la inocuidad. Aun así, en la producción de quesos tradicionales, conservar una alta complejidad microbiana en las comunidades del producto se ha asociado con efectos positivos (Sahelices Garrido-Lestache, 2018). En este contexto, el uso de levaduras autóctonas puede ser ventajoso, ya que contribuyen a características sensoriales únicas, al mismo tiempo que colaboran en la competitividad frente a patógenos. Por lo tanto, integrar levaduras autóctonas en lugar de depender únicamente de cultivos comerciales permite preservar las particularidades tradicionales del queso, asegurando diversidad funcional y sensorial, a la vez que otorga una identidad regional al producto.

1.4 Probióticos

1.4.1 Concepto y regulaciones

El término probiótico cuyo significado es “para la vida”, se ha incorporado recientemente y se utiliza actualmente para nombrar bacterias asociadas con efectos beneficiosos para humanos y animales. Teniendo en cuenta las directrices de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud, los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped (FAO/WHO 2002). Dicha definición fue incorporada en el Código Alimentario Argentino (CAA) en el año 2011 por el Instituto Nacional de Alimentos (INAL), dependiente del ANMAT (Ferrari et al., 2020). Cabe destacar que esta definición no implica necesariamente una modificación permanente en la microbiota intestinal o colonización estable, ya que el microorganismo probiótico puede ejercer sus efectos de manera local o mientras transita de manera temporal el TGI (Rosa & Péter 2006).

Diversos géneros bacterianos se emplean como probióticos, entre ellos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Streptococcus*. Asimismo, se han utilizado cepas fúngicas pertenecientes al género *Saccharomyces* (Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001; Jin et al., 2000). *Saccharomyces boulardii* aislada del fruto del lichi en Indochina por Henri Boluad, es actualmente la única levadura que ha mostrado resultados clínicamente relevantes, respaldados por ensayos doble ciego que validan su eficacia en distintas patologías gastrointestinales (Moslehi-Jenabian et al., 2010; Sazawal et al., 2006). Esta levadura, puede alcanzar altas concentraciones y mantener niveles constantes en el colon. Si bien no coloniza de forma permanente el intestino puede permanecer el tiempo suficiente para ejercer efectos beneficiosos. Además, al tratarse de una levadura, no se ve afectada por los antibióticos de tipo antibacteriano, por lo que se la considera un “probiótico farmacéutico” o “agente bioterapéutico” (Rosa & Péter, 2006).

1.4.2 Mecanismos de acción de probióticos

Los probióticos confieren beneficios al huésped mediante diversos mecanismos en el entorno intestinal (**Figura 5**). En primer lugar, ejercen exclusión competitiva al disputar por nutrientes y sitios de adhesión al epitelio intestinal, desplazando de esta forma a distintos patógenos enterales, inhibiendo su crecimiento y colonización (Latif et al., 2023; Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021). En segundo lugar, producen diversos compuestos antimicrobianos en forma de péptidos, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que reducen la carga de microorganismos indeseables (Latif et al., 2023). Cabe aclarar que si bien dicho mecanismo de acción es común en probióticos bacterianos, hasta el momento no se ha informado este tipo de acciones inhibitorias en *S. boulardii*. La acción antimicrobiana de *S. boulardii* en cambio, ocurre por vías más específicas como la neutralización de toxinas bacterianas, la reducción niveles de AMPc asociados a la diarrea, la inhibición de endotoxinas de superficie de *Escherichia coli* y la modulación de citocinas (Staniszewski & Kordowska Wiater, 2021). En tercer lugar, refuerzan la integridad de la barrera intestinal al estimular la secreción de mucinas y modular proteínas de unión estrecha (occludina, claudina-1), lo que disminuye la translocación microbiana del intestino a la circulación sanguínea (Latif et al., 2023). *S. boulardii* podría contribuir a mantener la integridad de la barrera intestinal no sólo estimulando la secreción de proteínas de unión estrecha sino también inhibiendo la interacción de patógenos con enterocitos uniéndose a ellos mediante residuos de manosa presentes en su pared celular (Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021). En cuarto lugar, los probióticos modulan la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped regulando la maduración y función de células dendríticas, y estimulan la acción de las células T, esenciales para mantener la homeostasis inmunológica. Por último, sintetizan metabolitos

bioactivos (neurotransmisores y señales químicas), como Serotonina, dopamina y ácido gamma aminobutírico (GABA) que facilitan el diálogo microbio-huésped (Latif et al., 2023). En conjunto todos los mecanismos mencionados contribuyen al antagonismo de enteropatógenos, mediando así efectos clínicos beneficiosos como la reducción de la incidencia y gravedad de enfermedades intestinales (WGO, 2023).

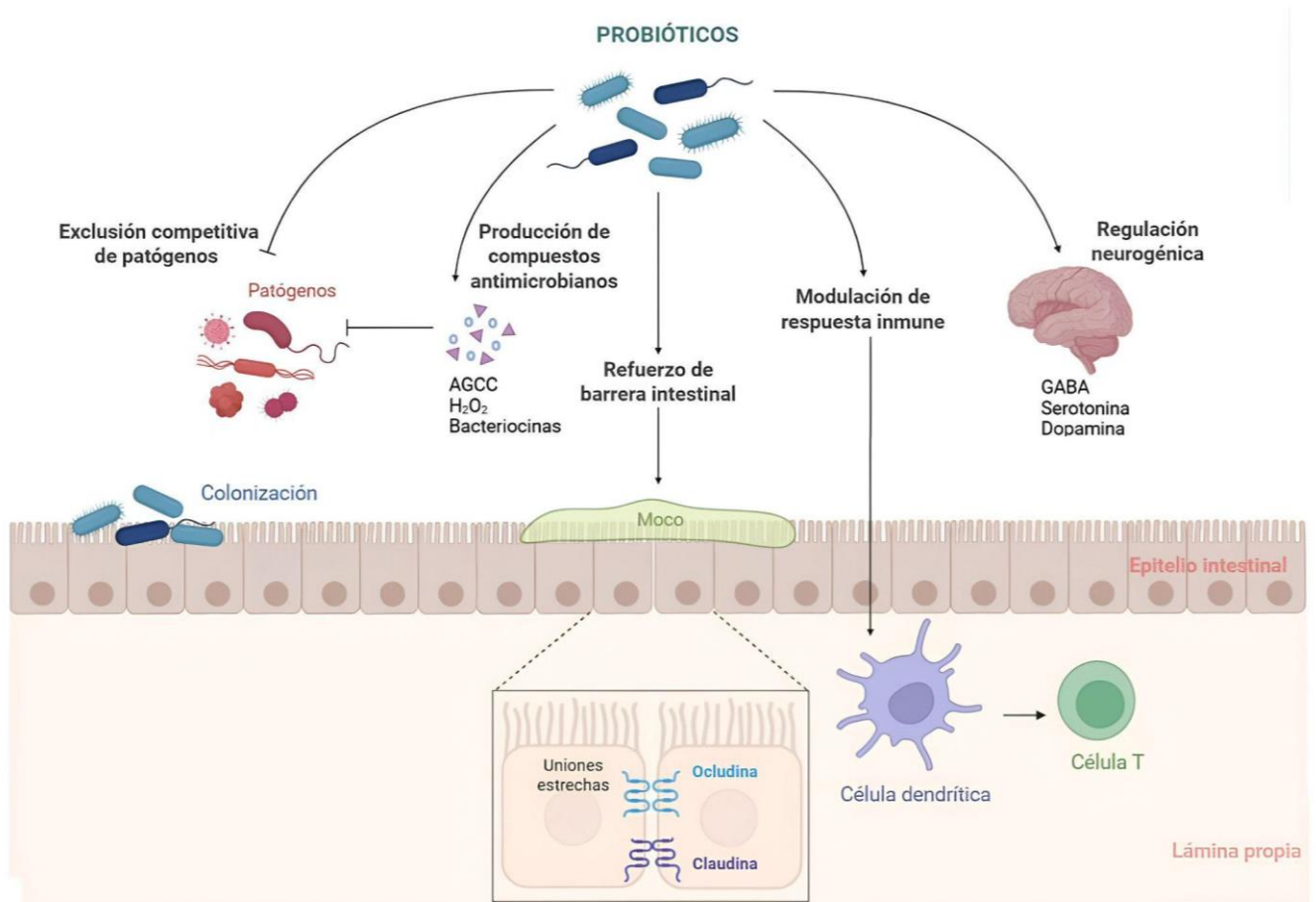


Figura 5. Mecanismos de acción de probióticos. Adaptado de Latif et al (2023). Modificado con BioRender.

Los microorganismos probióticos deben ser considerados no patógenos, es decir, deben ser (GRAS) o poseer un estatus de presunción cualificada de seguridad (QPS). A su vez, las cepas probióticas no deben interactuar entre sí, ni con la microbiota del huésped, por ende no deben tener un efecto inhibitor o bactericida frente a los microorganismos benéficos del intestino (Zavišić et al., 2023).

Resulta esencial evaluar su seguridad antes de ser comercializados como suplementos o incorporados en formulaciones. De acuerdo con la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT, 2018), el CAA establece que el uso de microorganismos con propiedades probióticas en alimentos requiere una evaluación integral que asegure su identidad, funcionalidad y seguridad antes de su comercialización. Entre los requisitos mínimos, se

establece que toda cepa probiótica debe ser identificada a nivel de especie y tipificada a nivel de cepa mediante técnicas moleculares validadas, siendo la secuenciación del gen 16S ADNr la técnica recomendada.

Por otro lado, debe realizarse una caracterización “*in vitro*” e “*in vivo*” que demuestre su resistencia a condiciones fisiológicas del TGI (ácido gástrico, bilis, lisozima) y los efectos probióticos atribuidos, respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos. A su vez debe verificarse su seguridad y la ausencia de genes de resistencia a antibióticos, actividad hemolítica o producción de toxinas. Por ello, los ensayos *in vitro*, forman parte de los requisitos establecidos por el CAA para la evaluación preliminar de los probióticos, etapa esencial antes de avanzar a estudios *in vivo* y la formulación de alimentos funcionales.

Entre los ensayos preliminares requeridos se incluyen la capacidad de supervivencia en el TGI, donde se miden parámetros como la tolerancia al pH ácido y resistencia a la bilis, que permite a los probióticos alcanzar el intestino y ejercer sus efectos beneficiosos (de Miranda et al., 2023). Una vez allí, la eficacia funcional de las cepas puede evaluarse mediante el antagonismo microbiano, un mecanismo que comprende tres aspectos principales: la interferencia con la colonización de la mucosa, la producción de compuestos antimicrobianos y la coagregación con microorganismos patógenos (Suárez, 2015). Dentro de la interferencia con la colonización, se miden propiedades como la autoagregación y la hidrofobicidad superficial, que permiten a las células adherirse entre sí y al epitelio intestinal, favoreciendo la formación de microcomunidades estables y limitando la adhesión de patógenos (Alkalbani et al., 2022; Wang et al., 2024). Por su parte, la producción de compuestos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, contribuye a inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables, mientras que la coagregación con patógenos potencia este efecto al impedir su contacto con la mucosa (Wang et al., 2024). En conjunto, estas metodologías aportan información experimental que sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a validar la funcionalidad *in vivo* y la seguridad de las cepas seleccionadas.

1.5 Técnicas para la identificación de levaduras

1.5.1 Identificación fenotípica y bioquímica

Considerando la relevancia de las comunidades microbianas, especialmente la de hongos, en las propiedades organolépticas y funcionales del queso, resulta fundamental identificar y cuantificar los distintos géneros y especies presentes, con el fin de determinar su influencia en los procesos de maduración, alteración o deterioro del producto (Sahelices Garrido-Lestache, 2018). Antes del desarrollo de los métodos moleculares y del uso de secuencias génicas en la taxonomía de

levaduras, la identificación de las especies se realizaba exclusivamente mediante pruebas fenotípicas (Rosa & Péter, 2006). Estas se basan en el análisis de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, observadas tanto a nivel macroscópico como microscópico. El examen microscópico permite evaluar rasgos como la formación de clamidosporas, la producción de pseudohifas, el modo de reproducción vegetativa y la morfología de las células. En cuanto al estudio fisiológico y bioquímico, se aplican pruebas de asimilación y fermentación de compuestos carbonados, utilización de fuentes nitrogenadas, resistencia a antibióticos, actividad ureasa, crecimiento a distintas temperaturas, desarrollo en presencia de etanol y análisis fenotípico, entre otras. No obstante, estos procedimientos suelen ser laboriosos y demandar un tiempo considerable.

En la última década, se han implementado estrategias de identificación a nivel molecular que han logrado superar las limitaciones y la variabilidad propias de las pruebas fenotípicas tradicionales. Estos enfoques se sustentan en el análisis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y tuvieron su origen en estudios de complementación del ADN nuclear, los cuales permitieron incluir dentro de una misma especie a cepas que presentaban diferencias morfológicas y fisiológicas. Se han utilizado numerosos genes como marcadores moleculares en estudios filogenéticos que abarcan diferentes géneros y especies microbianas. Entre los más empleados con propósitos taxonómicos se destacan el gen 16S ADNr en bacterias y la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) en hongos (Delgado Silva & Páramo Aguilera, 2020; Sahelices Garrido-Lestache, 2018).

1.5.2 Identificación molecular

Debido a la gran diversidad de levaduras y las limitaciones de las pruebas fenotípicas, los investigadores empezaron a recurrir a técnicas moleculares rápidas y confiables para la identificación de géneros e incluso la diferenciación de cepas, dentro de una misma especie. Entre los marcadores más empleados se encuentran los genes ribosomales 18S, 5.8S y 26S, que se organizan en múltiples copias repetidas en tándem dentro del genoma. Cada unidad ribosomal incluye regiones codificantes altamente conservadas y segmentos no codificantes conocidos como ITS, los cuales se transcriben pero no se procesan. El tamaño de los genes de ARNr es prácticamente idéntico entre especies. Por su parte, las regiones ITS, localizadas entre los genes 18S-5.8S (ITS1) y 5.8S-28S (ITS2), presentan variaciones en su longitud entre especies y constituyen una herramienta molecular efectiva para la identificación taxonómica y la delimitación de especies en levaduras y otros hongos (Fujita et al., 2001; Molina Ruíz et al., 2014).

La región ITS ha sido ampliamente adoptada como “marcador universal” para la identificación fúngica y estudios filogenéticos debido a la combinación de secuencias conservadas que permiten

el diseño de cebadores universales y regiones variables que aportan el poder discriminante. En este sentido, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado para caracterizar distintas especies fúngicas amplificando la región ITS. El par de cebadores ITS1 e ITS4, flanquean la región ITS1-5.8S-ITS2 y permiten la obtención de un fragmento cuya variabilidad es útil para la identificación a nivel de especie (White et al., 1990). La **Figura 6** ilustra esquemáticamente la organización de los genes ribosomales, ITS y la posición de los cebadores.

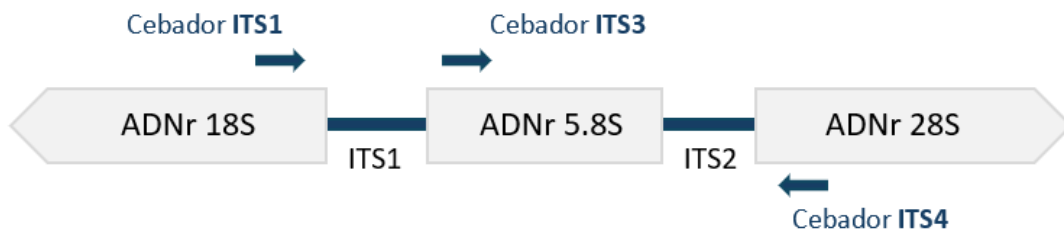


Figura 6. Representación esquemática de la región ribosomal (ADNr) en hongos, mostrando los genes 18S, 5.8S y 28S, y las regiones espaciadoras ITS1 e ITS2, junto con los sitios de unión de los cebadores ITS1, ITS2 e ITS4. Adaptado de Fujita et al. (2001).

La posterior secuenciación del amplicón obtenido y su alineamiento con bases de datos de referencia constituye una estrategia actualmente estandarizada para el reconocimiento de especies de levaduras, así como para establecer relaciones filogenéticas dentro de géneros y entre taxones próximos (Arlorio et al., 1999; White et al., 1990).

2. HIPÓTESIS

Las levaduras autóctonas aisladas de productos lácteos del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (NOBA) poseen las propiedades tecnológicas, el potencial probiótico y las características genotípicas para ser empleadas como fermentos adjuntos en la producción de alimentos lácteos fermentados con propiedades organolépticas y funcionales mejoradas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Aislar levaduras autóctonas de productos lácteos de la región del NOBA y caracterizar sus propiedades tecnológicas y probióticas *in vitro* con el fin de determinar su potencial como fermentos en la elaboración de lácteos funcionales y mejorados sensorialmente.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar morfológicamente levaduras de leche y productos lácteos de la región del NOBA.
- Confirmar el género de las levaduras por amplificación por PCR.
- Cultivar las levaduras aisladas en medios líquidos y sólidos para obtener biomasa.
- Evaluar las propiedades tecnológicas de las levaduras con el fin de emplearlas en la formulación de fermentos alternativos.
- Optimizar y poner a punto técnicas de análisis para evaluar el potencial probiótico *in vitro* de dichas levaduras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento de levaduras y caracterización morfológica

Para el aislamiento de las levaduras se tomaron muestras representativas de quesos de pasta blanda, semiblanda, duros y leche cruda provenientes de tres establecimientos lácteos del Noroeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina durante los años 2022 y 2024, sumando un total de 14 muestras. Para el aislamiento a partir de quesos, de cada muestra se pesaron alícuotas de 1 g que fueron colocadas en bolsas estériles conteniendo 9 mL de citrato de sodio al 5%. Posteriormente, la mezcla fue digerida por 1 min en Stomacher (IUL instrument, España) y a partir del homogenato obtenido se realizó la siembra en superficie en dos medios de cultivo: (1) medio sólido YPD (1% *yeast extract*, 2% *peptone*, 2% *dextrose*, 2% agar) y (2) medio sólido YPD adicionado con cloranfenicol (100 mg/L) para inhibir el crecimiento bacteriano y favorecer el aislamiento selectivo de levaduras.

En el caso del aislamiento a partir de leche, se realizaron diluciones seriadas 1:10 utilizando como diluyente agua peptonada, con los siguientes componentes: peptona de carne (10 g/L), cloruro de sodio (5 g/L), fosfato disódico (3,5 g/L) y fosfato monopotásico (1,5 g/L). El pH del medio se ajustó a $7,2 \pm 0,2$. Las diluciones fueron realizadas en cabina de flujo laminar, utilizando microtubos Eppendorf estériles. Posteriormente, se sembraron en superficie 100 μ L de las muestras sin diluir y 10^{-3} en los medios anteriormente mencionados. Las placas fueron incubadas a 30 °C por 48 h en estufa de cultivo (TDC D40, Tecno Dalvo, Argentina). Transcurrido ese tiempo, las colonias desarrolladas en los medios de cultivo fueron evaluadas macroscópicamente en cuanto a su aspecto y morfología, y luego de manera microscópica empleando microscopio óptico (Primo Star, Zeiss, Alemania). El procedimiento descrito se ilustra en la **Figura 7**. Finalmente, las colonias

seleccionadas fueron almacenadas en criotubos conteniendo glicerol al 10%, a -20 °C y -80 °C, para su cultivo y caracterización.

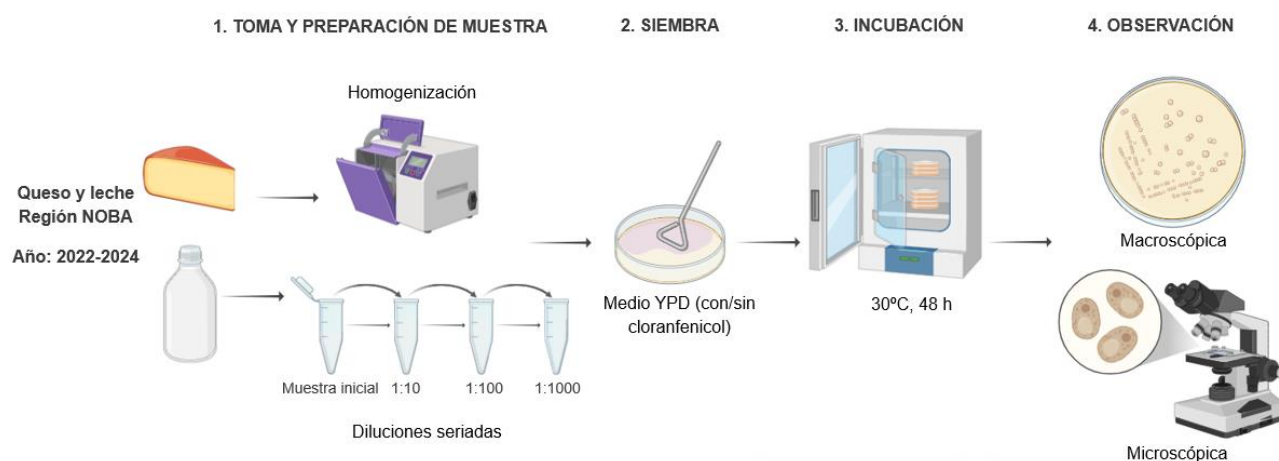


Figura 7. Esquema general del proceso de aislamiento de levaduras a partir de muestras de queso y leche cruda. Se ilustran las etapas principales del procedimiento: toma y preparación de muestras, siembra en medios selectivos, incubación y observación para la selección de colonias. Fuente: elaboración propia.

4.2 Cultivo de los aislamientos

Con el objetivo de generar biomasa, entendida como la cantidad total de células de levadura producidas durante el cultivo, los aislamientos seleccionados en el punto 4.1 se inocularon en 15 mL de medio YPD líquido y se incubaron a 30 °C y 65 rpm por 48 h en agitador orbital (MaxQTM 4450, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) para obtener el precultivo. De este precultivo, se tomó una alícuota para repicar a 20 mL de YPD líquido que fue incubado en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 595 nm (OD_{595nm}) de 0,6 – 0,8 (fase exponencial) (Alsuhaím et al., 2012), medida con espectrofotómetro UV-vis (SP-2000UV; Mettler Toledo, Estados Unidos), que se empleó como cultivo en los ensayos posteriores.

4.3 Caracterización genotípica

4.3.1 Extracción de ADN genómico total

Se utilizó la técnica de Hoffman & Winston (1987) con modificaciones. Una vez obtenida la biomasa celular, fue recolectada por centrifugación a 5000 g durante 5 min a partir de 1 mL de cultivo, descartando posteriormente el sobrenadante. La lisis celular se realizó con 200 μ L de solución de lisis conteniendo: Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM (pH= 8), EDTA 1 mM (pH=8) y perlas de vidrio (diámetro 0,45–0,52 mm). La mezcla fue sometida a vórtex por 10 seg para asegurar la ruptura mecánica de las células. El ADN genómico se extrajo y purificó con 200 μ L de la mezcla cloroformo (Laboratorios Olivieri S.R.L) /alcohol isoamílico

(Biopack, Argentina) (24:1) seguido de centrifugación a 12000 g por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y transfirió a un nuevo microtubo. A continuación, se agregó igual volumen de isopropanol frío (4 °C), mezclando por inversión y se centrifugó a 12000 g por 10 min. El sobrenadante fue descartado y se agregaron 500 µL de etanol 70% (-20 °C) para precipitar los ácidos nucleicos durante 24 h. Tras la precipitación, se centrifugó a 12000 g por 5 min, se descartó el etanol, y se dejó secar hasta evaporarse por completo. Finalmente, los ácidos nucleicos fueron resuspendidos en 50 µL de agua ultra pura libre de RNasas y DNasas (Inbio Highway) y conservados a -20 °C. La calidad del ADN obtenido fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en TAE 1X (Tris Acético 0,04 M, EDTA 1 mM pH=8) sometidos durante 60 min a 90 V.

4.3.2 Reacción PCR de la región espaciadora transcrita interna (ITS)

La amplificación por PCR se llevó a cabo según lo propuesto por Las Heras-Vázquez et al. (2003), con ligeras modificaciones. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con los siguientes componentes: Buffer de reacción TAS 1X, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,8 µM de cada cebador ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 1,5 U de Taq ADN polimerasa, 1 µL de ADN molde (aproximadamente 300 ng), agua ultra pura libre de RNasas y DNasas (Inbio Highway). Se incluyó un control positivo con la cepa de referencia *Saccharomyces cerevisiae* BY 4741 y un control negativo que contenía todos los componentes de la reacción sustituyendo el ADN molde por agua ultrapura.

La amplificación se realizó en un termociclador TC-TE, BOECO (Germany) programado de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 30 s a 94 °C para la desnaturalización, 30 s a 57 °C para la hibridación, 1 min a 72 °C para la síntesis, repetido durante 35 ciclos; y una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. Se separaron alícuotas de 12 µL del producto amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,8 % (p/v) en buffer TAE 1X a 90 V de voltaje constante durante 1 h. Los productos se visualizaron en transiluminador UV (UltraBright UV Transilluminator, MAESTROGEN).

4.4 Caracterización tecnológica

4.4.1 Propiedades tecnológicas cuantitativas

4.4.1.1 Capacidad acidificante en leche

La actividad acidificante fue determinada en leche estéril descremada en polvo reconstituida al 10% (Purísima, Argentina) adicionada con cloranfenicol (100 mg/L). Cada uno de los cultivos *over*

night (ON) fueron inoculados al 4% y la mezcla se incubó a 30 °C y 65 rpm en agitador orbital. Se determinó la variación de pH (AD8000; ADWA Instruments, Szeged) a las 0, 6 y 24 h. En paralelo se preparó un blanco con el mismo sustrato, pero sin la adición del cultivo.

4.4.1.2 Supervivencia en condiciones simuladas del queso

Se evaluó la capacidad de los aislamientos de sobrevivir en medio líquido YPD a pH =5,5 y suplementado con tres concentraciones de cloruro de sodio (2,5 – 5 y 10%). Para ello, los cultivos ON se inocularon al 6% en estos medios y se incubaron a 30 °C. Para monitorear el crecimiento se observó la presencia de turbidez en el medio y se midió la OD_{595m} a los 21 días. Las condiciones seleccionadas reflejaron las condiciones potenciales a las que estarían expuestas las levaduras durante la maduración de distintas variedades de quesos y fueron seleccionadas siguiendo los lineamientos de Atanassova et al. (2016) y Binetti et al. (2013).

4.4.2 Propiedades tecnológicas cualitativas

4.4.2.1 Producción de diacetilo-acetoína

La detección de la producción de diacetilo-acetoína se realizó mediante el método de Voges-Proskauer. Para ello se inocularon 10 µL de los cultivos ON en 10 mL de leche estéril descremada en polvo reconstituida al 10% (Purísima, Argentina) adicionada con cloranfenicol (100 mg/L). La mezcla fue incubada a 25 °C durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 2,5 mL de esta suspensión y se le agregaron 0,5 mL de α-naftol en etanol (6%) y 0,2 mL de hidróxido de sodio al 40%. La mezcla se agitó durante 30 seg y se incubó por 15 min. La reacción fue considerada positiva por aparición de un anillo rosado en la parte superior de la mezcla transcurridos los 15 min. Se incluyó un control positivo de *Streptococcus thermophilus* (STI-12, Chr. Hansen) y un blanco sin adición de cultivo como control negativo.

4.4.2.2 Actividad proteolítica y lipolítica extracelular

La actividad proteolítica extracelular se determinó siguiendo la metodología propuesta por Gardini et al. (2006) con modificaciones. Cultivos ON se sembraron en spot de 5 µL en placas de agar con 10% de leche y cloranfenicol (100 mg/L) y se incubaron en estufa de cultivo a 30°C durante 5 días. Se consideró positivo el ensayo por aparición de un halo transparente alrededor del inóculo.

La actividad lipolítica se evaluó en dos medios de cultivo diferentes. El primer medio empleado fue agar-manteca preparado según Gardini et al. (2006), donde se sembraron los cultivos en spot de 5 μ L y se incubaron durante 3 a 7 días a 30 °C. Para revelar la actividad lipolítica en este medio, se vertió una solución saturada de sulfato de cobre (20 g/L) sobre las colonias crecidas. El exceso de solución fue eliminado con agua destilada luego de 15 min. La aparición de un color verde azulado indicó un resultado positivo, debido a la formación de sales de cobre insolubles con los ácidos grasos libres. El segundo medio fue agar Tween-80 preparado según Atanassova et al. (2016). En este medio se sembraron los cultivos en spot de 5 μ L y las placas se incubaron durante 3 a 7 días a 30 °C en estufa de cultivo. Se consideró positivo el ensayo por aparición de un halo transparente alrededor del inóculo.

4.4.2.3 Asimilación de citrato

La actividad alcalinizante por asimilación de citrato se determinó en agar de Simmons siguiendo los lineamientos de Ancasi & Maraz (2014). Para ello, se prepararon tubos con el medio sólido en cuña y se realizó la siembra en estrías de los cultivos. Los tubos se incubaron durante 3 a 7 días a 30 °C. Transcurrido el tiempo, se observó el viraje del indicador de pH de verde a azul, indicando la asimilación de citrato.

4.4.2.4 Degradación de aminoácidos

Se preparó un medio base para evaluar la degradación de aminoácidos siguiendo las indicaciones de Cardozo (2010). Los aminoácidos evaluados fueron ornitina, fenilalanina, tirosina, leucina y lisina. Los cultivos se sembraron en estrías en tubos conteniendo el medio en cuña y se incubaron 5 días a 30 °C. Se consideraron positivos los tubos con viraje del indicador del amarillo al rojo, por alcalinización del medio debido a la liberación de amoníaco.

4.5 Caracterización funcional (potencial probiótico *in vitro*)

4.5.1 Supervivencia a la digestión simulada en el tracto gastrointestinal (TGI)

Inicialmente, los aislamientos se repicaron en caldo YPD (incubación a 25 °C durante 3 días), se controló su pureza (agar YPD) y se conservaron en caldo YPD + 15% glicerol a -20 °C. A partir de cultivos frescos (2 repiques sucesivos) se determinó el recuento en Agar YPD (con incubación a 25 °C durante 3-5 días). Para la evaluación de la resistencia a la digestión gastrointestinal simulada se utilizó la metodología descrita por Binetti et al. (2013) con modificaciones que se

mencionan a continuación: 40 mL de los cultivos ON desarrollados en caldo YPD fueron centrifugados (6000 g, 20 min, 8 °C) y resuspendidos en 400 µL de solución salina 0,5%. Se preparó una suspensión celular de 10 mL de solución salina 0,5% por duplicado y 20 mL de solución saliva-gástrica simulada conteniendo: CaCl₂ (0,22 g/L), NaCl, (16,2 g/L), KCl (2,2 g/L), NaHCO₃, (1,2 g/L) y pepsina bovina, (0,3% p/v). Esta última se distribuyó en dos tubos cónicos Falcon conteniendo la solución salina (10 mL en cada uno), previamente inoculados con 200 µL del cultivo activo de la cepa. De uno de ellos se extrajo una muestra de 100 µL para el recuento celular inicial (T₀). El contenido del otro tubo conteniendo la cepa y las soluciones mencionadas, fue ajustado a pH= 2,1 con HCl 1M. Esta muestra se incubó a 37 °C en un baño de agua termostatzado. Se tomaron alícuotas (100 µL) a los 30, 60 y 90 min para realizar diluciones seriadas y determinar la viabilidad (Agar YPD, 25 °C, 3-5 días) (digestión en boca y estómago). Después de los 90 min de digestión, se centrifugó un volumen de 1,8 mL (6000 rpm, 10 min, 5 °C), el sobrenadante fue removido y el pellet se resuspendió hasta el volumen original en bilis bovina al 1% (m/v) en buffer PBS. Esta suspensión celular se incubó en un baño de agua termostatzado a 37 °C durante 10 min, y se extrajo una muestra de 100 µL para evaluar la viabilidad celular (Agar YPD, 25 °C, 3-5 días) (digestión en duodeno). Luego se centrifugó un volumen de 1,6 mL (6000 rpm, 10 min, 5 °C), se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido hasta el volumen original en 0,3% (p/v) de bilis bovina más 0,1% (p/v) de pancreatina, a pH= 8,0. Se incubó por un período de 90 min a 37 °C (digestión en colon) y luego se tomó una alícuota de 100 µL para determinar viabilidad celular (Agar YPD, 25 °C, 3-5 días). Los resultados de cada etapa de digestión se expresaron como Log (UFC/mL).

4.5.2 Capacidad de autoagregación

Se determinó la capacidad de autoagregación de los aislados según Binetti et al. (2013). Para ello, alícuotas de cultivos ON se centrifugaron durante 10 min a 4800 rpm a 25 °C. El pellet obtenido, fue lavado dos veces con buffer fosfato (PB) 0,2 M (pH= 7). Los sedimentos fueron resuspendidos en 2 mL del mismo buffer y se agitaron con vórtex durante 30 seg. Luego, se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente se retiró cuidadosamente una alícuota (1 mL) de estas suspensiones de la zona superior y se midió la OD_{560nm}. La capacidad de autoagregación se calculó mediante la fórmula:

$$Au (\%) = \left(1 - \frac{OD_f}{OD_i} \right) \times 100$$

donde OD_i y OD_f son las densidades ópticas antes y después de la incubación, respectivamente. Según Binetti et al. (2013), los valores (Au%) < 30 se consideraron bajos, entre 30 y 60 intermedios y > 60 altos.

4.5.3 Hidrofobicidad

Se determinó la capacidad de los aislamientos para adherirse a los hidrocarburos según Burns et al. (2008) y Farid et al. (2021). Una alícuota de los cultivos ON se recolectaron por centrifugación a 4800 rpm durante 10 min a 5 °C, se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido, fue lavado dos veces en buffer fosfato (PB) 0,1 M (pH= 7,0) y resuspendido durante 10 seg en el mismo tampón. Se ajustó la suspensión hasta obtener una OD_{560nm} de 0,7 ± 0,05. A continuación, se mezcló un volumen de 3,0 mL de esta suspensión con 0,6 mL de xileno (Biopack, Argentina) y se agitó en vórtex durante 120 seg. Luego, se incubó a 37 °C durante 1 h para la separación de fases, se retiró cuidadosamente la fase acuosa y se registró la absorbancia a OD_{600nm}. La disminución de la absorbancia de la fase acuosa se consideró como una medida de la hidrofobicidad de la superficie celular (*H* %), calculada según la siguiente fórmula:

$$H\% = \frac{OD_i - OD_f}{OD_i} \times 100$$

donde OD_i y OD_f corresponden a las densidades ópticas antes y después de la extracción con xileno, respectivamente. Según Tyfa et al. (2015), los valores porcentuales se dividen en tres categorías: fuertemente hidrofóbicos (> 50 %), intermedios (20 – 50 %) e hidrofílicos (< 20 %).

4.5.4 Coagregación con patógenos

El ensayo de coagregación con patógenos se realizó según Kanak & Yilmaz (2025). Se incluyeron como patógenos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Todos los patógenos se incubaron a 37 °C en Tryptone Soy Broth (Britania, Argentina) durante 24 h. Paralelamente, los aislados de levadura se incubaron a 28 °C en medio YPD durante 24 h. Una alícuota de cada cultivo se centrifugó a 4800 rpm durante 10 min a 25 °C y se lavó dos veces con buffer fosfato (PB) 0,2 M (pH= 7). Luego, las suspensiones se ajustaron a una (OD_{595nm}) de 0,60 ± 0,05 y se mezclaron en una proporción 1:1. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. La capacidad de coagregación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Co (\%) = \frac{(OD_A + OD_B) - 2xOD_C}{OD_A + OD_B} \times 100$$

donde OD_A , OD_B y OD_C corresponden a las densidades ópticas de la levadura, la bacteria y la mezcla, respectivamente. Según Binetti et al. (2013), valores de ($Co\%$) < 30 se consideraron bajos, entre 30 y 60 intermedios y > 60 altos.

4.5.5 Actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de difusión en agar para determinar la actividad antimicrobiana de las levaduras (Merchán et al., 2020). *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se emplearon como patógenos objetivo en los ensayos de inhibición. Fueron incubados a 37 °C en *Tryptone Soy Broth* (Britania, Argentina) durante 24 h y luego las suspensiones de cada patógeno se ajustaron a una turbidez equivalente a una OD_{600nm} de 0,08 – 0,1 (~0,5 unidades del estándar McFarland) en solución salina estéril. Posteriormente, se sembraron 100 μ L de cada cultivo por extensión en superficie en placas de agar Müller-Hinton (Britania, Argentina) utilizando hisopos de algodón estériles. Se colocaron discos de papel de filtro estériles (aproximadamente 6 mm de diámetro) impregnados con 10 μ L de cultivos de aislados ON, incubados en medio YPD a 30 °C y ajustados a una OD_{600nm} de 0,5 – 0,6 (~3 unidades McFarland) sobre la superficie del agar previamente inoculado con los patógenos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se incluyó un control positivo con disco impregnado con 10 μ L de cloranfenicol (30 μ g por disco) y un control negativo con 10 μ L de medio YPD estéril. La actividad antimicrobiana se consideró positiva cuando se observó un halo claro de inhibición alrededor de los discos de papel de filtro.

4.6 Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, excepto el de supervivencia a la digestión TGI simulada, donde se hicieron duplicados. Los resultados obtenidos de ensayos de caracterización tecnológica cuantitativa (4.3.1) y funcional (4.5.1, 4.5.2, 4.5.3 y 4.5.4) fueron evaluados estadísticamente con el software Infostat 2020 e-versión. La normalidad de los datos se verificó con la Prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Los datos que no mostraron una distribución normal o homogeneidad de varianzas ($p < 0,05$) se analizaron con la Prueba de Kruskal-Wallis. Para comparar los efectos de los factores evaluados se utilizó ANOVA y, luego Tukey para evaluar diferencias entre tratamientos con un nivel de confianza del 95 %.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de levaduras y caracterización morfológica

Para la identificación morfológica de levaduras se empleó la observación macro y microscópica, con el objetivo de detectar aquellas que presentaran características compatibles con el género *Saccharomyces*. Para distinguir las colonias de levaduras se identificaron características visuales como su forma, color o tamaño, elevación, borde y apariencia. Estas propiedades están sujetas a cambios dependientes del entorno en el que se haya desarrollado el microorganismo. En el caso de *S. cerevisiae* sus colonias presentan tonalidades blanco-crema y textura cremosa y a nivel microscópico muestran células ovaladas de aproximadamente 5 a 10 micras (Jácome Pilco et al., 2023).

Se aislaron 14 levaduras, algunas de ellas con características macro y microscópicas extrapolables al género *Saccharomyces*. A su vez se incorporaron al estudio, 3 aislados de la colección del 2022 denominados TR, CL22 y VA22. En la **Tabla 1** se resume la información de todos los aislamientos caracterizados en el presente trabajo detallando su nomenclatura, el origen de la muestra, y condiciones de aislamiento como diluciones o si se empleó medio YPD con o sin cloranfenicol. Además, la **Figura 8** muestra los resultados de caracterización morfológica macro y microscópica de los 17 aislados.

Tabla 1. Origen y condiciones de aislamiento de las levaduras incluidas en la colección

Aislado	Año	Localidad	Dilución	Antibiótico	Morfología microscópica
<i>CL22</i>	2022	Junín	sin diluir	Sí	Células ovaladas a alargadas, ausencia de pseudohifas
<i>CL24</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células ovaladas a alargadas, ausencia de pseudohifas
<i>LE</i>	2024	Lincoln	sin diluir	No	Células ovaladas, presencia de pseudohifas
<i>LT2</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células ovaladas, presencia de pseudo-hifas
<i>LT3</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células esféricas a ovaladas, ausencia de pseudohifas
<i>LT4</i>	2024	Junín	10 ⁻³	Sí	Células ovaladas a alargadas, ausencia de pseudohifas
<i>LT5</i>	2024	Junín	10 ⁻³	No	Células alargadas, presencia de pseudohifas
<i>QL</i>	2024	Lincoln	sin diluir	Sí	Células esféricas, ausencia de pseudohifas
<i>QVA1</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células esféricas, ausencia de pseudohifas.
<i>QVA2</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células esféricas, ausencia de pseudohifas.
<i>QVA3</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células alargadas, ausencia de pseudohifas
<i>QVA4</i>	2024	Junín	sin diluir	No	Células elipsoidales, ausencia de pseudohifas
<i>TR</i>	2022	Junín	sin diluir	Sí	Células elipsoidales/alargadas, presencia de pseudohifas
<i>VA22</i>	2022	Junín	sin diluir	Sí	Células esféricas, ausencia de pseudohifas
<i>VA24</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células ovaladas, ausencia de pseudohifas
<i>VVA1</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células esféricas, ausencia de pseudohifas.
<i>VVA2</i>	2024	Junín	sin diluir	Sí	Células esféricas, ausencia de pseudohifas

Antibiótico: cloranfenicol (100 mg/mL)

Observaciones microscópicas: aumento 1000x, los tamaños son aproximados.

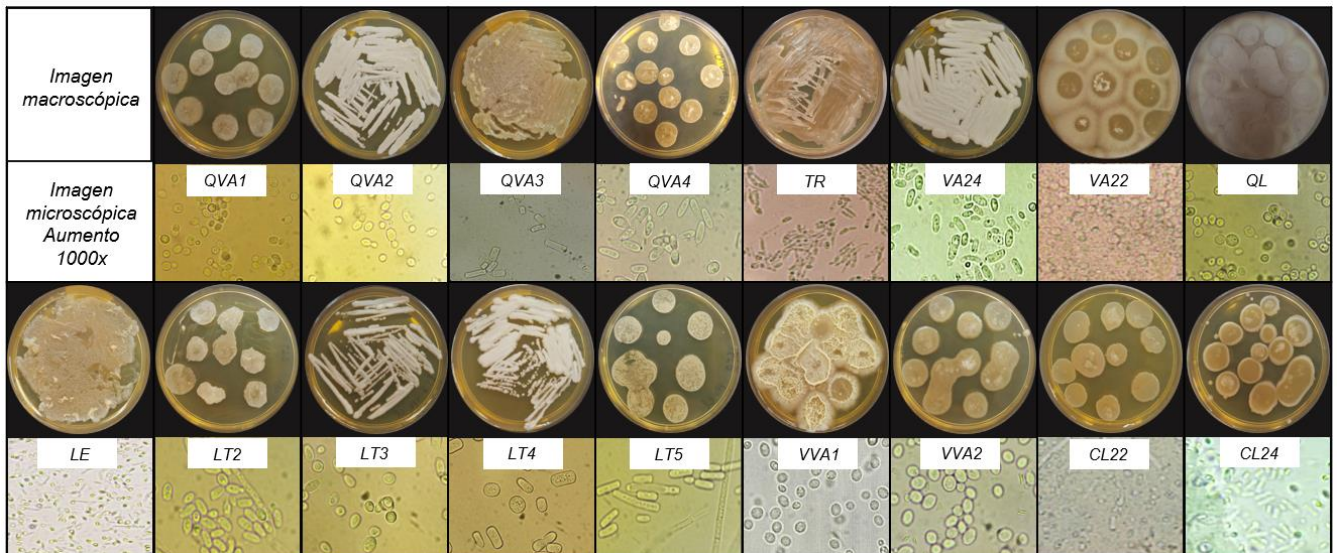


Figura 8. Vista macroscópica y microscópica de los aislados de levadura. Se observan las características morfológicas de las colonias desarrolladas en el medio YPD y la morfología celular observada mediante microscopía óptica.

5.2 Caracterización genotípica

Para la identificación molecular de levaduras, las regiones ITS del ADNr constituyen uno de los marcadores más utilizados debido a sus variaciones en su longitud entre especies. Para la caracterización genotípica de los aislados se empleó el par de cebadores ITS1–ITS4, para amplificar la región intermedia del ADNr 5.8S y las regiones adyacentes ITS1 e ITS2. En *S. cerevisiae*, la amplificación con dichos cebadores suele generar fragmentos característicos de aproximadamente 800 pb (Arlorio et al., 1999). Por ello, en este estudio se empleó la cepa de *S. cerevisiae* (BY 4741) como control positivo para confirmar el tamaño esperado de los productos de amplificación. Los patrones resultantes pueden observarse en la **Figura 9**.

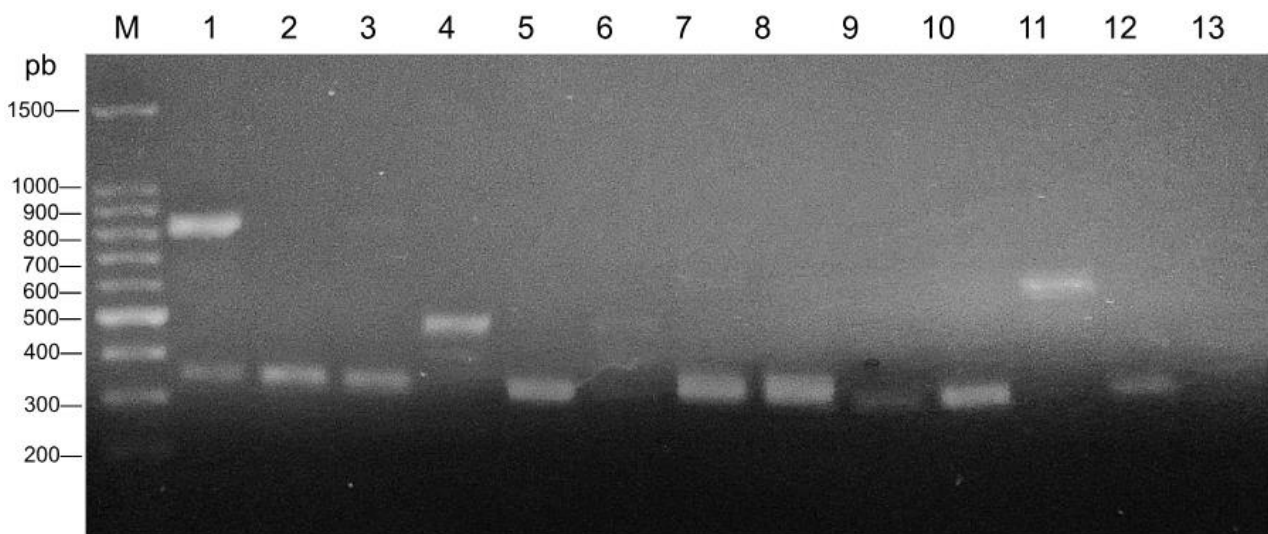


Figura 9. Fotografía de los patrones de productos de PCR para distintos aislados con los cebadores ITS1—ITS4, tras electroforesis en gel de agarosa 1,8%. Calles: M, marcador de ADN de 100 pb; 1, BY 4741; 2, QL; 3, LE; 4, QVA1; 5, QVA2; 6, VA24; 7, LT3; 8, LT4; 9, CL22; 10, CL24; 11, VVA1; 12, VVA2; 13, control negativo.

La reacción de PCR generó fragmentos de tamaños variables entre los aislados analizados. La cepa BY 4741 (control positivo) presentó un fragmento de aproximadamente 800–900 pb. Por su parte, QL, QVA2, LE, VVA2, LT4, LT3, CL22 y CL24 mostraron fragmentos dentro del rango de 300–400 pb. Los aislados QVA1 y VA24 presentaron un producto de entre 500–600 pb, mientras que VVA1 produjo un fragmento de 600 pb. Para los aislados QVA4, VA22, QVA3, LT2, TR, LT5 no se obtuvo producto de PCR.

Teniendo en cuenta el tamaño de los amplicones obtenidos por PCR-ITS, los aislamientos pueden asociarse preliminarmente a géneros de levaduras comúnmente reportados en productos lácteos, tales como *Geotrichum*, *Galactomyces*, *Clavispora*, *Candida*, *Pichia* y *Debaryomyces* (Binetti et al., 2013; Bintsis, 2021; Cardozo et al., 2018; Kóvacs et al., 2025).

5.3 Propiedades tecnológicas cuantitativas

Se determinó la actividad acidificante de los aislados con el fin de determinar su potencial empleo como fermentos primarios o “starters”. Para ello se evaluó la influencia del factor tiempo en los valores de pH medidos para cada uno de los aislamientos, mediante ANOVA de una vía. Los resultados se muestran en la **Tabla 2**. Los aislados CL24, QL, LE, LT2, LT4, LT5 y VA24 no mostraron cambios de pH a las 6 horas, pero sí una disminución significativa a las 24 h ($p < 0,05$). La mayor reducción de pH luego de 24 h de incubación fue para CL24, con una disminución de 0,38 unidades, mientras que el resto mostró reducciones de 0,13 a 0,17 unidades. En ningún caso el pH medido fue menor a 6 y no se acercó al rango esperado en la producción de quesos (5,2–5,4). Los aislados QVA1, QVA2, QVA3 y VVA2 presentaron un aumento significativo del pH tanto a las 6 como a las 24 horas respecto del tiempo 0 ($p < 0,05$). TR y VA22 mostraron una reducción significativa a las 6 horas, aunque no continuaron disminuyendo de forma significativa a las 24 h. Por último, para CL22, QVA4, LT3 y VVA1 no se observaron cambios significativos de pH en el tiempo evaluado.

Otra de las propiedades tecnológicas evaluadas fue la supervivencia en condiciones simuladas del queso, requisito fundamental para el potencial empleo de los aislamientos como fermentos. En primer lugar, se evaluó la influencia del factor concentración de cloruro de sodio en los valores de OD_{595nm} medidos para cada una de los aislados ensayados utilizando un ANOVA de una vía, con

el objetivo de determinar la tolerancia de cada uno de ellos. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Los aislados CL22 y CL24 sobrevivieron en igual medida en las concentraciones de NaCl de 2,5 a 5%, y finalmente al 10% no sobrevivieron. De manera similar, QVA3 creció mejor en medios con 2,5 y 5%, y si bien su crecimiento fue significativamente menor al 10% de NaCl ($p < 0,05$) si fue capaz de resistir esta condición. QL y QVA1 no presentaron un patrón lineal con un crecimiento significativamente mayor al 2,5% y 10% respecto al 5% ($p < 0,05$). Por otro lado, VA22 y LT3 presentaron un crecimiento significativamente mayor en 2,5% respecto de 5% y 10% de NaCl ($p < 0,05$). Un patrón similar se observó en LE, LT5 y LT4, que también mostraron diferencias significativas entre las concentraciones, con valores más altos en 2,5% y reducciones en 5% y 10% ($p < 0,05$). Por otro lado, algunos aislados no mostraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas, como LT2 y TR, cuyos valores se mantuvieron estables en las tres concentraciones evaluadas ($p < 0,05$).

Tabla 2. Evolución del pH en la leche durante 24 horas de incubación

Origen	Aislado	Tiempo (horas)					
		0		6		24	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS
Queso	CL22	6,69 ^a	0,21	6,75 ^a	0,00	6,79 ^a	0,01
	CL24	6,84 ^b	0,00	6,72 ^{ab}	0,07	6,46 ^a	0,32
	QL	6,84 ^b	0,00	6,83 ^b	0,04	6,71 ^a	0,03
	QVA1	6,72 ^a	0,00	6,88 ^b	0,01	6,82 ^b	0,01
	QVA2	6,72 ^a	0,00	6,88 ^c	0,01	6,82 ^b	0,02
	QVA3	6,72 ^a	0,00	6,86 ^b	0,01	6,83 ^b	0,04
	QVA4	6,72 ^a	0,00	6,77 ^a	0,08	6,74 ^a	0,09
	TR	6,84 ^b	0,00	6,76 ^a	0,00	6,77 ^{ab}	0,02
	VVA1	6,84 ^a	0,00	6,83 ^a	0,02	6,85 ^a	0,01
	VVA2	6,84 ^a	0,00	6,89 ^b	0,01	6,88 ^b	0,02
Leche	LE	6,85 ^b	0,00	6,74 ^{ab}	0,00	6,68 ^a	0,03
	LT2	6,85 ^b	0,00	6,81 ^{ab}	0,00	6,72 ^a	0,06
	LT3	6,90 ^a	0,00	6,91 ^a	0,03	6,86 ^a	0,06
	LT4	6,90 ^{ab}	0,00	6,91 ^b	0,02	6,77 ^a	0,01
	LT5	6,90 ^b	0,00	6,88 ^{ab}	0,01	6,75 ^a	0,01
	VA22	6,84 ^b	0,00	6,77 ^a	0,01	6,81 ^{ab}	0,01
	VA24	6,85 ^{ab}	0,00	6,86 ^b	0,00	6,69 ^a	0,01

Los datos de pH se expresan como promedio de duplicado. DS: desvío estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos de incubación ($p < 0,05$)

Tabla 3. Crecimiento de los aislados (OD_{595nm}) con diferentes concentraciones de NaCl a los 21 días

Origen	Aislado	% NaCl					
		2,5%		5%		10%	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS
Queso	CL22	0,520 ^b	0,140	0,450 ^b	0,060	0,000 ^a	0,000
	CL24	4,330 ^b	0,290	3,300 ^b	1,730	0,000 ^a	0,000
	QL	3,560 ^b	0,170	2,120 ^a	0,640	3,070 ^{ab}	0,190
	QVA1	4,380 ^b	0,820	3,000 ^a	0,260	3,640 ^{ab}	0,140
	QVA2	3,370 ^a	0,110	4,400 ^b	0,060	3,350 ^a	0,230
	QVA3	4,050 ^b	0,470	3,640 ^b	0,090	1,320 ^a	0,230
	QVA4	2,080 ^b	0,010	1,880 ^b	0,420	0,440 ^a	0,060
	TR	2,650 ^a	0,510	3,400 ^a	0,330	2,840 ^a	0,370
	VVA1	2,840 ^b	0,090	3,130 ^b	0,220	1,210 ^a	0,270
	VVA2	2,260 ^a	0,730	3,670 ^b	0,150	3,270 ^{ab}	0,340
Leche	LE	1,210 ^c	0,040	0,680 ^b	0,110	0,190 ^a	0,040
	LT2	3,200 ^a	0,160	2,810 ^a	0,830	2,530 ^a	0,310
	LT3	2,370 ^b	0,040	2,070 ^a	0,140	2,090 ^a	0,070
	LT4	2,290 ^b	0,260	1,290 ^a	0,130	1,460 ^a	0,250
	LT5	2,200 ^c	0,040	1,960 ^b	0,070	1,300 ^a	0,060
	VA22	1,390 ^b	0,110	0,800 ^a	0,120	0,660 ^a	0,370
	VA24	2,820 ^b	0,320	2,490 ^b	0,320	0,270 ^a	0,120

Los datos de OD_{595nm} se expresan como promedio de triplicado. DS: desvío estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones de NaCl ($p < 0,05$) para cada levadura

Por otro lado, se evaluó la influencia del factor del tipo de aislamiento en los valores de OD_{595nm} medidos a cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas mediante ANOVA de una vía, con el fin de determinar qué aislado se adecuaba mejor a cada una de las condiciones estudiadas. Como muestra la **Figura 10**, los aislados que mejor toleraron la concentración de 2,5% de NaCl fueron QVA1, QVA2, QVA3, CL24 y QL (**Figura 10A**). En 5% de NaCl se desarrollaron mejor los aislados QVA2, QVA3, VVA1, VVA2, CL24 y TR (**Figura 10B**). Finalmente, al 10% de NaCl los

aislados QVA1, QVA2, VVA2, TR y QL fueron los que alcanzaron los mayores valores de OD595nm (**Figura 10C**).

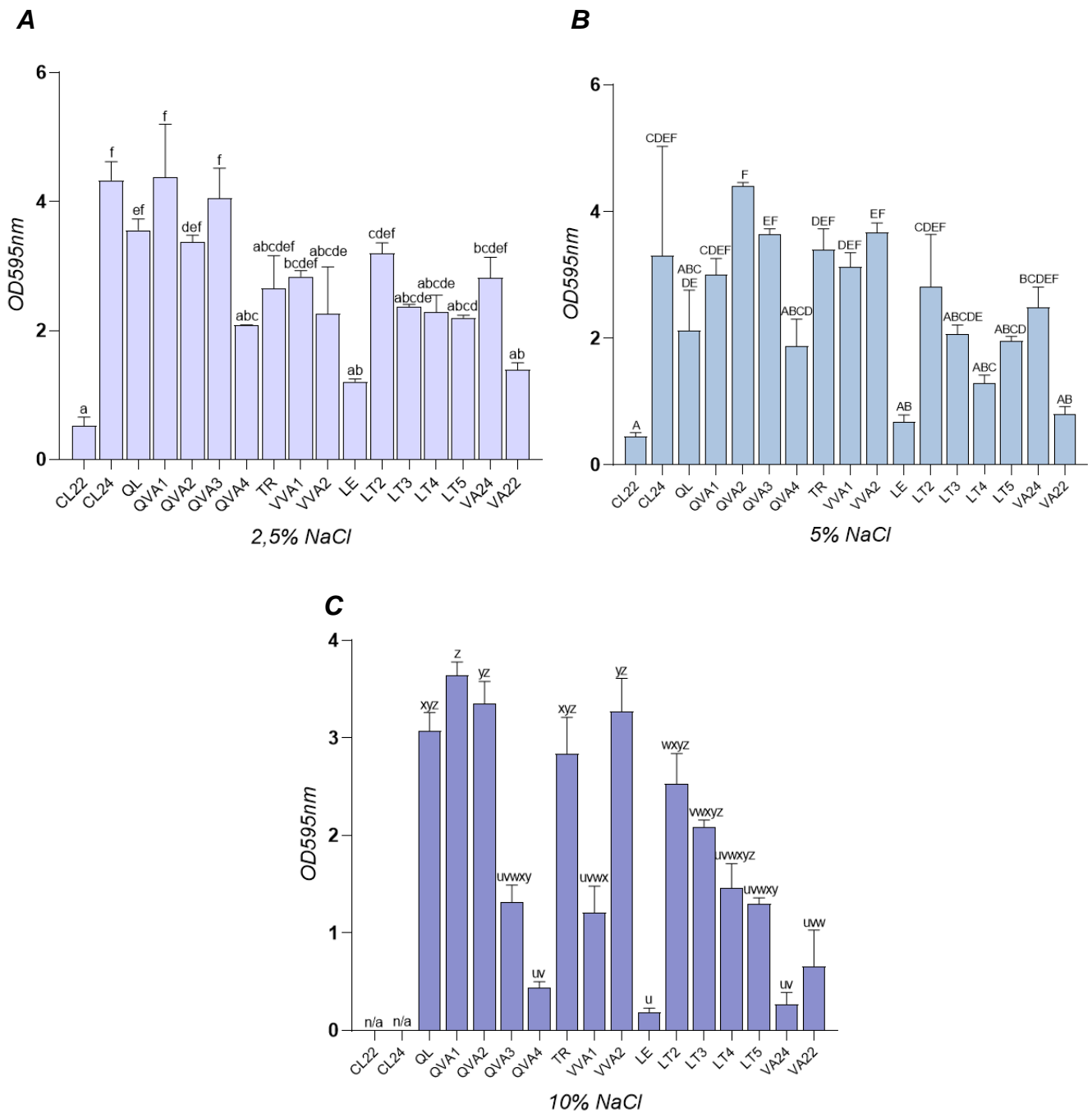


Figura 10. Valores de OD595nm medidos luego de incubación 21 días a pH 5,5 y 30°C en medio YPD adicionado con cloruro de sodio. **(A)** 2,5 % NaCl **(B)** 5% NaCl **(C)** 10% NaCl. Los datos se expresan como media de pruebas por triplicado \pm desviación estándar. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre los aislados para 2,5% de NaCl, mayúsculas para 5%, y letras uvwxyz para 10% ($p < 0,05$).

5.4 Propiedades tecnológicas cualitativas

Los ensayos presentados en esta sección tienen como objetivo determinar la generación potencial de metabolitos de interés sensorial por parte de las levaduras evaluadas, a fin de establecer si podrían emplearse en el futuro como fermentos adjuntos capaces de contribuir a un perfil distintivo. En la **Tabla 4** y **5** se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de las propiedades tecnológicas cualitativas de las levaduras en estudio, aisladas de quesos y leche. En la **Figura 11** se presentan ejemplos representativos de resultados positivos. Los ensayos negativos no mostraron cambios de color/halo/degradación en las condiciones evaluadas.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la caracterización tecnológica cualitativa de aislados de quesos

Propiedad tecnológica		Aislados									
		CL22	CL24	QL	QVA1	QVA2	QVA3	QVA4	TR	VVA1	VVA2
Producción de diacetilo-acetoína		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Actividad lipolítica	Agar Manteca	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	Agar Tween 80	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Actividad proteolítica		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Asimilación de citrato		+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Degradación de aminoácidos		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
		orn, tyr	orn, tyr	Orn	phe, leu, lys, orn, tyr	phe, leu, lys, orn, tyr	leu, orn	orn	orn		phe, orn, tyr

Resultado positivo (+)
Resultado negativo (-)
phe: fenilalanina; leu: leucina; lys: lisina; orn: ornitina; tyr: tirosina

Tabla 5. Resultados obtenidos de la caracterización tecnológica cualitativa de aislados de leche

Propiedad tecnológica	Aislados							
	LE	LT2	LT3	LT4	LT5	VA22	VA24	
Producción de diacetilo-acetoína	-	-	-	-	-	+	-	
Actividad lipolítica	Agar Manteca	-	-	+	+	+	-	-
	Agar Tween 80	-	-	-	-	-	-	-
Actividad proteolítica	+	-	-	+	-	-	-	
Asimilación de citrato	+	-	-	+	-	-	+	
Degradación de aminoácidos	+	+	+	+	+	+	+	
	orn	leu, orn, tyr	leu, orn	leu, orn	leu, orn	orn	phe, leu, lys, orn, tyr	

Resultado positivo (+)
Resultado negativo (-)
phe: fenilalanina; leu: leucina; lys: lisina; orn: ornitina; tyr: tirosina

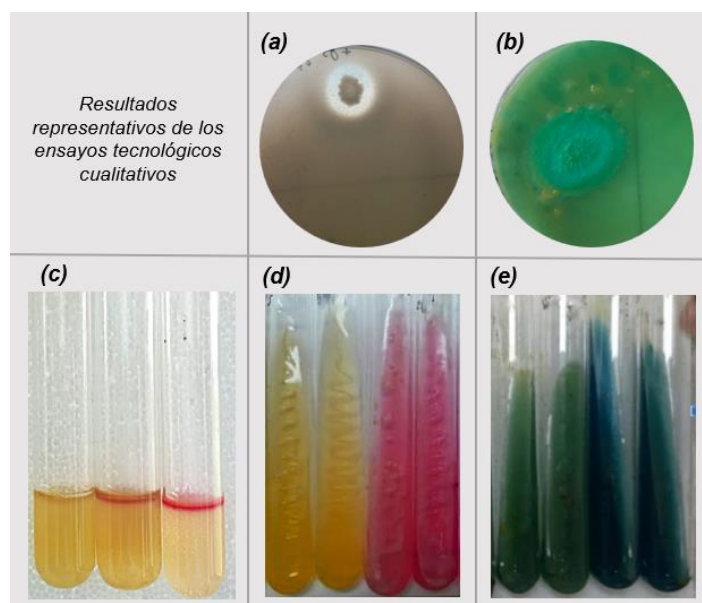


Figura 11. Imágenes representativas de reacciones positivas observadas en los ensayos cualitativos. **(a)** Halo transparente en el ensayo de actividad proteolítica. **(b)** Colonias con coloración verde característica de actividad lipolítica. **(c)** Formación de un anillo rojo indicativo de producción de diacetilo-acetoína. **(d)** Viraje de color asociado a la degradación de aminoácidos. **(e)** Viraje de color asociado a la asimilación de citrato.

Para detectar la producción de diacetilo-acetoína a partir de la leche como sustrato se realizó el ensayo de Voges-Proskauer. Los aislados TR, CL24 y VA22 resultaron positivos para dicho ensayo, evidenciado por la aparición de un halo rojo-rosa en la superficie del tubo de ensayo (**Figura 11c**) luego de llevar a cabo la reacción, y no así el resto de los aislados analizados.

La actividad lipolítica se evaluó para determinar la capacidad de las levaduras de hidrolizar triglicéridos y liberar ácidos grasos libres. En el medio agar manteca los aislados TR, CL22, CL24, VVA2, LT3, LT4 y LT5 mostraron resultados positivos al observar colonias de color verde (**Figura 11b**); además, TR y CL22 tuvieron actividad lipolítica positiva en el medio Tween 80, evidenciada por la aparición de un halo alrededor de las colonias.

La actividad proteolítica se evaluó mediante la formación de halos transparentes alrededor de las colonias en medio agar leche indicativo de la degradación de caseína (**Figura 11a**), la principal proteína de la leche. QVA1, QVA2 y LE fueron positivos para esta prueba, y no así el resto de los aislamientos.

Luego del tiempo de incubación en el agar Citrato de Simmons, se pudo observar el viraje del medio de color verde a azul (**Figura 11e**) para los aislados TR, CL22, CL24, QL, QVA1, QVA2, LE, LT4 y VA24 indicando su capacidad de utilizar el citrato como fuente de carbono y la alcalinización del medio.

Finalmente, la degradación de distintos aminoácidos se evidenció mediante el viraje del medio de cultivo de amarillo a rojo por liberación de amoníaco (**Figura 11d**). Los aislados QVA1, QVA2 y VA24 fueron los que presentaron mayor capacidad de degradación, mostrando resultados

positivos para los cinco aminoácidos evaluados: fenilalanina, leucina, lisina, ornitina y tirosina. El aislado LT2 degradó tres aminoácidos: leucina, ornitina y tirosina al igual que VVA2, que mostró actividad sobre fenilalanina, ornitina y tirosina. Por su parte, CL22, CL24 y QVA4 degradaron dos aminoácidos (ornitina y tirosina), mientras que QVA3, LT3, LT4 y LT5 lo hicieron sobre leucina y ornitina. Finalmente, TR, QL, QVA3, LE y VA22 mostraron únicamente degradación para el aminoácido ornitina.

5.5 Propiedades funcionales

Se seleccionaron los aislados VA24, QVA2, LT4, QL, TR y LE para caracterizar su potencial probiótico y poner a punto las técnicas empleadas. Adicionalmente, se incluyó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 como referencia, para evaluar dichas técnicas en un organismo bien caracterizado y ampliamente estudiado.

5.5.1 Supervivencia a la digestión simulada en el tracto gastrointestinal (TGI)

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los aislados para resistir las condiciones del TGI, se analizó su viabilidad frente a un proceso de digestión simulada que reprodujo las etapas de boca, estómago, intestino y colon. Como se muestra en la **Figura 12**, el aislado VA24 mantuvo recuentos estables durante todo el ensayo, sin reducciones en el recuento a los 190 min. Por su parte, el aislado QL disminuyó un orden logarítmico a los 190 min y la cepa BY 4741 a los 100 min. Los aislados QVA2 y LT4 redujeron su viabilidad a los 60 min y 90 min en adelante, respectivamente. En la etapa final que simula el colon (190 min), se obtuvieron recuentos $<1.10^4$ UFC/ml para estos últimos dos aislados. Los aislados LE y TR no crecieron en el medio YPD por lo que no fueron incluidos en el análisis.

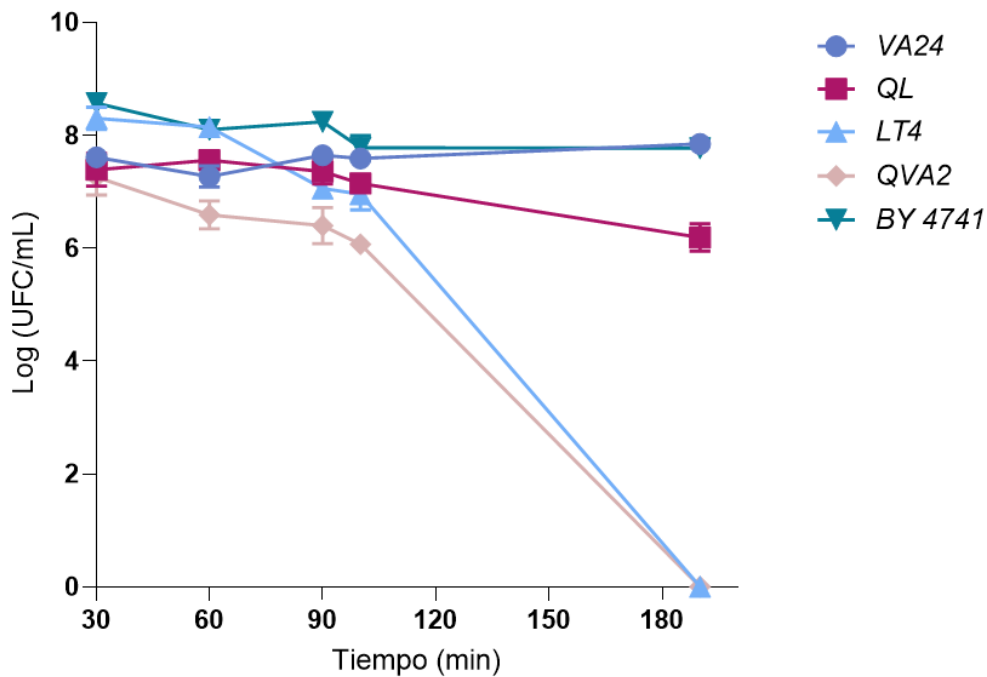


Figura 12. Sobrevida de los aislados de levadura evaluados durante la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*.

5.5.2 Capacidad de autoagregación

La autoagregación, atributo relacionado con el potencial de adherencia epitelial y de colonización intestinal, se cuantificó mediante la disminución de la densidad óptica tras la incubación de suspensiones de levadura, expresándose como porcentaje de autoagregación (% *Au*). Los resultados del ensayo se muestran en la **Figura 13**. Como puede observarse, el aislado VA24 presentó un nivel de autoagregación alto (61,43%). El aislado QL presentó un nivel intermedio y fue significativamente mayor al resto de los aislamientos ($p < 0,05$). Los aislados QVA2, TR y LT4 y la cepa BY 4741 presentaron niveles intermedios dentro del rango 38,46 a 45,73% y sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Finalmente, el aislamiento LE presentó un nivel bajo (18,10%) y significativamente menor al resto de los aislamientos ($p < 0,05$).

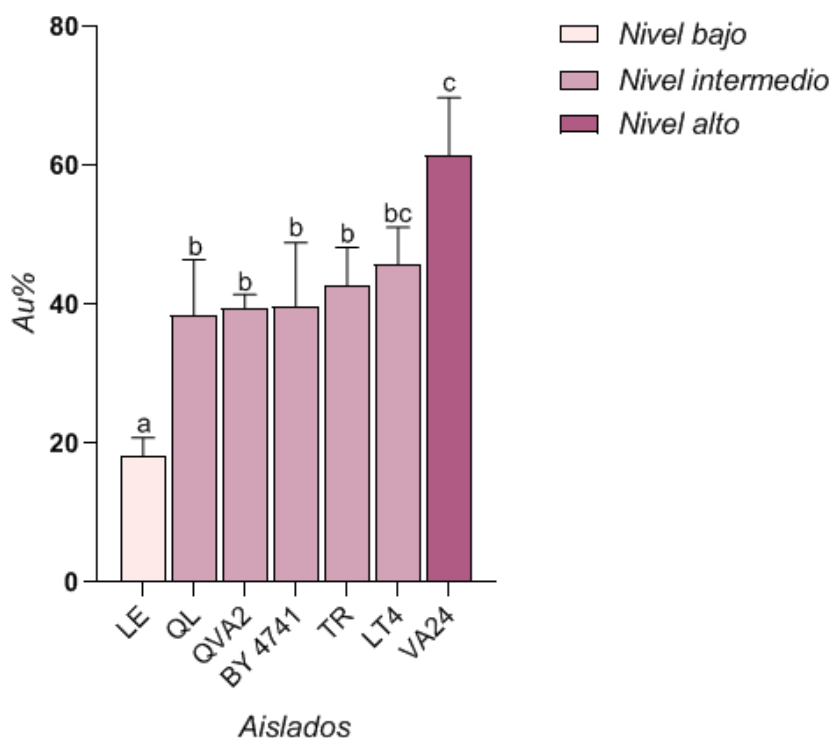


Figura 13. Porcentaje de autoagregación ($Au\%$) obtenido para los distintos aislados de levadura. Barras: media \pm DE. Clasificación: <30% baja, (30-60%) intermedia, >60% alta (Binetti et al., 2013). Los datos corresponden al promedio de pruebas por triplicado. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los aislamientos ($p < 0,05$).

5.5.3 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad superficial, relacionada con el potencial de adhesión intestinal, se determinó por la adherencia a hidrocarburos. El porcentaje de hidrofobicidad ($\% H$) se calculó a partir de la disminución de la absorbancia de la fase acuosa tras la incubación con xileno. Como se observa en la **Figura 14**, los aislados VA24, LT4, QL, TR y QVA2 exhibieron niveles altos, con valores que oscilaron entre 51,32% y 84,09% y que fueron estadísticamente mayores al resto ($p < 0,05$). Por su parte, BY4741 y LE presentaron niveles moderados (21,73%) y bajos (2,32%), respectivamente, y con diferencias entre ellos ($p < 0,05$).

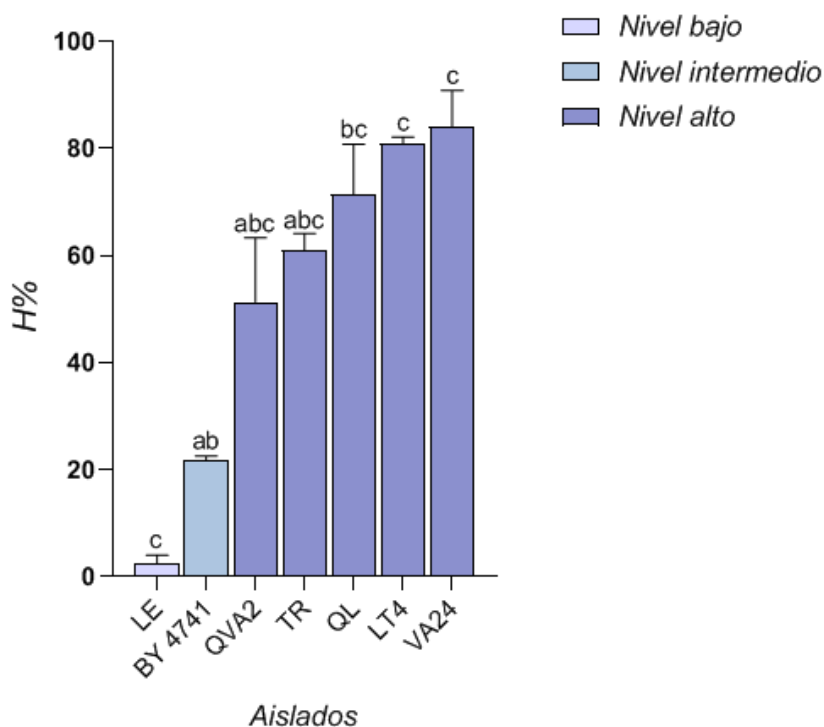


Figura 14. Porcentaje de hidrofobicidad (H%) obtenido para los distintos aislados de levadura. Barras: media \pm DE. Clasificación: baja (<20%), moderada (20–50%), alta (>50%) (Tyfa et al., 2015). Los datos corresponden al promedio de pruebas por triplicado. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los aislamientos ($p < 0,05$).

5.5.4 Coagregación con patógenos

Con el fin de evaluar la capacidad de las levaduras para interactuar con bacterias patógenas, se analizó su porcentaje de coagregación frente a cepas de referencia, parámetro que permite inferir un posible efecto competitivo en el entorno intestinal. La coagregación se determinó a partir de la disminución de la densidad óptica en las mezclas levadura-bacteria, expresándose como porcentaje de coagregación (% Co) y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 15**. Para el patógeno *S. aureus*, todos los aislados presentaron alto nivel de coagregación, con valores entre 69,5% y 96,98%. Se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada aislado y la cepa ($p < 0,05$), siendo BY 4741, VA24 y LE los que presentaron valores más altos, luego TR, QVA2 y LT4, finalmente QL. Para el patógeno *E. faecalis*, QL demostró un nivel bajo (22,95%) y significativamente menor ($p < 0,05$). En los aislados LE, LT4, QVA2, TR, VA24 se obtuvieron niveles intermedios de 34,86% a 50,57%, siendo LE y VA24 significativamente mayores al resto. Mientras que, BY 4741 presentó un nivel alto (68,32%) aunque estadísticamente no fue diferente a LE y VA24 ($p > 0,05$). Por último, con el patógeno *E. coli* se observó un comportamiento similar al obtenido con *E. faecalis* con diferencias significativas entre los aislados ($p < 0,05$). El aislado QL exhibió un valor bajo de coagregación (22,42%), mientras que el resto

presentaron niveles intermedios en el rango de 32,06% a 59,77%. Si bien la cepa BY 4741 se clasificó como intermedio, su valor fue cercano a 60% y además estadísticamente mayor al resto ($p < 0,05$).

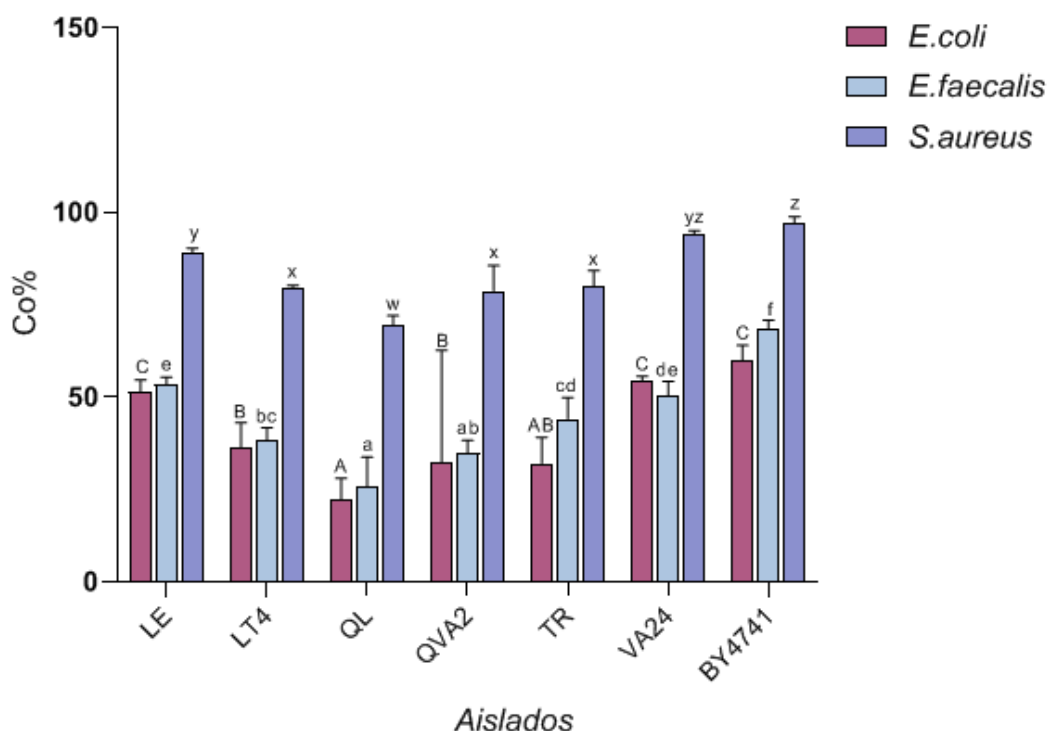


Figura 15. Porcentaje de coagregación (Co%) obtenido para los distintos aislados de levadura con patógenos. Barras: media \pm DE. Clasificación: <30% baja, (30-60%) intermedia, >60% alta (Binetti et al., 2013). Los datos corresponden al promedio de pruebas por duplicado. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas para *E. faecalis*, mayúsculas para *E. coli*, y letras xyz para *S. aureus* ($p < 0,05$).

5.5.5 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó mediante ensayos de difusión en agar Muller-Hinton, con el fin de evaluar la capacidad de las levaduras para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, aspecto relevante en la selección de microorganismos con potencial probiótico. En la **Tabla 6** se resumen los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana de los diferentes aislados de levaduras frente a *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*. Sólo se observó actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis* por los aislados LE, QL, LT4, QVA2, VA24 y la cepa BY 474. En la **Figura 16** se muestran los halos de inhibición obtenidos frente a estos aislados. Para *E. coli* y *S. aureus* no se observaron halos de inhibición por lo tanto los resultados de actividad antimicrobiana se consideraron negativos.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de aislados de levadura frente a patógenos

Actividad antimicrobiana	Patógenos		
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>LE</i>	(-)	(+)	(-)
<i>QL</i>	(-)	(-)	(-)
<i>TR</i>	(-)	(+)	(-)
<i>LT4</i>	(-)	(+)	(-)
<i>QVA2</i>	(-)	(+)	(-)
<i>VA24</i>	(-)	(+)	(-)
<i>BY 4741</i>	(-)	(+)	(-)

Resultado positivo (+) presencia de halo

Resultado negativo (-) ausencia de halo

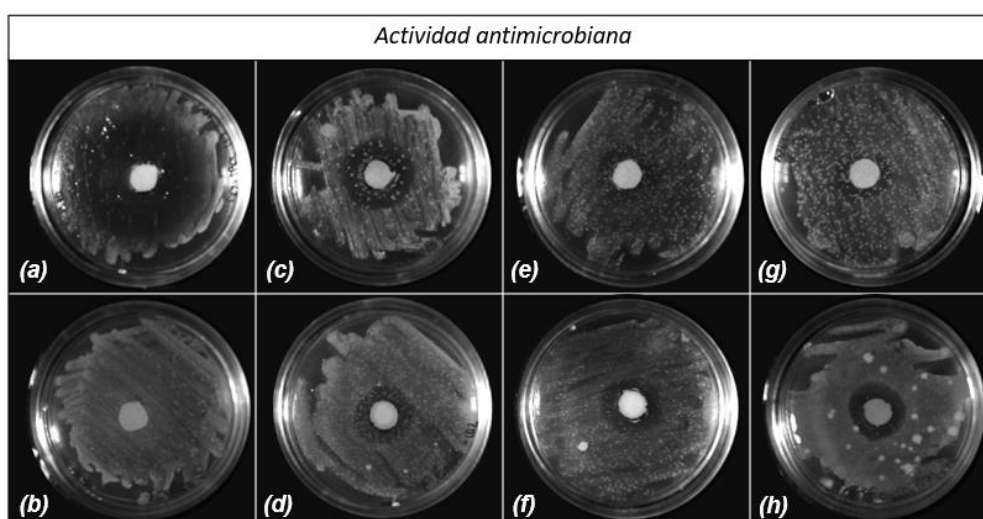


Figura 16. Ensayo de actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*. Se muestran los controles positivo (a) y negativo (b), y las colonias de levaduras que presentaron halos de inhibición: (c) *LE*, (d) *QL*, (e) *LT4*, (f) *QVA2*, (g) *VA24* y (h) *BY 4741*.

6. DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento y caracterización morfológica

La caracterización morfológica es empleada como una evaluación preliminar para la identificación de las levaduras aisladas. En este estudio, características macroscópicas como el color, forma y

textura de la colonia, junto con la observación microscópica de la forma y tamaño celular, permitieron identificar-aislamientos con morfología comparable con el género *Saccharomyces*. En el caso de *S. cerevisiae*, su color varía según el medio de cultivo en el que se encuentre, es posible identificar colonias de color blanco, crema, verde transparente o azul intenso, de forma plana y de textura espesa o cremosa. A nivel microscópico suelen ser de forma esférica u ovalada y tienen un tamaño de 5 a 10 micras (Jácome Pilco et al., 2023). Sin embargo, numerosos estudios destacan que las características morfológicas no son necesariamente concluyentes a la hora de definir especies de levaduras, esto se explica por la variabilidad que poseen los microorganismos en relación al ambiente en el que se desarrollan (Apolo et al., 2023). Un término relativamente nuevo, conocido como plasticidad fenotípica, es la capacidad de un mismo genotipo de manifestar diferentes características fenotípicas en función del ambiente. Este proceso ha sido ampliamente demostrado en *S. cerevisiae*, donde variables como el tipo de medio, la disponibilidad de nutrientes y diversos factores bióticos y abióticos pueden modificar características fenotípicas (Peliter et al., 2018). Esto dificulta una identificación certera basada únicamente en el fenotipo, y por ello es necesario recurrir a herramientas moleculares. En consecuencia, los aislamientos obtenidos deberán ser sometidos a posteriores análisis genético-moleculares, que permitirán confirmar la identidad taxonómica sugerida por la observación morfológica inicial.

6.2 Caracterización genotípica

Las regiones ribosomales (ADNr) contienen la mayor parte de los genes utilizados para analizar relaciones filogenéticas y para la identificación de hongos. Entre ellas, la región ITS, es ampliamente empleada debido a que presenta variabilidad entre especies a la vez que se mantiene relativamente conservada dentro de una misma especie, lo que la hace adecuada para diferenciar taxones (Aydin et al., 2019). La amplificación de la región ITS con los cebadores ITS1 e ITS4 produjo fragmentos de distinto tamaño para los aislados en estudio. La cepa control BY 4741 presentó una banda de 800–900 pb, compatible con lo reportado para *S. cerevisiae* (con valores aproximados entre 830–880 pb) (Fujita et al., 2001; Las Heras et al., 2003; Bockelmann et al., 2008).

Los aislados QL, QVA2, LE, VVA2, LT4, LT3, CL24 y CL22 con fragmentos entre 300–400 pb, coinciden con taxones descritos en quesos como *Galactomyces geotrichum* (380–400 pb), *Clavispora lusitaniae* (370 pb), *Geotrichum candidum* (300–400 pb), *Candida intermedia* (386 pb) y otras especies del género *Candida* (350–550 pb) (Fujita et al., 2001; Imran & Jabbar, 2015; Las Heras et al., 2003). QVA1 y VA24 con productos dentro del rango 500–600 pb, es compatible con *Geotrichum amycelinum* (555 pb) y con *Pichia anomala* (615 pb) (Bockelmann et al., 2008; Fujita et al., 2001; Las Heras et al., 2003). Finalmente, VVA1 con un fragmento de 600 pb coincide

principalmente con *Pichia anomala*; aunque *Debaryomyces hansenii* (640–650 pb) y *Kluyveromyces spp.* (*K. lactis*/*K. marxianus* 720–725 pb) están en rangos cercanos (Bockelmann et al., 2008; Imran & Jabbar, 2015). Cabe destacar que se trata de una identificación preliminar, requiere ser confirmada por secuenciación o marcadores moleculares adicionales.

6.3 Caracterización tecnológica

6.3.1 Caracterización tecnológica cuantitativa

La evaluación de las propiedades tecnológicas de las levaduras es esencial para determinar su empleo como cultivos adjuntos en la elaboración de quesos. Entre las propiedades analizadas, la capacidad acidificante es un parámetro de gran relevancia en un fermento primario o “*starter*”, ya que su acción contribuye a inhibir la proliferación de patógenos, favorecer la formación de la cuajada y disminuir el agua ligada a las caseínas (Choi et al., 2008). En este estudio, se observaron diferencias entre las levaduras analizadas. Sin embargo, la reducción de pH, no fue suficiente para justificar su uso como cultivo *starter* con el objetivo de acidificar la leche en el proceso de elaboración del queso, ya que se requiere un rango de pH final de 5,2 a 5,4 antes de llegar a la etapa de salado (Milesi et al., 2007).

Las concentraciones de cloruro de sodio empleadas en este trabajo incluyen valores relevantes para la producción de queso. Los niveles de sal típicos de los quesos oscilan entre el 0,6% y el 7% (Ramírez-Navas et al., 2016) y los valores de pH entre 4,6 y 5,8, aproximadamente según la variedad. El valor de pH utilizado en los ensayos (5,5) se encuentra dentro del rango característico de los quesos de pasta blanda y semiblanda, que según la clasificación propuesta por Trmčić et al. (2017) presentan valores de pH entre aproximadamente 5,0 y 5,8. En concordancia con lo reportado por Carrasco et al. (2006) todas las levaduras evaluadas crecieron en medios adicionados con 2,5 y 5 % de NaCl. A 10% de NaCl también se observó crecimiento en la mayoría de los aislados, excepto para CL22 y CL24, que no mostraron desarrollo. Para corroborar la supervivencia de los aislados sería necesario evaluar su comportamiento en sistemas reales de producción quesera, pero los resultados obtenidos sugieren que los aislamientos podrían emplearse en un amplio rango de variedades de queso.

6.3.2 Caracterización tecnológica cualitativa

La evaluación de las propiedades tecnológicas cualitativas fue realizada con el objetivo de determinar el potencial uso de los aislados como fermentos adjuntos o secundarios. Estos cultivos se añaden durante la elaboración del queso con la finalidad de otorgar características distintivas de aroma, sabor y textura mediante la formación de compuestos que son típicos de cada variedad

(Baroni, 2021). A diferencia de los *starters*, no participan principalmente en la acidificación, sino que contribuyen a la formación de metabolitos derivados de procesos como la proteólisis, lipólisis, metabolismo del citrato, que en última instancia aportan características sensoriales durante el proceso de maduración.

La producción de diacetilo y en menor medida su producto de reducción, la acetoína, es una característica relevante en los fermentos adjuntos, ya que estos compuestos contribuyen a las propiedades sensoriales y la calidad de los quesos, desarrollando un aroma a mantequilla, suave y dulce (Bulut Albayrak & Duran, 2021). Se los ha identificado como compuestos aromáticos característicos en distintas variedades de queso (Atanasova et al., 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que la actividad proteolítica y lipolítica de ciertas especies de levaduras puede participar en la formación de componentes precursores del aroma, además de influir en la textura del queso. La acción de las lipasas sobre los triglicéridos provoca la ruptura de los enlaces éster, liberando monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres, que repercuten en la formación del sabor.

Los ácidos grasos libres liberados pueden ser precursores de otros compuestos de sabor y aroma, como metilcetonas, alcoholes, lactonas y ésteres (Cardozo, 2010; de Miranda et al., 2023). Entre estos, los ácidos acético, octanoico y decanoico destacan por su contribución al perfil de sabor característico del producto. Los ácidos grasos de cadena corta y media se emplean como indicadores del grado de maduración, mientras que los ésteres generados aportan notas aromáticas dulces, afrutadas y florales (Cardozo et al., 2018).

La proteólisis es realizada por enzimas de la leche, el coagulante o el fermento sobre las fracciones de caseína (α -, β - y κ -) involucradas en el proceso de coagulación. A partir de este proceso se generan péptidos o aminoácidos que sirven como precursores de diversos compuestos que contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura durante la elaboración y maduración del queso (Cardozo, 2010; Zheng et al., 2021). En este estudio la actividad proteolítica y lipolítica fue variable entre aislados. Resultados similares fueron reportados por Binetti et al. (2013) quienes observaron que las levaduras aisladas de quesos presentaron una actividad lipolítica baja y una actividad proteolítica variable según la especie. La lipólisis extracelular no es frecuente en las levaduras; sin embargo, diversos estudios señalan que la especie *Y. lipolytica* se encuentra entre las especies con mayor capacidad lipolítica (Gardini et al., 2006).

El citrato, al igual que la producción de diacetilo y acetoína, son precursores importantes para los compuestos de sabor en ciertas variedades de quesos (Reinheimer, 2021). De manera similar a algunas bacterias ácido lácticas, el metabolismo del citrato por las levaduras podría dar lugar a la formación de intermediario piruvato que funciona como precursor de compuestos aromáticos, como diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol, los cuales como se mencionó anteriormente, son reconocidos por su contribución al aroma y sabor característicos de distintos tipos de queso (Silva

et al., 2023). A su vez el metabolismo del citrato es de particular importancia en quesos tipo holandés, ya que el CO₂ generado durante este proceso es el responsable de la formación de los ojos. Además, el citrato actúa como sustrato principal para los cultivos iniciadores que lo emplean como fuente de carbono y para las bacterias ácido lácticas no productoras de nitrógeno (BALNS). El citrato residual metabolizado por estas BALNS también puede contribuir a la aparición de una textura más laxa en ciertos quesos, como el cheddar (Zheng et al., 2021).

Finalmente, en cuanto a la degradación de aminoácidos, la mayoría de los estudios disponibles describen estos procesos principalmente en bacterias lácticas (Zheng et al., 2021). Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que las levaduras también podrían participar en rutas metabólicas similares, liberando compuestos volátiles de interés sensorial. Entre los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) se generan compuestos aromáticos como 3-metilbutanal, 2-metilbutanal e isobutirato asociados a notas dulces o frutales, aunque su descarboxilación o desaminación excesiva puede producir olores indeseables. La degradación de la metionina genera compuestos de azufre, como metanotiol y sulfuro de dimetilo, que aportan notas a rancio o ajo y son considerados componentes esenciales del aroma en distintas variedades de queso. Asimismo, la degradación de aminoácidos aromáticos como triptófano, fenilalanina y tirosina da origen a derivados como el benzaldehído, responsable del aroma a almendra amarga, y a compuestos como amoníaco, aminas, alcoholes, ésteres y ácidos (Zheng et al., 2021).

Por otra parte, la producción de amoníaco producto de la degradación de aminoácidos, influye en el aumento de pH, la maduración y las características sensoriales del queso. Este aumento, es un requisito fundamental para la maduración del queso (Fröhlich-Wyder et al., 2018). No obstante, una disminución marcada de los aminoácidos libres podría limitar el desarrollo de las bacterias lácticas, que los utilizan como fuente de nitrógeno. En este contexto, mantener un equilibrio entre la generación de amoníaco y la disponibilidad de aminoácidos resulta fundamental para el desarrollo microbiano global y las características sensoriales del producto (Cardozo, 2010).

6.4 Caracterización funcional

6.4.1 Supervivencia a la digestión simulada en el tracto gastrointestinal (TGI)

El estudio de las propiedades funcionales de las levaduras aisladas, fue otro de los objetivos de este trabajo, con la intención de evaluar *in vitro*, su potencial uso como probióticos. La capacidad de una cepa para resistir condiciones de pH ácido y la exposición a sales biliares es considerada un criterio esencial en la selección de microorganismos con potencial probiótico (Bolado-Martínez et al., 2009). El ambiente estomacal se caracteriza por una acidez extrema, con un pH de 2 a 3 y la presencia de enzimas digestivas como la pepsina. La mayor parte de los microorganismos, incluidas las levaduras, no logran pasar esta barrera (Alkalbani et al., 2022). La acidez del

estómago puede afectar la integridad de la membrana celular y alterar el ADN y las proteínas, lo que provoca reducciones considerables en el recuento de microorganismos viables (Ferreira et al., 2022).

Para que una cepa sea considerada probiótica, debe sobrevivir a dichas condiciones gástricas para llegar viva al intestino, donde ejerce su acción. El mecanismo que permite la supervivencia de la levadura en condiciones de pH bajo se basa en la modificación de su pared celular. Los ácidos fuertes como el HCl, presentes en el estómago, activan en la levadura la vía de integridad de la pared celular. Esta vía transmite señales de estrés hacia la GTPasa Rho1, lo que induce la formación de nuevos polímeros de carbohidratos necesarios para reforzar y remodelar la pared celular (Alkalbani et al., 2022).

El intestino delgado recibe enzimas pancreáticas y bilis del hígado, lo que genera un ambiente neutro o ligeramente alcalino debido al bicarbonato producido por el páncreas. Esto permite que enzimas digestivas secretadas por el duodeno y el páncreas actúen de forma óptima a un pH de 6 a 7. Las altas concentraciones de sales biliares y ácidos orgánicos representan un desafío para la supervivencia de las levaduras. Sin embargo, algunos microorganismos son resistentes a las sales biliares y a las enzimas hidrolíticas (Alkalbani et al., 2022). En este contexto, la supervivencia a lo largo del tracto digestivo es clave, ya que estas condiciones pueden reducir de manera significativa el número de células viables, dificultando alcanzar la dosis mínima efectiva (10^8 – 10^9 UFC) necesaria para ejercer un efecto terapéutico (Ahmadi et al., 2025).

Binneti et al. (2013) señalan que levaduras aisladas de productos lácteos pueden tolerar la digestión gastrointestinal simulada con pérdidas de hasta dos órdenes logarítmicos, por lo que podrían sobrevivir al paso gastrointestinal y alcanzar el intestino en cantidades elevadas. En nuestro trabajo, VA24 mantuvo recuentos estables durante todo el ensayo y el aislado QL y la cepa BY 4741 mantuvieron reducciones dentro de ese rango, lo que indica que lograron soportar las condiciones del modelo gastrointestinal propuesto. En cambio, QVA2 y LT4 mostraron una disminución más marcada hacia el final del ensayo, por debajo de dos órdenes logarítmicos y quedando por debajo del límite de detección.

Cabe destacar que, si bien los aislados mantienen una viabilidad y tolerancia a las condiciones del TGI en este ensayo *in vitro*, para que alcancen la dosis mínima efectiva, deben tenerse en cuenta otros factores como lo son la adherencia al epitelio intestinal, lo que permitirá en última instancia su permanencia y multiplicación, la dosis inicial y su estabilidad durante el almacenamiento. Estrategias de formulación como la microencapsulación suelen ser empleadas para proteger la viabilidad de los microorganismos desde la elaboración del producto hasta su consumo, favoreciendo que alcancen el intestino en cantidades suficientes para generar un efecto beneficioso (Ahmadi et al., 2025; Ferrari et al., 2020).

6.4.2 Capacidad de autoagregación

La autoagregación de las levaduras está condicionada por factores estructurales como la composición de la pared celular, apéndices superficiales (fimbrias) y proteínas de superficie llamadas floculinas o adhesinas que se unen a residuos de azúcares o aminoácidos presentes en dichas células (Alkalbani et al., 2022; Wang et al., 2024). Por ende, esto podría explicar las diferencias observadas entre los aislados analizados. La formación de agregados celulares por parte de las levaduras, favorece su adhesión a la mucosa intestinal, otorgando ventajas a la hora de colonizar el TGI y contribuye a disminuir infecciones por bacterias patógenas. La formación de estos agregados otorga protección en un ambiente en condiciones adversas, como lo es el TGI al ser colonizado por patógenos bacterianos entéricos. Además, la agregación resulta esencial para que las células no sean eliminadas de forma inmediata mediante movimientos peristálticos (Menezes et al., 2020). En este estudio, los valores de autoagregación de los aislamientos fueron mayormente intermedios, coincidiendo con lo reportado por Binetti et al. (2013).

6.4.3 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la superficie más externa de los microorganismos es otra de las propiedades características de las cepas probióticas. Esta condición se traduce en una mayor capacidad de adhesión y colonización por parte de los probióticos a las células epiteliales del TGI, donde pueden ejercer su acción (Alkalbani et al., 2022). En el presente trabajo, esta propiedad fue variable y dependiente de la cepa, aunque con una tendencia a valores altos. Estos valores son comparables a los reportados por Perpetuini et al. (2019), quienes observaron valores entre 55 % y 81% en levaduras aisladas de productos lácteos.

La eficacia de este proceso, depende de la naturaleza de la superficie celular, así, células con mayor hidrofobicidad en su superficie, muestran una fijación más intensa en superficies hidrofóbicas. La mucosa gástrica y el colon en los seres humanos, es altamente hidrofóbica, debido a la presencia de una capa de fosfolípidos tensioactivos que cubre el epitelio. Inicialmente, los probióticos se adhieren de forma reversible a la mucosa mediante interacciones hidrofóbicas; luego, este contacto se fortalece gracias al acoplamiento específico de adhesinas con receptores del moco o de las células intestinales, favoreciendo una colonización eficaz en el TGI (Alkalbani et al., 2022; Wang et al., 2024). La alta hidrofobicidad de la superficie celular, se ha vinculado, con una mayor permanencia de cepas probióticas en el tracto digestivo, incluso después de interrumpir su administración, con efectos diferenciales en la salud (Binetti et al., 2013).

6.4.4 Coagregación con patógenos

La coagregación de levaduras con patógenos, crea un microambiente con un aumento en la concentración de sustancias que inhiben el crecimiento bacteriano y evitan la adhesión de patógenos a receptores específicos del epitelio intestinal. En levaduras del género *Saccharomyces*, la formación de complejos levadura-bacteria, facilita la eliminación de patógenos y como consecuencia, disminuye su proliferación durante procesos infecciosos (Alkalbani et al., 2022; Yocheva et al., 2024). Algunos estudios han demostrado que especies como *S. boulardii*, *S. cerevisiae*, *Pichia kluyveri* exhibieron patógenos capturados en su superficie. La formación de dichos complejos podría explicarse por la naturaleza de las paredes celulares de levaduras, ricas en manosa, y la unión de bacterias patógenas con dichos residuos, limitando o impidiendo la interacción con células epiteliales (Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021). Esta propiedad podría prevenir infecciones entéricas al favorecer la eliminación de microorganismos patógenos del lumen o al competir directamente por los sitios de adhesión en el epitelio, impidiendo su fijación (Binetti et al., 2013). *S. boulardii* es una levadura probiótica reconocida y comercialmente disponible que se utiliza para el tratamiento de trastornos del TGI, como los síntomas de diarrea (Pais et al., 2020). Se han reportado valores de coagregación entre 60 y 85% para la cepa *S. boulardii* CNCM I-745 con los tres patógenos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Escherichia coli* K88 (Kil et al., 2023). Los valores obtenidos en nuestro estudio muestran que varios de los aislados presentan niveles comparables a los de esta cepa probiótica. Frente a *S. aureus*, todas las levaduras evaluadas exhibieron porcentajes altos (entre 69,5% y 96,98%), dentro o incluso por encima del rango informado para *S. boulardii*. Para *E. faecalis* y *E. coli* se observó más variación, la mayoría de los aislados alcanzaron valores intermedios. Aun así, aislados como LE, VA24 y la cepa BY 4741 presentaron niveles cercanos a los de *S. boulardii*, especialmente para *E. coli* (~60%).

6.4.5 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas es considerada otra característica importante de las cepas probióticas. La acción antagonista de los aislados de levadura frente a patógenos se asocia con su aptitud para competir por nutrientes, generar ácidos orgánicos, producir elevadas concentraciones de etanol y secretar compuestos antimicrobianos, entre ellos toxinas (Wang et al., 2024). Se ha reportado que algunas cepas de *S. boulardii* producen ácido acético que ejerce un efecto antimicrobiano frente a *E. coli*. El aumento de dicho ácido se traduce en una disminución en el pH, condición clave para la actividad antimicrobiana de ácidos orgánicos de cadena corta (Pais et al., 2020). Las propiedades antimicrobianas de las levaduras, como la secreción de micocinas, podrían potenciar su relevancia en formulaciones probióticas o como

parte de la microbiota en fermentos (Binetti et al., 2013). En este estudio, los aislados inhibieron el crecimiento del microorganismo patógeno *E. faecalis*, una bacteria comensal del TGI, que en contextos de disbiosis puede volverse oportunista y causar infecciones. Esto gracias a sus factores de virulencia como la formación de biopelículas, su alta capacidad de adherencia y resistencia al estrés oxidativo. Dado que *E. faecalis* presenta resistencia a antibióticos, la capacidad inhibitoria de los aislados podría aportar un beneficio para limitar su proliferación cuando los antibióticos resultan menos efectivos (Daca & Jarzembowski, 2024). Por otro lado, la ausencia de actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus* fue consistente con estudios previos donde levaduras con potencial probiótico aisladas de queso (*P. kudriavzevii*, *S. cerevisiae*) no exhibieron actividad antimicrobiana frente a estos patógenos (Wang et., al 2024).

7. CONCLUSIÓN

El presente trabajo permitió caracterizar levaduras autóctonas aisladas de productos lácteos de la región, evaluando sus características genotípicas, sus propiedades tecnológicas asociadas al proceso de elaboración y maduración del queso y su potencial probiótico.

En primer lugar, la caracterización genotípica mediante PCR-ITS sugirió la pertenencia a géneros comúnmente reportados en productos lácteos, tales como *Geotrichum*, *Clavispora*, *Candida*, *Pichia* y *Debaryomyces*. Sin embargo, esta identificación se considera preliminar, la confirmación taxonómica de los aislados requerirá secuenciación de la región ITS y análisis de patrones de restricción u otras herramientas moleculares.

Desde el punto de vista tecnológico, los resultados sugieren que los aislados evaluados en este estudio no serían adecuados para emplearse como cultivos iniciadores o “*starters*”, ya que ninguno logró descender el pH al rango 5,2 a 5,4. Sin embargo, la capacidad de los aislados de sobrevivir condiciones de salinidad y pH encontradas en los quesos, así como las capacidades fermentativas y enzimáticas demostradas sugieren su potencial empleo como fermentos adjuntos que contribuyan a la generación de compuestos de aroma y sabor para mejorar el perfil sensorial del producto final. En este contexto, los aislados QVA2 y QVA1 serían los más prometedores para su uso como fermentos adjuntos en quesos dado que fueron los más robustos frente a las condiciones de salinidad y pH, mostraron actividad proteolítica, asimilación de citrato y degradaron los cinco aminoácidos evaluados. TR y CL24 también podrían ser candidatos de interés ya que mostraron actividad lipolítica y producción de diaceto-acetoína positivas, además de asimilar citrato y resistir diferentes condiciones de salinidad.

En cuanto a la caracterización funcional, los resultados permitieron identificar diferencias entre las levaduras evaluadas y determinar cuáles presentan un mayor potencial probiótico. En conjunto, los resultados demostraron que el aislado VA24 se posiciona como el mejor candidato, dado que mantuvo una alta viabilidad durante la simulación gastrointestinal, presentó niveles elevados de hidrofobicidad y coagregación, y exhibió actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*. El aislado QL también mostró atributos relevantes, particularmente su viabilidad en la digestión simulada, su elevada hidrofobicidad, además de actividad antimicrobiana, aunque su capacidad de autoagregación y coagregación con algunos patógenos fueron intermedias.

La caracterización de levaduras autóctonas permite relevar la diversidad genética y funcional que las distingue de las levaduras comerciales, representando una alternativa innovadora para la industria láctea local. A futuro, se propone evaluar el uso de estos aislados en la producción de

quesos y determinar su capacidad de crecer de forma conjunta con las bacterias lácticas utilizadas como fermento primario, así como su real impacto en la calidad final del producto. Además, si bien los ensayos preliminares realizados son esenciales para cumplir con los requisitos del CAA, garantizando la seguridad y eficacia de las cepas probióticas evaluadas, para confirmar su funcionalidad y su real impacto en la salud humana se requiere la realización de estudios *in vivo*, siguiendo los lineamientos establecidos por la FAO/WHO.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). (2018). *Capítulo XVII: Alimentos de régimen o dietéticos* [Código Alimentario Argentino]. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat-capitulo_xvii_dieteticosactualiz_2018-12.pdf
- Ahmadi, M., Hashempour-Baltork, F., Shojaee-Aliabadi, S., Jabarzadeh Marand, M., Shahraz, F., Mortazavian, A. M., & Hosseini, S. M. (2025). Effect of yeast cell wall and β -glucan on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 encapsulated in spray-dried cross-linked alginate microcapsules. *LWT*, 222, 117662. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117662>
- Alkalbani, N. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Olaimat, A. N., Liu, S. Q., Shah, N. P., Apostolopoulos, V., & Ayyash, M. M. (2022). Assessment of Yeasts as Potential Probiotics: A Review of Gastrointestinal Tract Conditions and Investigation Methods. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(4), 365. <https://doi.org/10.3390/jof8040365>
- Alsuhaím, H., Vojisavljevic, V., Pirogova, E. (2013). Efectos de la exposición a microondas no térmicas sobre la tasa de proliferación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En: Long, M. (ed.) Congreso Mundial de Física Médica e Ingeniería Biomédica, 26-31 de mayo de 2012, Pekín, China. Actas de la IFMBE, vol. 39. Springer, Berlín, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29305-4_14
- Alvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (11), 1567–1576. <https://doi.org/10.1086/320518>
- Ancasi, E. G., & Maraz, F. A. (2014). Biodiversidad y estudio biotecnológico de levaduras en quesos de cabra procedentes de valles y de la Quebrada de Humahuaca, Jujuy, Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 24–34.
- Apolo, D., Fernández, JM, Benítez, Á., Figueroa, JG, Estrada, K. y Cruz, D. (2023). Caracterización fenotípica y molecular de la diversidad de levaduras asociada al proceso de fermentación poscosecha de frutos de café en el sur de Ecuador. *Diversity*, 15 (9), 984. <https://doi.org/10.3390/d15090984>
- Arlorio, M., Coisson, J., & Martelli, A. (1999). *Identification of Saccharomyces cerevisiae in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA*. *European Food Research and Technology*, 209, 185–191. <https://doi.org/10.1007/s002170050477>
- Atanassova, M. R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I. C., Garabal, J. I., & Centeno, J. A. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiology*, 53, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.012>
- Aydin, M., Kustimur, S., Kalkanci, A., & Duran, T. (2019). Identification of medically important yeasts by sequence analysis of the internal transcribed spacer and D1/D2 region of the large ribosomal subunit. *Revista Iberoamericana de Micología*, 36(3), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2019.05.002>

- Baroni, D. N. (2021). *Fermentos naturales de leche: Su obtención y aplicación en la quesería artesanal ovina* [Trabajo final integrador, Universidad Nacional del Litoral].
- Berdan, R. (12 de abril, 2022). *Microscopy of yeast*. MotiC Microscopes. <https://moticmicroscopes.com/blogs/articles/microscopy-of-yeast>
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suárez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 434–444. <https://doi.org/10.1111/jam.12228>
- Bintsis T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS microbiology*, 7(4), 447–470. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021027>
- Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., & Krusch, U. (2008). Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *International Dairy Journal*, 18(10), 1066–1071. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.008>
- Bolado-Martínez, E., Pérez-Morales, R., & Acedo-Félix, E. (2009). An alternative method for evaluation of resistance to low pH and bile salts in probiotic characterization of *Lactobacillus reuteri* strains: A technical note. *Revista Científica*, 19(1),93–96. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592009000100014&lng=es&lng=en
- Britannica Editors. (5 de noviembre de 2025). *Yeast*. *Encyclopaedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/yeast-fungus>
- Bulut Albayrak, Ç., & Duran, M. (2021). Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. *LWT - Food Science and Technology*, 150, 112053. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112053>
- Burini, J. A. (2022). *Desarrollo de cultivos iniciadores cerveceros basados en levaduras nativas para la producción de bebidas fermentadas con alto valor agregado* [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche].
- Burns, P., Vinderola, G., Binetti, A., Quiberoni, A., de los Reyes-Gavilán, C., & Reinheimer, J. (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal*, 18(4), 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.012>
- Cardozo, M. C. (2010). *Flora de levaduras en quesos artesanales de Corrientes: Su actividad bioquímica y su interacción con bacterias de starters* [Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste]. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional del Nordeste (RIUNNE)
- Cardozo, M. C., Fusco, Á. J. V., & Carrasco, M. S. (2018). Microbiota levaduriforme en quesos artesanales de Corrientes, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.006>
- Carrasco, M., Moragues, L., Vignatti, C., Scarinci, H., & Simonetta, A. (2006). Characterisation and technological aspects of yeasts isolated from raw milk and different types of cheeses produced in Argentina. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61(1), 16–22. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/78035>

- Choi, J., Horne, D. S., Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2008). Effects of the concentration of insoluble calcium phosphate associated with casein micelles on the functionality of directly acidified cheese. *Journal of dairy science*, 91(2), 513–522. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0454>
- Daca, A., & Jarzembowski, T. (2024). From the Friend to the Foe-Enterococcus faecalis Diverse Impact on the Human Immune System. *International journal of molecular sciences*, 25(4), 2422. <https://doi.org/10.3390/ijms25042422>
- de Miranda, N. M. Z., de Souza, A. C., de Souza Costa Sobrinho, P., Dias, D. R., Schwan, R. F., & Ramos, C. L. (2023). Novel yeasts with potential probiotic characteristics isolated from the endogenous ferment of artisanal Minas cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(2), 1021–1033. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01002-5>
- Delgado Silva, H. D., & Páramo Aguilera, L. A. (2020). Identificación molecular de microorganismos aislados de quesera artesanal ubicada en la Libertad-Chontales, Nicaragua. *Revista Ciencia Y Tecnología El Higo*, 10(2), 62–78. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v10i2.10554>
- FAO/WHO (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.
- Farid, W., Masud, T., Sohail, A., Ahmad, N., Naqvi, S. M. S., Khan, S., Ali, A., Khalifa, S. A., Hussain, A., Ali, S., Saghir, M., Siddeeg, A., & Manzoor, M. F. (2021). Gastrointestinal transit tolerance, cell surface hydrophobicity, and functional attributes of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from indigenous dahi. *Food Science & Nutrition*, 9(9), 5092–5102. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2468>
- Ferrari, A., Vinderola, G., & Weill, R. (2020). *Alimentos fermentados: Microbiología, nutrición, salud y cultura* (1.ª ed.). Instituto Danone del Cono Sur.
- Ferreira, I., de Sousa Melo, D., Menezes, A. G. T., Fonseca, H. C., de Assis, B. B. T., Lacerda Ramos, C., Magnani, M., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2022). Evaluation of potentially probiotic yeasts and *Lactiplantibacillus plantarum* in co-culture for the elaboration of a functional plant-based fermented beverage. *Food Research International*, 160, 111697. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111697>
- Flutto, T., Merlet, M., Thedy, L., et al. (2024). Caracterización bioquímica de YoAlp®: Una leche fermentada de oveja obtenida con cultivos iniciadores autóctonos. *European Food Research and Technology*, 250, 1755–1763. <https://doi.org/10.1007/s00217-024-04517-9>
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2018). Cheese yeasts. *Yeast*, 36(1), 39–53. <https://doi.org/10.1002/yea.3368>
- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S., & Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3617–3622. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001>

- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M. E., & Lanciotti, R. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology*, 23(7), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.005>
- Gardoro, M. C. (2010). *Flora de levaduras en quesos artesanales de Corrientes: Su actividad bioquímica y su interacción con bacterias de starters* [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Nordeste]. <https://repositorio.unne.edu.ar/>
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
- Imran, Z., & Jabbar, A. (2015). Molecular taxonomy of *Galactomyces* spp. and *Dipodascus capitatus* associated with dairy based on rDNA sequence analysis in Iraq. *International Journal of Medical Science and Clinical Invention*. <https://doi.org/10.18535/ijmsci/v2i12.06>
- Jácome Pilco, C., Moreno Mejía, C., Mazabanda Toalombo, R., Merino Azogue, D., & Patín Báez, M. (2023). Identificación y cuantificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación de mostos de vinos. *LATAM Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, 4(1), 2430–2445. <https://doi.org/10.56712/latam.v4i1.427>
- Jin, L. Z., Marquardt, R. R., & Zhao, X. (2000). A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9), 4200–4204. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4200-4204.2000>
- Johnson E. A. (2013). Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts--the ascomycetes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 503–517. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4497-y>
- Kanak, E. K., & Öztürk Yılmaz, S. (2025). Determination of the probiotic and functional properties of yeasts isolated from different dairy products. *Fermentation*, 11(2), 104. <https://doi.org/10.3390/fermentation11020104>
- Kil, B. J., Pyung, Y. J., Park, H., Kang, J. W., Yun, C. H., & Huh, C. S. (2023). Probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* GILA with alleviating intestinal inflammation in a dextran sulfate sodium induced colitis mouse model. *Scientific reports*, 13(1), 6687. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33958-7>
- Kovács, M., Pomázi, A., Taczman-Brückner, A., Kiskó, G., Dobó, V., Kocsis, T., Mohácsi-Farkas, C. y Belák, Á. (2025). Detección e identificación de levaduras transmitidas por los alimentos: una descripción general de los métodos relevantes y su evolución. *Microorganisms*, 13 (5), 981. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13050981>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A taxonomic study* (5th ed.). Elsevier.
- Las Heras-Vázquez, F. J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J. M., & Rodríguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*, 3(1), 3–9. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2003.tb00132.x>

- Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023). Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1216674. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>
- Leeuwendaal, N. K., Stanton, C., O'Toole, P. W., & Beresford, T. P. (2022). Fermented Foods, Health and the Gut Microbiome. *Nutrients*, *14*(7), 1527. <https://doi.org/10.3390/nu14071527>
- Lohrmann, J. (2021). *Caracterización de levaduras no convencionales de la Patagonia para la producción de whisky con características sensoriales distintivas* [Tesis, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche].
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, *8*(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Marqués del Atrio. (14 de noviembre, 2023). *El papel esencial de las levaduras en la elaboración del vino*. <https://marquesdelatrio.com/blog/vino/levaduras-en-el-vino>
- Mejía Barajas, J. A., & Saavedra Molina, A. (2022). *Conociendo las levaduras*. Revista Saber Más, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/97-numero-131/193-conociendo-las-levaduras.html>
- Menezes, A. G. T., Melo, D. S., Ramos, C. L., Moreira, S. I., Alves, E., & Schwan, R. F. (2020). Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microbial Pathogenesis*, *140*, 103969. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103969>
- Merchán, A. V., Benito, M. J., Galván, A. I., & Ruiz-Moyano, S. (2020). Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. *LWT*, *124*, 109173. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109173>
- Milesi, M., Candioti, M., & Hynes, E. (2007). Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(8), 1427–1433. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.003>
- Molina Ruíz, M. E., Orantes García, C., Sánchez Cortés, M. S., & Verdugo Valdez, A. G. (2014). Validación del método PCR-RFLP para la identificación de *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi: Saccharomycetaceae). *Lacandonia*, *8*(1), 7–12
- Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, *2*(4), 449–473. <https://doi.org/10.3390/nu2040449>
- Organización Mundial de Gastroenterología. (2023). *Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos (WGO Global Guideline)*. <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics>
- Ortega, A. M. de los A. (2024). *Selección y caracterización enológica de levaduras autóctonas de viñedos de altura establecidos en la Quebrada de Humahuaca, provincia de Jujuy* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Cuyo]. <https://bdigital.uncuyo.edu.ar>

- Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., & Teixeira, M. C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(2), 78. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>
- Peltier, E., Sharma, V., Martí Raga, M., Roncoroni, M., Bernard, M., Jiranek, V., Gibon, Y., & Marullo, P. (2018). Dissection of the molecular bases of genotype x environment interactions: a study of phenotypic plasticity of *Saccharomyces cerevisiae* in grape juices. *BMC genomics*, 19(1), 772. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5145-4>
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2019). Cell wall surface properties of *Kluyveromyces marxianus* strains from dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 10, 79. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00079>
- Ramírez-Navas, J. S., Aguirre-Londoño, J., Aristizábal-Ferreira, V. A., & Castro-Nárvaez, S. (2016). Salt in cheese: Several interactions. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 303–316. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>
- Reinheimer, J., Alez, A., Audeo, B., Bergamini, C., Binetti, D., Bréssler Marcó, E., & Zaballa, Z. (2021). *Avances y tendencias en la industria láctea: La contribución argentina desde el INLAIN. Ediciones UNL*. <https://hdl.handle.net/11185/5803>
- Rosa, C. A., & Péter, G. (Eds.). (2006). *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer. <https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3>
- Sahelices Garrido-Lestache, C. (2018). *Estudio de la población de levaduras en quesos de pasta blanda de Extremadura* [Tesis, Universidad de Extremadura]. <http://hdl.handle.net/10662/7607>
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R. E., & Bhan, M. K. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(6), 374–382. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70551-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70551-2)
- Seo M. J. (2024). Fermented Foods and Food Microorganisms: Antioxidant Benefits and Biotechnological Advancements. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(9), 1120. <https://doi.org/10.3390/antiox13091120>
- Silva, L. F., Sunakozawa, T. N., Monteiro, D. A., Casella, T., Conti, A. C., & Barretto Penna, A. L. (2023). Potential of cheese-associated lactic acid bacteria to metabolize citrate and produce organic acids and acetoin. *Metabolites*, 13(11), 1134. <https://doi.org/10.3390/metabo13111134>
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts-Characteristics and Food Application. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>
- Suárez, J. E. (2015). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos [Autochthonous microbiota, probiotics and prebiotics]. *Nutrición Hospitalaria*, 31(Suppl 1), 3–9. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8701>

- Tamang, J. P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., & Chae, S.-W. (2016). Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 578. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
- Taveira, I. C., Nogueira, K. M. V., Oliveira, D. L. G. d., & Silva, R. d. N. (2021). Fermentation: Humanity's oldest biotechnological tool. *Frontiers for Young Minds*, 9, Article 568656. <https://doi.org/10.3389/frym.2021.568656>
- Trmčić, A., Ralyea, R., Meunier-Goddik, L., Donnelly, C., Glass, K., D'Amico, D., Meredith, E., Kehler, M., Tranchina, N., McCue, C., & Wiedmann, M. (2017). Consensus categorization of cheese based on water activity and pH: A rational approach to systemizing cheese diversity. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 841–847. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11621>
- Tullio V. (2022). Yeast Genomics and Its Applications in Biotechnological Processes: What Is Our Present and Near Future?. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(7), 752. <https://doi.org/10.3390/jof8070752>
- Tyfa, A., Kunicka-Styczyńska, A., & Zabielska, J. (2015). Evaluation of hydrophobicity and quantitative analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus* sp. *Acta biochimica Polonica*, 62(4), 785–790. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1133
- Vera Macaya, D. L. (2020). Levaduras autóctonas y su potencial biotecnológico. *Fruticultura & Diversificación*, 26(85), 27–31. EEA Alto Valle, INTA. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/8310>
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Liu, N., Zhang, X. X., & Mutukumira, A. N. (2024). Evaluation of the probiotic potential of yeast isolated from kombucha in New Zealand. *Current research in food science*, 8, 100711. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100711>
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Yocheva, L., Tserovska, L., Danguleva-Cholakova, A., Todorova, T., Zhelezova, G., Karaivanova, E. y Georgieva, R. (2024). "Efectos inhibidores in vitro y actividad de coagregación de lactobacilos en *Candida albicans*". *Investigación en microbiología*, 15 (3), 1576-1589. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15030104>
- Zavišić, G., Ristić, S., Petković, B., Živkov Šaponja, D., Jojić, N., & Janković, D. (2023). Microbiological quality of probiotic products. *Arhiv Farmacije*, 73 (2), 97–112. <https://doi.org/10.5937/arhfarm73-42160>
- Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. *Frontiers in microbiology*, 12, 703284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>