



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

***Geotrichum candidum*: PROPIEDADES Y USO
COMO CULTIVO PROTECTOR EN QUESOS**

***Geotrichum candidum*: PROPERTIES AND USE
AS PROTECTIVE CULTURE IN CHEESES**

Autor: Alberto M^a Ruiz de Azúa Baños

Tutora: Teresa M^a López Díaz

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2022

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia, taxonomía y origen	1
1.2 Morfología y fisiología.....	2
1.3 Metabolismo	4
1.4 Lipólisis	5
1.5 Proteólisis.....	6
1.6 Factores que influyen en el crecimiento	7
1.7 <i>G. candidum</i> en la industria quesera	9
1.8 Papel como cultivo protector e interacción con otros microorganismos.....	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Aislamiento y recuento de <i>G. candidum</i> en quesos Camembert y Brie	11
3.2 Identificación y caracterización morfológica.....	12
3.3 Pruebas de proteólisis y lipólisis	13
3.4 Influencia de diversos factores en el crecimiento de <i>G. candidum</i>	13
3.5 <i>G. candidum</i> como cultivo protector frente a hongos filamentosos.....	14
4. RESULTADOS	15
4.1 Aislamiento y recuento	15
4.2 Identificación y caracterización	16
4.3 Caracterización morfológica.....	16
4.4 Lipólisis y proteólisis	18
4.5 Influencia de diversos factores en el crecimiento	20
4.6 Cultivo protector	21
5. DISCUSIÓN	22
6. CONCLUSIÓN	26
7. REFERENCIAS	26

RESUMEN

Geotrichum candidum es una levadura, también considerado un hongo con apariencia de levadura, ampliamente utilizado en la industria láctea. Su importancia reside principalmente en el proceso de maduración de algunos quesos, contribuyendo a la formación del sabor y aroma de estos y actuando como cultivo protector frente a algunas infecciones bacterianas y hongos contaminantes. Nuestro objetivo fue aislar cepas de *G. candidum* a partir de diferentes quesos de corteza enmohecida para llevar a cabo su identificación, caracterización y determinación de algunas de sus propiedades. Se emplearon galerías ID 32 C para la identificación y el análisis del perfil de azúcares, se realizó una caracterización morfológica, pruebas de proteólisis y lipólisis, un estudio de la influencia de la temperatura, actividad de agua, pH y concentración de NaCl en el crecimiento y una valoración de su efecto protector frente a hongos filamentosos. Los resultados mostraron que las cepas aisladas tenían una leve actividad proteolítica y lipolítica y la capacidad de actuar como cultivo protector frente a algunos hongos alterantes del género *Penicillium*. En resumen, 2 cepas se catalogaron morfológicamente dentro del morfotipo levaduriforme, las otras 3 dentro del morfotipo fungiforme. Algunas cepas de *G. candidum* tienen un efecto protector frente a cepas de *Penicillium verrucosum* y la interacción con otros microorganismos presentes en el queso incrementa las actividades proteolítica y lipolítica.

PALABRAS CLAVE: cultivo protector, *Geotrichum candidum*, lipólisis, proteólisis, queso Camembert, queso Brie.

ABSTRACT

Geotrichum candidum is a yeast, also considered a yeast-like fungus, widely used in the dairy industry. Its importance lies mainly in the maturation process of some cheeses, contributing to the formation of their flavor and aroma and acting as a protective culture against some bacterial infections and contaminating fungi. Our objective was to isolate *G. candidum* strains from different moldy rind cheeses to carry out their identification, characterization, and determination of some of their properties. ID 32 C galleries were used for the identification and analysis of the sugar profile, a morphological characterization, proteolysis and lipolysis tests, a study of the influence of temperature, water activity, pH and NaCl concentration on growth and an assessment of its protective effect against filamentous fungi were performed. The results showed that the isolated strains had a slight proteolytic and lipolytic activity and the ability to act as a protective culture against some spoilage fungi of the genus *Penicillium*. To sum up, 2 strains were morphologically classified within the yeast morphotype and the other 3 within the fungiform morphotype. Some strains of *G. candidum* have a protective effect against strains of *Penicillium verrucosum* and the interaction with other microorganisms present in cheese increases proteolytic and lipolytic activities.

KEYWORDS: Brie cheese, Camembert cheese, *Geotrichum candidum*, lipolysis, protective culture, proteolysis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia, taxonomía y origen

Geotrichum candidum Link cuenta con una extensa diversidad tanto fenotípica como genotípica que dificulta su clasificación, de manera que todavía existe un debate abierto sobre si considerarlo una levadura o un hongo con apariencia de levadura (Boutrou y Guéguen, 2005). Por esta razón, en el presente trabajo utilizaremos ambos términos para referirnos a *G. candidum*.

Al margen de su clasificación, *G. candidum* cuenta con numerosas aplicaciones e intereses en la industria láctea, alcanzando gran importancia en el proceso de maduración de algunos quesos y en la formación del sabor de estos (Boutrou y Guéguen, 2005). Sin embargo, su importancia no se limita solo a la contribución en el sabor, sino que también afecta positiva y significativamente al color, textura y aroma no solo de los quesos, principalmente frescos, sino también de la mantequilla, la nata, la leche fermentada y otro tipo de alimentos (Koňuchová y Valík, 2021).

Inicialmente, el género *Geotrichum* fue establecido en 1809 por Link, quién denominó tan solo una especie, *G. candidum*. Desde ese momento, se han nombrado y utilizado múltiples sinónimos de dicha especie (de Hoog *et al.*, 1986), siendo el más usado *Oidium lactis* (Wouters *et al.*, 2002). *G. candidum* fue clasificado inicialmente como moho, sin embargo, desde hace casi 40 años se considera mayoritariamente una levadura (Barnett *et al.*, 1983).

El concepto de anamorfo se utiliza para describir la fase reproductiva asexual de un hongo, mientras que el concepto de teleomorfo hace referencia a la fase reproductiva sexual. Inicialmente, desde 1977 hasta 2004, el complejo *Galactomyces geotrichum* (E.E. Butler & L.J. Petersen) Redhead & Malloch fue establecido como el teleomorfo de *G. candidum* (de Hoog *et al.*, 1998). A partir de 2004, se comenzó a considerar *Galactomyces candidus* como el estado teleomorfo de *G. candidum* (de Hoog y Smith, 2004).

La clasificación taxonómica (Pottier *et al.*, 2008), por lo tanto, se establece de la siguiente manera:

		<u>Estado teleomórfico</u>	<u>Estado anamórfico</u>
Filo: Ascomycota	Familia:	<i>Dipodascaceae</i>	<i>Candidaceae</i>
Clase: Hemiascomycetes	Género:	<i>Galactomyces</i>	<i>Geotrichum</i>
Orden: Saccaromycetales	Especie:	<i>G. candidus</i>	<i>G. candidum</i>

Actualmente, en 2022, según la base de datos *Catalogue of Life*, se ha establecido *Dipodascus geotrichum* (E.E. Butler & L.J. Petersen) Arx (von Arx, 1977) como el nombre de la especie más adecuado. Sin embargo, en el trabajo utilizaremos *Geotrichum candidum* ya que es el nombre más conocido y utilizado.

G. candidum se puede encontrar en niveles bajos en aproximadamente el 30% de las muestras de leche cruda (Desmaures *et al.*, 1997), y por lo tanto, también en quesos de leche cruda, es decir, quesos que no han sido pasteurizados. De hecho, está presente en los quesos independientemente de la procedencia de la leche, ya sea de cabra (Tornadijo *et al.*, 1998), vaca (Wojtatowicz *et al.*, 2001) u oveja (Cosentino *et al.*, 2001). Además, *G. candidum* también está presente en los seres humanos y otros mamíferos, en los insectos, en alimentos para animales, en las plantas, en las frutas y en múltiples hábitats naturales como el suelo, la hierba o el ensilado (Barnett *et al.*, 1990).

Por el contrario, es más difícil encontrar *G. candidum* en quesos de leche pasteurizada y en la cuajada o suero de los quesos Cheddar en la maduración, ya que en caso de estar presente no lo suele hacer como especie predominante. También es sabido que se utilizan algunas cepas comerciales de *G. candidum* como cultivo iniciador, pudiendo ser estas rociadas sobre la superficie del queso o añadidas a la leche (Welthagen y Viljoen, 1999).

1.2 Morfología y fisiología

En función de las propiedades bioquímicas y morfológicas, *G. candidum* se puede dividir en 3 tipos o morfotipos distintos (Rattray, 2002). El primer morfotipo (**Figura 1A**), más considerado una levadura que un hongo, cuenta con cepas con colonias caracterizadas por su color crema y por una alta capacidad de producción de artrosporas (**Figura 1B**). Además, estas cepas cuentan con actividad de acidificación, leve proteólisis y un crecimiento óptimo a temperaturas de entre 22°C y 25°C (Guéguen y Jacquet, 1982). Estas colonias de color crema tienen un olor dulzón, son lisas y también membranosas (Eliskases-Lechner, 2002).

El tercer morfotipo (**Figura 2A**), más considerado un hongo que una levadura, está formado por cepas cuyas colonias presentan un color blanquecino, alta actividad proteolítica, actividad alcalinizante y baja producción de artrosporas (**Figura 2B**). Sin embargo, predominan las hifas vegetativas y la temperatura óptima de crecimiento es mayor que en el caso anterior, estando entre 25°C y 30°C (Guéguen y Jacquet, 1982). Para finalizar, el segundo morfotipo está formado por aquellas cepas que son una mezcla y que por lo tanto no entran dentro de ninguna de las dos clasificaciones anteriores (Rattray, 2002).

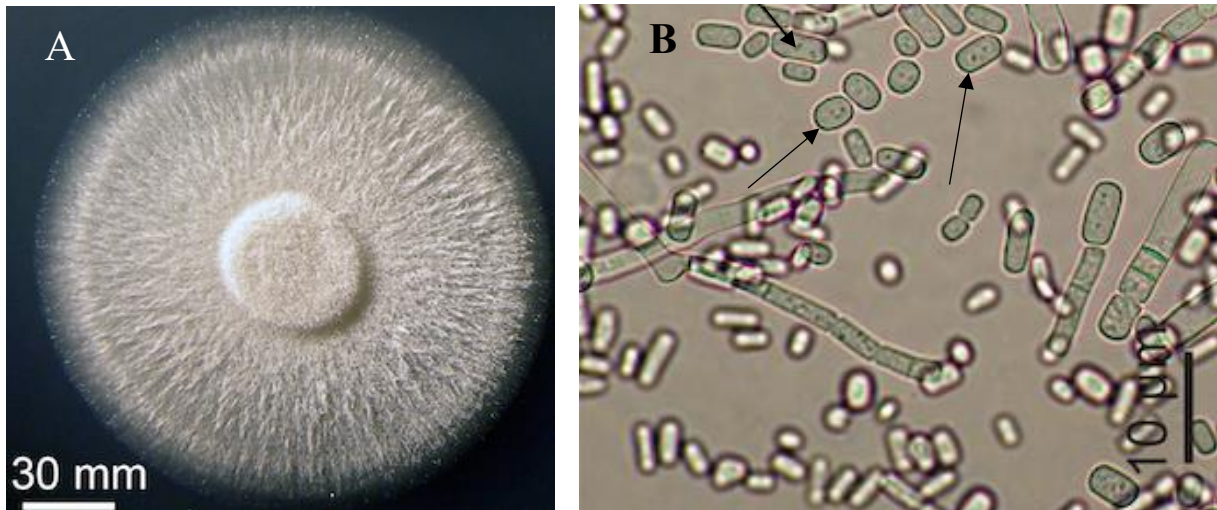


Figura 1. (A) Apariencia macroscópica de una colonia de *G. candidum* perteneciente a una cepa de tipo levaduriforme crecida en una placa de Petri en el laboratorio. La escala es de 30 mm (Wolfe, 2015). (B) Apariencia microscópica de una colonia de *G. candidum* perteneciente a una cepa de tipo levaduriforme vista en un microscopio a 400x. Las flechas en negro señalan las artrosporas. La escala es de 10 µm (Wolfe, 2015).

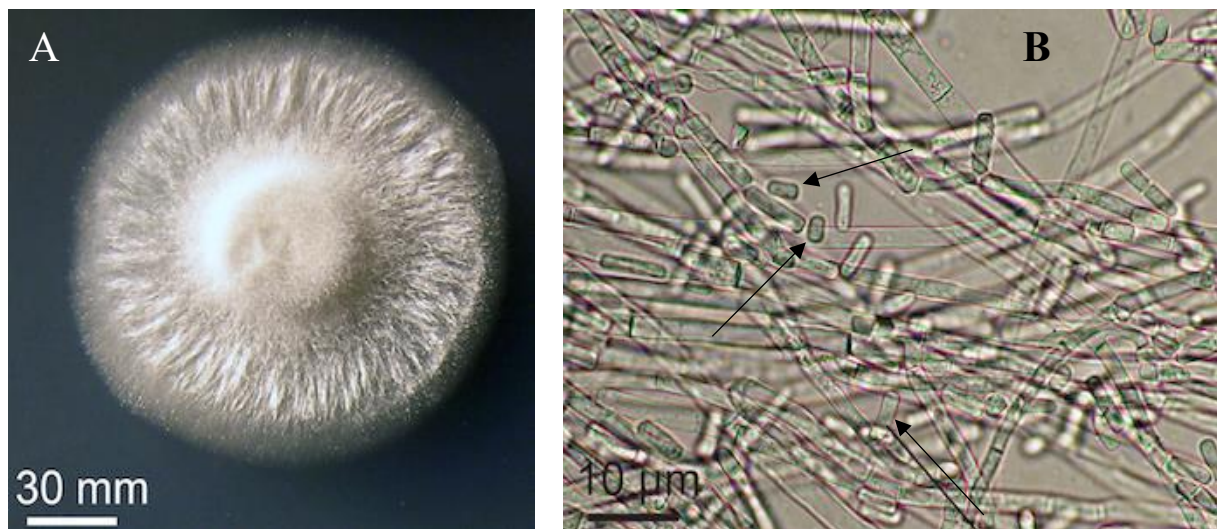


Figura 2. (A) Apariencia macroscópica de una colonia de *G. candidum* perteneciente a una cepa de tipo fungiforme crecida en una placa de Petri en el laboratorio. La escala es de 30 mm (Wolfe, 2015). (B) Apariencia microscópica de una colonia de *G. candidum* perteneciente a una cepa de tipo fungiforme vista en un microscopio a 400x. Las flechas en negro señalan las artrosporas. La escala es de 10 µm (Wolfe, 2015).

Las colonias de *G. candidum*, especialmente el morfotipo levaduriforme mencionado anteriormente, producen durante su desarrollo y crecimiento hifas septadas (**Figura 3A**). Estas, cuentan con separaciones entre las diferentes células mediante paredes transversales que contienen poros o agujeros promoviendo de esta manera la transferencia del material del citoplasma entre dichas células. Además, las hifas están bifurcadas y tienen un tamaño que oscila entre los 7 µm y los 11 µm de ancho. Si dichas hifas se fracturan, siempre y cuando sean fértiles, dan lugar a la formación de artrosporas o artroconidios unicelulares (**Figura 3B**), los cuales cuentan con una forma inicialmente rectangular que se va redondeando poco a poco hasta adquirir una forma cilíndrica similar a la de un barril. El tamaño de las artrosporas se encuentra

entre 6 μm y 12 μm de largo y entre 3 μm y 6 μm de ancho. En ningún caso se van a formar blastoporos, también conocidos como blastoconidios, un tipo de esporas que se forman por gemación (Eliskases-Lechner, 2002).

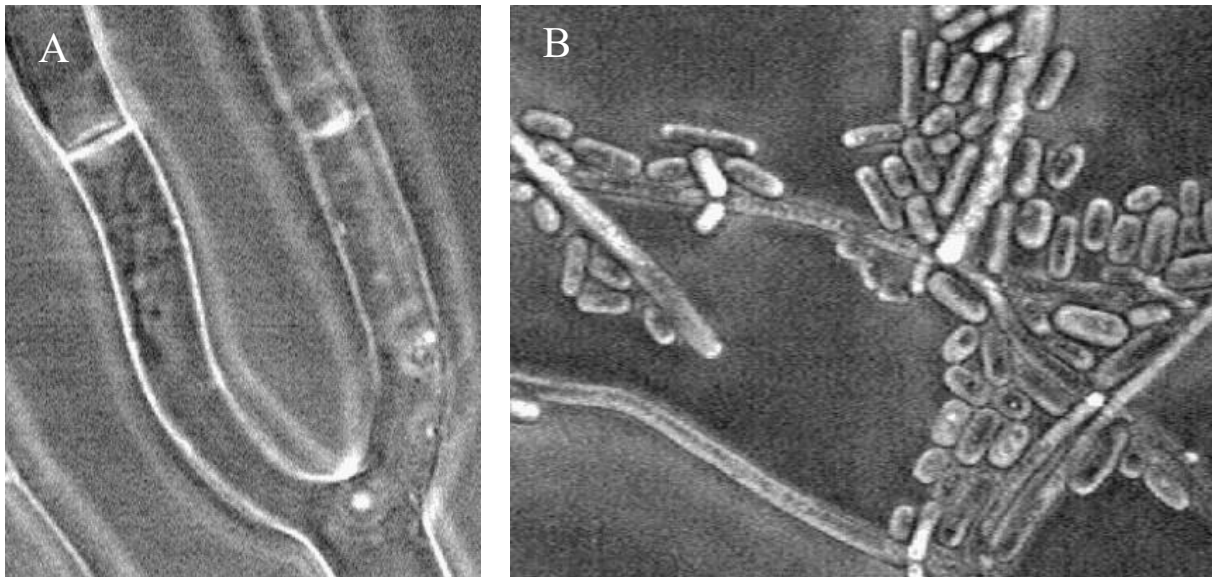


Figura 3. (A). Hifas ramificadas de *G. candidum* vistas a una ampliación de 1000x (Eliskases-Lechner, 2002). (B). Artrosporas de *G. candidum* formadas por la fractura de las hifas vistas a una ampliación de 400x (Eliskases-Lechner, 2002).

Para la búsqueda y la identificación de cepas de *G. candidum* importantes para la industria, se han utilizado procedimientos basados en propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas o una mezcla de ellas (Barnett *et al.*, 1990; Kurtzman y Fell, 1998). *G. candidum* tiene la capacidad de crecer fácil y rápidamente en algunos de los medios más utilizados. Por ejemplo, crece en agar con extracto de malta como fuente de carbono y energía a una temperatura de 25°C formando después de 1 semana colonias con un diámetro de aproximadamente 7 cm (Eliskases-Lechner, 2002).

1.3 Metabolismo

G. candidum tiene la capacidad de utilizar diversas fuentes de carbono y también es capaz de utilizar el nitrógeno orgánico ya sea en su forma simple, como por ejemplo en las peptonas y caseínas (Guéguen, 1984; Adour *et al.*, 2002), o en fuentes más complejas como el extracto de levadura (Amrane y Prigent, 1997). De hecho, *G. candidum* puede crecer en distintas fuentes de carbono utilizando la asparagina como fuente de nitrógeno y puede utilizar otros aminoácidos con glucosa como fuente de carbono (Aldarf *et al.*, 2002). Además, algunos estudios evidencian la capacidad de producción de aminoácidos libres por parte de *G. candidum* utilizando la caseína (Guéguen y Lenoir, 1975) y la descomposición de otras proteínas o péptidos a productos más pequeños sin incrementar los aminoácidos libres (Wyder, 1998).

1.4 Lipólisis

La lipólisis es un proceso bioquímico y metabólico, concretamente perteneciente al catabolismo, que consiste en la descomposición de los lípidos y grasas en moléculas de menor tamaño como los ácidos grasos. Por ello, la presencia de enzimas lipolíticas en *G. candidum* supone un nivel elevado de ácidos grasos en algunos quesos (Collins *et al.*, 2003). Además, este proceso es de gran importancia en *G. candidum* ya que contribuye al sabor y aroma de algunos quesos durante la maduración, aportando de manera general mejores características sensoriales (Gaborit *et al.*, 2001).

La lipólisis ocurre gracias a la acción de unas enzimas conocidas como lipasas, que en el caso de *G. candidum* son de gran tamaño llegando a superar en muchos casos los 60 kDa de peso (Cygler *et al.*, 1993).

La lipasa más estudiada y conocida de *G. candidum* es la lipasa I, descubierta en 1964. Esta lipasa extracelular puede llevar a cabo la lipólisis en productos lácteos y se concentra a través de la eliminación del medio de cultivo. La lipasa I no presenta una especificidad absoluta o total por ácidos grasos insaturados en cis en la posición 9 y por ácidos grasos insaturados en cis en las posiciones 9 y 12, pero si tiene por ellos una especificidad única que le permite llevar a cabo la hidrólisis de estos sea cual sea su lugar en el triglicérido. El polvo liofilizado tiene una alta estabilidad, y por esta razón, se puede conservar o retener la actividad enzimática mediante el almacenamiento aproximadamente a -20°C incluso durante más de 8 años. Además, la actividad enzimática es óptima a un pH de alrededor de 8,2 (Jensen, 1974).

Otra de las lipasas más estudiadas de *G. candidum* es la lipasa II, que a diferencia de la lipasa I no es específica. Entre ambas existe una identidad del 86% en la estructura primaria, pero una pequeña variación estructural puede ser responsable de las diferencias en la especificidad (Shimada *et al.*, 1989). De hecho, algunos estudios apuntan a que se trata de isoenzimas, y aunque sean estructuralmente semejantes, utilizan sustratos diferentes (Bertolini *et al.*, 1995).

A pesar de que el papel de las enzimas lipolíticas de *G. candidum* en la grasa de la leche está clara, aún no se conoce a fondo cómo es la actividad de dichas enzimas en la lipólisis de los quesos, ya que en ellos crecen más levaduras además de la mencionada (Boutrou y Guéguen, 2005).

Sin embargo, sí se sabe que *G. candidum* promueve en el proceso de maduración del queso el cambio de los ácidos grasos libres a ácidos grasos insaturados. Por ejemplo, se ha

relacionado la presencia de algunas lipasas de *G. candidum* con una alta relación de ácidos oleicos en quesos como el Pont-l'Évêque y el Camembert, quesos de pasta blanda (Boutrou y Guéguen, 2005).

Por otro lado, en estudios sobre la maduración del queso Armada, se ha reportado una mayor actividad lipolítica por parte de *G. candidum* debido a que actúa como una de las principales levaduras dominando especialmente en las primeras fases del proceso de maduración (Tornadijo *et al.*, 1998). En este caso, la lipólisis es de mayor intensidad que en otros quesos de cabra madurados y semejante a la que se puede llevar a cabo en quesos azules. En el proceso de maduración del queso Armada, principalmente en las primeras etapas, la relación entre ácidos grasos C₁₆ y ácido grasos C_{18:1} es bastante baja. La alta cantidad de ácidos grasos C_{18:1} es debida a la presencia de *G. candidum* y más concretamente a la de su lipasa B (Fresno *et al.*, 1997).

1.5 Proteólisis

La proteólisis es un proceso bioquímico y metabólico perteneciente al catabolismo que consiste en la degradación o descomposición de proteínas mediante unas enzimas conocidas como proteasas. La proteólisis, al igual que la lipólisis, es un proceso de gran importancia en *G. candidum* ya que contribuye al sabor y al aroma de algunos quesos y favorece el correcto desarrollo de la textura durante la maduración. Además, la proteólisis en *G. candidum* está vinculada con la etapa de crecimiento, alcanzando la mayor actividad durante la fase estacionaria del microorganismo (Hannan y Guéguen, 1985). *G. candidum* cuenta con una aptitud proteolítica similar a la de *Penicillium camemberti* (Eck, 1990).

Como ya se ha comentado anteriormente, el primer morfotipo, más parecido a una levadura que a un hongo, cuenta con una débil actividad proteolítica extracelular en comparación con el tercer morfotipo, caracterizado por tener una actividad proteolítica extracelular elevada. Debido a la existencia de estas diferencias es necesario llevar a cabo un proceso de selección de cepas a la hora de producir o elaborar los distintos tipos de queso. Gran parte de las cepas de esta levadura que se han aislado en quesos duros cuentan con un crecimiento menos elevado y con menor actividad proteolítica que las cepas aisladas de quesos blandos (Guéguen y Lenoir, 1975).

No obstante, la proteólisis intracelular es siempre superior a la extracelular. Se han realizado estudios que han demostrado que en un total de 83 cepas de *G. candidum* la relación entre las actividades de proteólisis intracelular respecto a la extracelular es de 15 a 1

aproximadamente. Además, es importante destacar que el sistema proteolítico extracelular se puede desactivar de forma más rápida estableciendo un pH de 4 y es menos resistentes a altas temperaturas, siendo el sistema intracelular más termoestable que el extracelular (Guéguen y Lenoir, 1976).

Por otro lado, algunos estudios realizados en la década de 1990 determinaron la presencia en *G. candidum* de una proteasa intracelular. Esta se caracterizó como una serina proteasa neutra y se evidenció la presencia de algunos inhibidores intracelulares de dicha actividad enzimática. La presencia de estos inhibidores endógenos puede explicar en algunos casos la ausencia de degradación de las proteínas celulares (Vicent-Soler y Gacto, 1991; Boutrou *et al.*, 2006).

Algunos años más tarde se detectó que esta proteasa intracelular tenía una especificidad parecida a la de la quimiotripsina. La estabilidad de la enzima es baja, por lo que es frecuente observar una rápida pérdida de actividad. En función del sustrato que se utilice, el pH más adecuado para la actividad enzimática puede ser de 7,0 o de 8,25; indicando de esta manera la presencia de dos enzimas distintas o simplemente de dos perfiles distintos para dos actividades diferentes de la misma enzima. Esta serina proteasa es independiente de metales, pero los iones de magnesio pueden colaborar para mantener su estabilidad (Litthauer *et al.*, 1996; Boutrou *et al.*, 2006).

1.6 Factores que influyen en el crecimiento

El desarrollo de *G. candidum* en la parte superficial de los quesos depende de una serie de factores entre los que se encuentran la temperatura, los niveles de O₂ durante la maduración, la inoculación inicial, el pH, la humedad relativa y la actividad de agua, entre otros. Además, la concentración de sal (NaCl) presente en el queso y en su superficie, así como la presencia de otro tipo de cultivos para la maduración, como por ejemplo *Penicillium camemberti*, también modulan el crecimiento de *G. candidum* en los quesos (Rattray y Eppert, 2022). El nivel de crecimiento o desarrollo de los hongos, en este caso de *G. candidum*, está afectado principalmente por 2 factores: la actividad de agua (a_w) y la temperatura (Dantigny *et al.*, 2007).

El crecimiento óptimo de *G. candidum* se consigue con temperaturas de entre 25°C y 30°C (Plaza *et al.*, 2003), mientras que la temperatura máxima a la que puede crecer asciende a los 35-38°C (Pitt y Hocking, 2009). Por otro lado, la mínima temperatura a la que se puede observar cierto crecimiento desciende hasta los 5°C (Hudecová *et al.*, 2009). Los artroconidios,

por su parte, apenas muestran resistencia a altas temperaturas, llegando a morir el 90% de ellos a 52°C en apenas en 30 minutos (Pitt y Hocking, 2009).

La actividad de agua es la relación que existe entre la presión de vapor de un alimento y la presión de vapor del agua pura en las mismas condiciones de presión y temperatura (Food and Drug Administration, 2014). *G. candidum* tiene un crecimiento restringido a hábitats con altas disponibilidades de agua, y por lo tanto, la actividad de agua mínima para que haya crecimiento es de 0,90 (Pitt y Hocking, 2009). Sin embargo, otros estudios sugieren que el crecimiento y desarrollo de *G. candidum* ocurre a una actividad de agua de 0,95 pero no de 0,90; ya que es incapaz de germinar en un periodo de tiempo de 30 días a una actividad de agua inferior a 0,95 incluso a su temperatura óptima (Plaza *et al.*, 2003; Hudecova *et al.*, 2011).

Por otro lado, el rango de pH en el que es posible el crecimiento de *G. candidum* es bastante amplio, ya que puede crecer en un rango de pH de entre 3,0 y 11,0 (Garrison y Holdar, 1961). Esto es debido a que existen algunas cepas capaces de crecer a un pH de 3,4 (Hang *et al.*, 1974) o incluso de 2,2 (Butler *et al.*, 1962). Sin embargo, el pH óptimo para el crecimiento de *G. candidum* varía en función de la fuente bibliográfica, de manera que algunos estudios lo establecen entre 5 y 5,5 (Eck, 1990; Wyder, 1998) y otros entre 5,5 y 6 (Guéguen, 1984).

La tolerancia a la sal por parte de *G. candidum* es bastante limitada. Según algunos estudios el crecimiento de *G. candidum* a concentraciones de 1-2% de NaCl se ve ralentizado respecto al crecimiento a concentraciones de 0% de NaCl (Pažakova *et al.*, 2003; Marcellino y Benson, 2013). Además, se puede observar un efecto inhibitorio en el hongo si se utilizan medios con concentraciones de 5-6% de sal (Uraz y Özer, 2014), o incluso, de 4% (van den Tempel y Nielsen, 2000). Sin embargo, algunas cepas de *G. candidum* aisladas del queso Armada han tenido buenos crecimientos incluso a concentraciones de 5% de sal (Tornadijo *et al.*, 1998).

Finalmente, cabe destacar que *G. candidum* no es capaz de crecer en condiciones anaeróbicas, pero es resistente a ambientes con bajos niveles de oxígeno y altos niveles de dióxido de carbono (Pitt y Hocking, 2009). El crecimiento de *G. candidum* en atmósferas con bajos niveles de oxígeno induce el alargamiento de las hifas y la pérdida de las ramas laterales (Robinson y Griffith, 1977).

De hecho, algunos estudios afirman que es capaz de desarrollarse a concentraciones de 2% de oxígeno y 25% de dióxido de carbono. Sin embargo, las mejores condiciones para

favorecer el crecimiento de *G. candidum* son concentraciones de 21% de oxígeno y 0% de dióxido de carbono (van den Tempel y Nielsen, 2000).

1.7 *G. candidum* en la industria quesera

G. candidum se utiliza en una amplia variedad de quesos. Algunos de ellos son el Armada, Saint-Nectaire, Münster, Limburger, Tilsit o Pont-L'Évêque entre otros (Wyder, 1998; Perkins *et al.*, 2020). Sin embargo, nos vamos a centrar en los quesos Camembert y Brie, quesos franceses de pasta blanda y corteza enmohecida preparados a partir de leche de vaca. En ambos, *G. candidum* es de gran importancia ya que contribuye a la formación del aroma y sabor (Ribadeau-Dumas, 1984; Wyder, 1998).

El queso Camembert tiene su origen en la región de Normandía, en Francia. Es un queso suave, madurado con moho y elaborado a partir de leche de vaca cruda, aunque a veces se utiliza leche de vaca pasteurizada. Cuenta con una forma cilíndrica y una corteza delgada y recubierta de moho blanco en la que pueden aparecer pequeñas manchas rojas por la presencia de *Brevibacterium linens* (Hartmann y Maubois, 2017). *G. candidum* es uno de los componentes más importantes de la microbiota de este queso, estando presente en altas cantidades en la superficie. Su crecimiento durante el proceso de maduración la primera semana es muy rápido, después se estabiliza (Molimard *et al.*, 1995). Las propiedades organolépticas del queso Camembert se ven mejoradas por la presencia de *G. candidum*, ya que algunas cepas reducen el amargor a la vez que refuerzan el sabor manteniendo la apariencia tradicional del queso (Mourgues *et al.*, 1983).

Por su parte, el queso Brie tiene su origen en la región de Brie, en Francia, como su propio nombre indica. Las dos variedades más conocidas son las elaboradas en el municipio de Melun y en la ciudad de Meaux, siendo esta última variedad la más conocida. Sus características y morfología son bastante parecidas a las del Camembert ya que también es un queso suave, madurado con moho y elaborado a partir de leche de vaca cruda, aunque en ocasiones se prepara a partir de leche de vaca pasteurizada. También tiene forma cilíndrica y una delgada y aterciopelada corteza recubierta de moho blanco, mientras que la pasta interna es de color pálido o amarillo claro (Becerro, 2012).

1.8 Papel como cultivo protector e interacción con otros microorganismos

Un cultivo protector es un tipo de cultivo que lleva a cabo la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, levaduras o mohos contaminantes, reduciendo el peligro o los daños causados por ellos. Estos cultivos aplicados a la industria quesera no solo consiguen

perfeccionar la calidad de los quesos, sino que también permiten periodos de almacenamientos más duraderos disminuyendo el desperdicio de queso y mejorando la seguridad alimentaria (Lactocyex S.L, 2019).

Según algunos estudios, *G. candidum* afecta al crecimiento y a la esporulación de algunos hongos del género *Penicillium* como *P. roqueforti*, independientemente de la concentración de sal y de oxígeno presente en el queso (van den Tempel y Nielsen, 2000).

Además, *G. candidum* inhibe de manera específica algunos hongos alterantes y contaminantes como *P. commune*, *P. caseifulvum*, *P. solitum*, *P. discolor*, *P. coprophilum* o *P. verrucosum* en algunos quesos como el Camembert. Esto choca completamente con el tipo de inhibición que suele llevarse a cabo entre hongos que interaccionan en los quesos, que suele ser por contacto directo y no de forma específica. El rápido crecimiento de *G. candidum* y la temprana germinación de sus conidios compitieron no solo por los sustratos sino también por el espacio, inhibiendo de esta forma el resto de hongos anteriormente mencionados (Nielsen *et al.*, 1998). *G. candidum* también puede actuar como cultivo protector contra mohos no deseados del género *Mucor*, inhibiendo su crecimiento y esporulación (Guéguen *et al.*, 1974; Guéguen *et al.*, 1984).

Por otro lado, *G. candidum* también actúa como cultivo protector frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, y frente a levaduras como *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* o *Pichia jadinii*, más conocida como *Candida utilis* (Guéguen *et al.*, 1974). Asimismo, *G. candidum* también inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes* gracias a la producción y excreción de compuestos como el ácido D-3-feniláctico (Dieuleveux *et al.*, 1998; Dieuleveux y Guéguen, 1998).

Dejando a un lado el papel como cultivo protector, *G. candidum* también tiene interacciones sinérgicas con otros microorganismos. Un microorganismo que se utiliza habitualmente en quesos como el Camembert, el Brie o el Munster es *Brevibacterium linens*, una bacteria Gram-positiva que estimula notoriamente el crecimiento de *G. candidum* en un rango de pH de entre 5 y 7,5. Por otro lado, *G. candidum* estimula moderadamente el crecimiento de *B. linens* pero tan solo a un pH aproximado de 5. Además, esta última estimulación se ve afectada por el incremento de la concentración de NaCl debido a la alta sensibilidad que muestra *G. candidum* a la sal (Lecocq y Guéguen, 1994).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el aislamiento de *Geotrichum candidum* procedente de diversas muestras de queso de corteza enmohecida para la obtención de cepas propias, y a partir de ellas, llevar a cabo una serie de pruebas de interés tecnológico que nos permitan identificarlas, caracterizarlas y determinar algunas de sus características más importantes.

A través de estas pruebas o análisis se busca determinar algunas características o propiedades morfológicas, valorar la actividad proteolítica y lipolítica, estudiar la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas en distintas condiciones de temperatura, concentración de sal, actividad de agua y pH, y por último, estudiar también la capacidad de inhibición sobre otros hongos que pueden resultar alterantes y/o toxigénicos, evaluando de esta forma su potencial para actuar como cultivo protector.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento y recuento de *G. candidum* en quesos Camembert y Brie

En primer lugar se llevó a cabo el aislamiento de 5 cepas de *G. candidum* procedentes de 5 quesos diferentes, 3 quesos Camembert y 2 quesos Brie. Una vez comprados se le asignó un número a cada queso, que también servirá para designar las cepas aisladas de ellos: M1 para el Camembert de Président, M2 para el Camembert de Marcillat, M3 para el Camembert de Chêne d'Argent, M4 para el Brie de Día y M5 para el Brie de Carrefour.

Para realizar el protocolo de aislamiento (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1978) se prepararon 5 frascos de 90 mL de citrato sódico al 2%, 20 frascos de 9 mL de agua de peptona al 0,1% para preparar las 4 diluciones por cada muestra y 20 placas de Petri con medio de cultivo Agar Glucosa Cloranfenicol (CGA) (*Oxoid, Thermo Fisher Scientific*, España). Para ello, se hicieron todos los cálculos necesarios, se prepararon los medios y se esterilizaron 15 minutos en una olla a presión a 121°C. Después, el medio CGA se atemperó a 45°C y se prepararon las placas en la cabina de flujo laminar.

Una vez preparado todo, se tomaron 10 g de cada uno de los quesos y se introdujeron en bolsas de homogeneización. Se añadieron 90 mL de citrato sódico al 2% en cada bolsa y se sometieron a 2 minutos en un homogeneizador de paletas (*Interscience*). Después, las mezclas se pasaron por el filtro de las bolsas de homogeneización. Estos filtrados ya corresponden con la dilución 10^{-1} , por lo que se pasó 1 mL de cada uno de ellos a los frascos de 9 mL de agua de

peptona al 1% para obtener las diluciones 10^{-2} , y así sucesivamente hasta obtener también las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

A continuación, se llevó a cabo una siembra por extensión en superficie. Para ello se pipetearon 0,1 mL de cada una de las diluciones (a excepción de la 10^{-1}) en las placas de CGA y se extendieron utilizando un asa de vidrio flameada en alcohol. Las placas se incubaron a 25°C durante 72 horas.

Antes del transcurso de los 3 días, se preparó medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA) (*Oxoid, Thermo Fisher Scientific*, España), se esterilizó a 115°C durante 10 minutos, se atemperó a 45°C y se prepararon 5 placas de Petri.

Una vez pasadas las 72 horas se seleccionó 1 placa de las 4 que había de cada muestra, las que tuvieran entre 25 y 200 colonias, y se realizó el recuento para calcular las unidades formadoras de colonia (UFC) de *G. candidum* por gramo de alimento, en este caso de queso. Para el recuento se utilizó la siguiente fórmula: $N = n \cdot 10 \cdot \text{factor de dilución}$, siendo “n” el número de colonias y “N” las unidades formadoras de colonia de *G. candidum* por gramo de queso. Se seleccionaron las placas con la dilución 10^{-4} de las muestras M2 y M3, mientras que para el resto se seleccionó la placa con la dilución 10^{-5} .

Se tomó con un asa de siembra un inóculo de las 5 placas seleccionadas y se sembraron 2 puntos y 1 línea en las placas de MEA. Finalmente, las 5 placas se incubaron a 25°C durante 48 horas aproximadamente. Cuando pasaron las 48 horas y el crecimiento de *G. candidum* ya era adecuado, se sembraron las 5 cepas en estría en frascos de agar inclinado para mantener un *stock* de las cepas, y se incubaron los frascos a 25°C durante 48 horas. Las placas con las cepas aisladas se introdujeron en el frigorífico para evitar que siguieran creciendo.

3.2 Identificación y caracterización morfológica

Para analizar el perfil de azúcares e identificar las cepas y confirmar que efectivamente se trataba de *G. candidum*, se emplearon galerías ID 32 C (*bioMérieux*, España). Este proceso de caracterización e identificación tan solo se llevó a cabo con 2 de las 5 cepas: M1 y M2. Las galerías ID 32 C están formadas por 32 cúpulas. En 29 de ellas está presente un sustrato carbonado deshidratado que servirá para realizar distintas pruebas de asimilación. También hay una cúpula que detecta sensibilidad a la cicloheximida, una prueba colorimétrica para la esculina y un control negativo.

En primer lugar, se prepararon suspensiones con las colonias en 2 mL de agua destilada hasta conseguir una turbidez de 2 en la escala de McFarland. Después, se transfirieron 250 μ L

de las suspensiones preparadas a ampollas de C Medium. Las ampollas se homogeneizaron y se transfirieron 135 μ L a cada uno de los 32 pocillos de la galería. Las galerías se taparon y se incubaron a 25°C durante 48 horas, aunque los resultados se visualizaron también a las 24 horas. Los resultados obtenidos se compararon con una tabla de identificación de 63 levaduras distintas proporcionada por la propia casa comercial. Aun así, se introdujeron los perfiles numéricos obtenidos de la suma de las reacciones positivas en la base de datos online *APIWEB* para interpretar los resultados según las instrucciones de las galerías.

Por otro lado, para la caracterización morfológica de las 5 cepas se sacaron fotografías de cada una de ellas. En primer lugar, se tomaron imágenes microscópicas del micelio de las 5 cepas utilizando una cámara (*Motic*) acoplada al microscopio óptico (*Motic BA-300*) y en segundo lugar, se tomaron fotografías macroscópicas. Para ambos tipos de imágenes se utilizó un programa informático llamado *Motic Images Plus*.

3.3 Pruebas de proteólisis y lipólisis

Para evaluar la capacidad proteolítica de las 5 cepas de *G. candidum*, se prepararon dos medios de cultivo diferentes: gelatina y Agar Caseína (Harrigan y McCance, 1979). Por otro lado, para evaluar la capacidad lipolítica de las 5 cepas de *G. candidum* se prepararon otros dos medios de cultivo: Agar Tributirina y Agar Tween 80 (Harrigan y McCance, 1979). Con estos medios de cultivo se prepararon 10 frascos de gelatina, 10 placas de Petri de Agar Caseína, 10 placas de Agar Tween 80 y 5 placas de Agar Tributirina, que fue el único caso que se decidió no hacer por duplicado.

Los frascos de gelatina se sembraron con las cepas de *G. candidum* por picadura utilizando una aguja de platino, mientras que en las placas se sembraron 1 línea y 2 puntos. Tanto las placas como los frascos se introdujeron a 25°C y se visualizaron al cabo de 2 y 5 días en busca de halos de aclaramiento alrededor de las colonias o licuefacción de la gelatina.

3.4 Influencia de diversos factores en el crecimiento de *G. candidum*

Se eligieron 4 factores con el objetivo de estudiar su influencia en el crecimiento de *G. candidum*: temperatura, actividad de agua, pH y concentración de sal. En primer lugar, los diferentes valores de temperatura se eligieron en función de las temperaturas de maduración de los quesos Camembert y Brie. Por otro lado, los distintos valores de actividad de agua se establecieron en función de la actividad de agua óptima de *G. candidum* y de la actividad de agua de los 5 quesos, que se midieron utilizando un higrómetro (*AquaLab*, España). En tercer lugar, los distintos valores de pH se establecieron en función del pH óptimo del hongo y del pH

de los 5 quesos, que se calculó utilizando un medidor de pH (*VWR International*, EEUU). Finalmente, los valores de las concentraciones de sal se eligieron teniendo en cuenta las concentraciones presentes en los 5 quesos.

Una vez establecidos los valores de todos los factores a estudiar, se hicieron los medios de cultivo. Se prepararon 2 placas de MEA normal para cada una de las 5 muestras, que se incubaría a 10 y 15°C. Por otro lado, se prepararon 4 placas de MEA con concentraciones de 1%, 1,5%, 2% y 2,5% de NaCl para cada una de las 5 muestras. También se prepararon 3 placas de MEA con actividades de agua de 0,966; 0,975 y 0,985 para cada una de las 5 muestras. Esto se consiguió mediante la adición de diferentes cantidades de glicerol. Finalmente, se prepararon 3 placas de MEA con un pH de 5,5; 6,5 y 7,5 para cada una de las 5 muestras utilizando HCl y NaOH. Como controles se utilizaron 2 placas de MEA normal por cada muestra, con una concentración de sal del 0%, una actividad de agua de 0,995, un pH de 5,17 y una incubación a 25°C.

Las placas se sembraron con 3 puntos de las diferentes cepas de *G. candidum* y se incubaron a 25°C, a excepción de las 5 que se incubaron a 10°C y las 5 que se incubaron a 15°C. Se visualizaron las placas al cabo de 1, 2, 3 y 4 días y cada uno de estos días se midió el diámetro de crecimiento de cada una de las colonias. A partir de estos valores se elaboraron gráficos de dispersión con las curvas de crecimiento, con el tiempo en días en el eje X y el diámetro de las colonias medido cada 24 horas en el eje Y (**Anexo**). Finalmente, se obtuvieron las pendientes de las líneas de tendencia de cada curva de crecimiento, que son equivalentes a las tasas de crecimiento de cada cepa (mm/día) en las diferentes condiciones.

3.5 *G. candidum* como cultivo protector frente a hongos filamentosos

En este experimento se empleó una técnica de siembra en césped modificada (Magnusson y Schnürer, 2001) y se seleccionaron únicamente 2 cepas de *G. candidum*: M1 y M2. Para evaluar el comportamiento de estas cepas de *G. candidum* como cultivo protector, se llevó a cabo un cultivo de esporas en sobrecapa de diferentes hongos del género *Penicillium*, potencialmente alterantes y toxigénicos.

Para ello, se prepararon suspensiones de esporas de *Penicillium roqueforti* MP15 (aislada de queso azul en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León), *Penicillium commune* MP82 (CBS 468.84) y *Penicillium verrucosum* MP88 (aislada de queso en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT 20766)

en tubos de 1 mL de agua con 0,05% de Tween 80. A partir de estas suspensiones se sembraron 3 puntos en placas de MEA que se incubaron a 25°C durante aproximadamente 6 días. Por otro lado, se prepararon 12 placas de MEA; 6 para la cepa M1 y 6 para la cepa M2 (2 placas para cada uno de los hongos del género *Penicillium* por cada muestra). Estas placas se sembraron con 3 puntos de la cepa de *G. candidum* correspondiente y se incubaron a 25°C durante 24 horas. Como control se utilizaron 3 placas de MEA sin *G. candidum*, únicamente con la sobrecapa que contiene esporas. Una vez crecieron los hongos del género *Penicillium*, se preparó a partir de cada uno de ellos otra suspensión de esporas en tubos con 1 mL de agua con 0,05% de Tween 80 estéril. Se realizaron recuentos en una cámara de Neubauer modificada y se llevaron a cabo diluciones hasta obtener suspensiones con 10^4 esporas/mL. Después, se transfirió 1 mL de cada suspensión de esporas a 5 tubos con 9 mL de MEA licuado mantenido a 45°C (un total de 15 tubos, de los cuales 3 serán para los controles). Los 10 mL de cada uno de los 15 tubos se añadieron en sobrecapa a las 12 placas crecidas con *G. candidum* durante 24 horas y a las 3 placas control. Finalmente se incubaron a 25°C y se visualizaron a los 5 días en busca de zonas de aclaramiento.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y recuento

A continuación, se muestran las placas con entre 25 y 200 colonias seleccionadas para realizar el recuento (**Figura 4**).



Figura 4. Placas de *G. candidum* seleccionadas para el recuento. De izquierda a derecha: M1 con la dilución 10^{-5} , M2 con la dilución 10^{-4} , M3 con la dilución 10^{-4} , M4 con la dilución 10^{-5} y M5 con la dilución 10^{-5} .

Los resultados de los recuentos fueron los siguientes, siendo la media $3,1 \cdot 10^7$ UFC/g :

$$M1: N = 56 \cdot 10 \cdot 10^5 = 5,6 \cdot 10^7 \text{ UFC/g de queso}$$

$$M2: N = 61 \cdot 10 \cdot 10^4 = 6,1 \cdot 10^6 \text{ UFC/g de queso}$$

$$M3: N = 30 \cdot 10 \cdot 10^4 = 3 \cdot 10^6 \text{ UFC/g de queso}$$

$$M4: N = 34 \cdot 10 \cdot 10^5 = 3,4 \cdot 10^7 \text{ UFC/g de queso}$$

$$M5: N = 56 \cdot 10 \cdot 10^5 = 5,6 \cdot 10^7 \text{ UFC/g de queso}$$

4.2 Identificación y caracterización

En las galerías ID 32 C utilizadas para el análisis del perfil de azúcares y la identificación, se obtuvieron los mismos resultados para ambas cepas (M1 y M2). Para la lectura de la galería, 48 horas después de la incubación se compararon cada una de las cúpulas con el control negativo y se anotaron como positivas aquellas en las que aparecía turbidez. Los resultados fueron positivos para la asimilación de galactosa, DL-Lactato, sorbitol, D-Xilosa, glicerol, manitol, glucosa y sorbosa y para la sensibilidad a la actidiona (cicloheximida). Por otro lado, los resultados fueron negativos para la asimilación de ribosa, ramnosa, palatinosa, eritritol, melibiosa, glucoronato, melezitosa, gluconato, levulinato, glucosamina, esculina, sacarosa, N-Acetil-Glucosamina, L-Arabinosa, celobiosa, rafinosa, maltosa, trehalosa, 2-Ceto-gluconato, α -Metil-D-Glucósido, lactosa e inositol y para el control negativo (**Figura 5**).



Figura 5. Galería ID 32 C de la cepa aislada M2 de *G. candidum* (y con resultados equivalentes a la muestra M1) leída a las 48 horas. Los resultados positivos se muestran señalados en rojo. El control negativo, en amarillo.

Los resultados obtenidos tenían una alta coincidencia con los porcentajes de reacciones positivas después de 48 horas presentes para el género *Geotrichum* en la tabla de identificación de 63 levaduras diferentes proporcionada por la casa comercial. Por otro lado, al introducir los perfiles numéricos obtenidos de la suma de las reacciones que salieron positivas en la galería en la base de datos online *APIWEB*, este también relacionó los resultados con el género *Geotrichum* con un porcentaje de identificación del 99,9%, y tan solo un 0,1% para otra levadura, *Candida rugosa*.

4.3 Caracterización morfológica

A continuación, se muestran las fotografías macroscópicas (**Figura 6**) y microscópicas (**Figura 7**), tomadas para la observación de la morfología de cada una de las cepas aisladas. En las fotografías macroscópicas se pueden observar 2 morfologías totalmente distintas. Por un lado las cepas M1 y M2, que cuentan con una apariencia similar. Por otro lado, las cepas M3, M4 y M5, que también tienen entre ellas una morfología semejante. En las fotografías microscópicas, tomadas del micelio de las cepas, también encontramos 2 grupos que coinciden

con las de las imágenes macroscópicas. Por un lado las cepas M1 y M2, que cuentan con pocas hifas pero alta cantidad de artrosporas, mientras que de forma contraria, las cepas M3, M4 y M5 tienen menor cantidad de artrosporas pero mayor número de hifas.

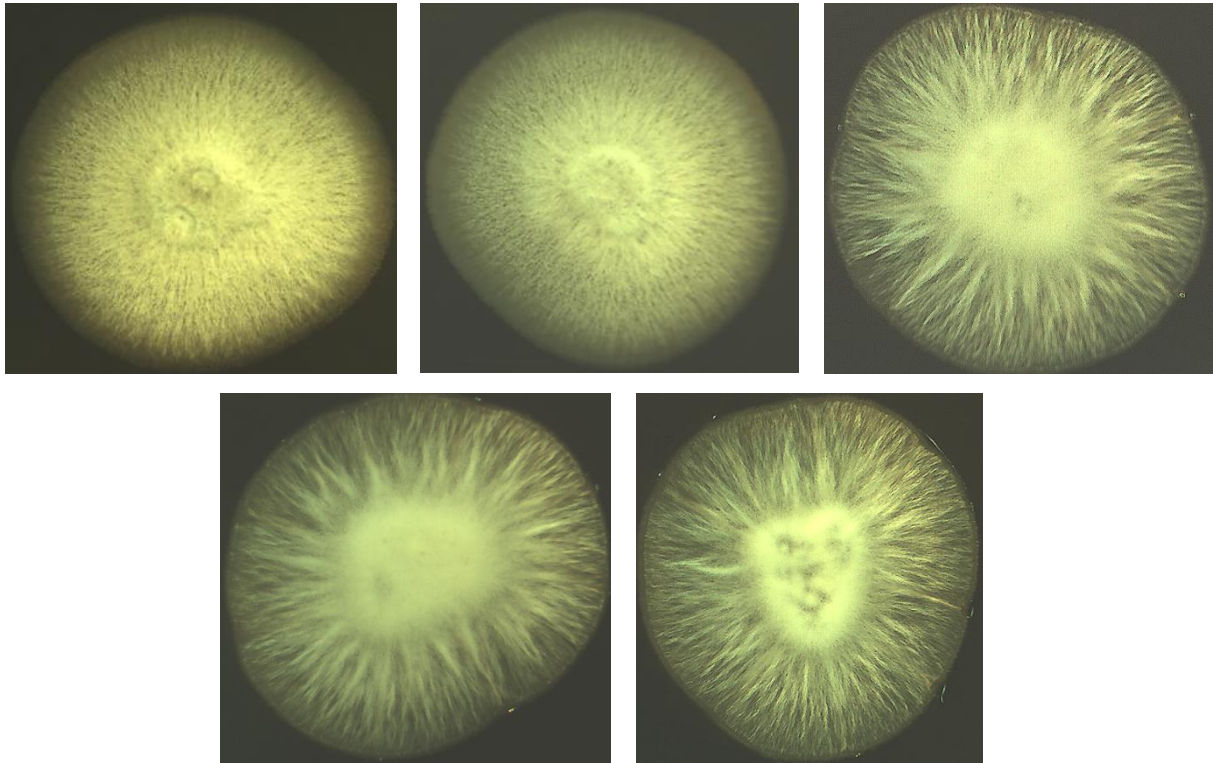


Figura 6. Apariencia macroscópica de las cepas aisladas de *G. candidum*. Arriba, de izquierda a derecha: M1, M2 y M3. Abajo, de izquierda a derecha: M4 y M5.

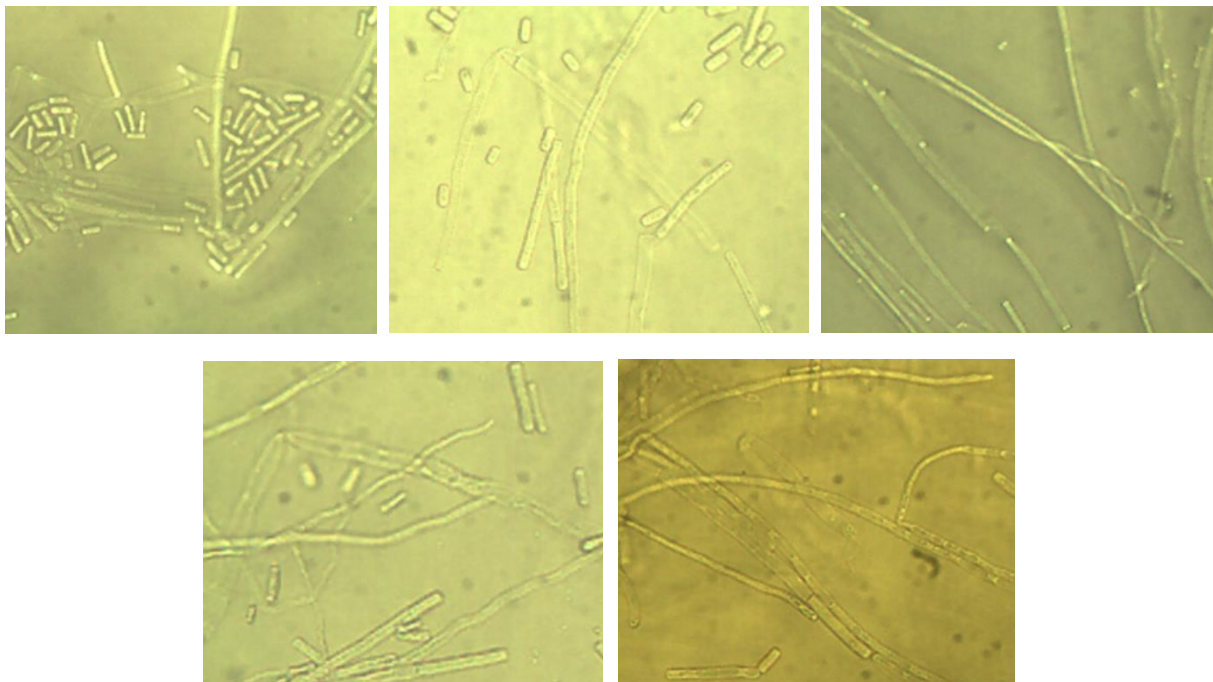


Figura 7. Fotografías microscópicas del micelio de las cepas aisladas de *G. candidum* tomadas con una cámara acoplada al microscopio óptico a 40x. Arriba, de izquierda a derecha: M1, M2 y M3. Abajo, de izquierda a derecha: M4 y M5.

4.4 Lipólisis y proteólisis

Ahora se muestran las placas de Agar Tributirina (**Figura 8**) y Agar Tween 80 (**Figura 9**) a los 2 días de incubación en busca de halos de aclaramiento y halos opacos respectivamente indicadores de lipólisis. En ningún caso se observaron dichos halos, ni a los 2 ni a los 5 días de incubación, es decir, las pruebas de lipólisis fueron todas negativas.



Figura 8. Placas de Agar Tributirina inoculadas con las cepas aisladas de *G. candidum* a las 48 horas de la incubación para la valoración de la actividad lipolítica. De izquierda a derecha: M1, M2, M3, M4 y M5.



Figura 9. Placas de Agar Tween 80 inoculadas con las cepas aisladas de *G. candidum* a las 48 horas de incubación para la valoración de la actividad lipolítica. De izquierda a derecha: M1, M2, M3, M4 y M5.

En cuanto a la proteólisis, los frascos de gelatina mostraron cierta licuefacción a las 48 horas de incubación (**Figura 10**), que desapareció los días posteriores, seguramente por el crecimiento de los micelios en la superficie de la gelatina. La cepa M1 mostró una capacidad proteolítica considerable, ya que el grado de licuefacción de la gelatina fue bastante notable. Sin embargo, las cepas M2, M3, M4 y M5 mostraron una licuefacción limitada y por lo tanto, una proteólisis leve.

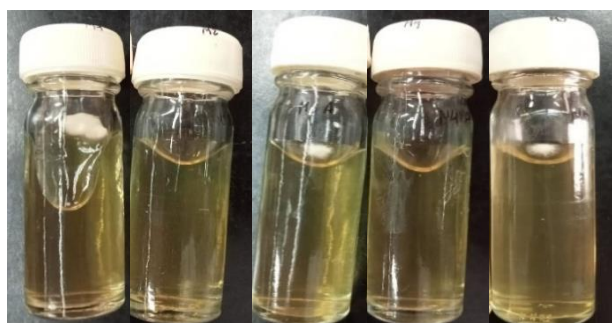


Figura 10. Frascos de gelatina inoculados por picadura con las cepas aisladas de *G. candidum* a las 48 horas de la incubación para la valoración de la actividad proteolítica. De izquierda a derecha: M1, M2, M3, M4 y M5.

Finalmente, en las placas de Agar Caseína tampoco se observaron halos de aclaramiento alrededor de las colonias a las 48 horas de incubación y por lo general, tampoco a los 5 días (**Figura 11**), es decir, esta prueba de proteólisis resultó negativa. Sin embargo, muchas de estas placas sufrieron contaminaciones bacterianas en algún punto del experimento y en algunas de estas contaminaciones sí

aparecieron halos de aclaramiento. Lo más destacable es que en una de las placas de la cepa M3, una de las colonias de *G. candidum*, casualmente cercana a una contaminación bacteriana, sí mostró a su alrededor un halo de aclaramiento, abriendo la puerta a la posibilidad de que la interacción entre ambos organismos potencie la actividad proteolítica del hongo.

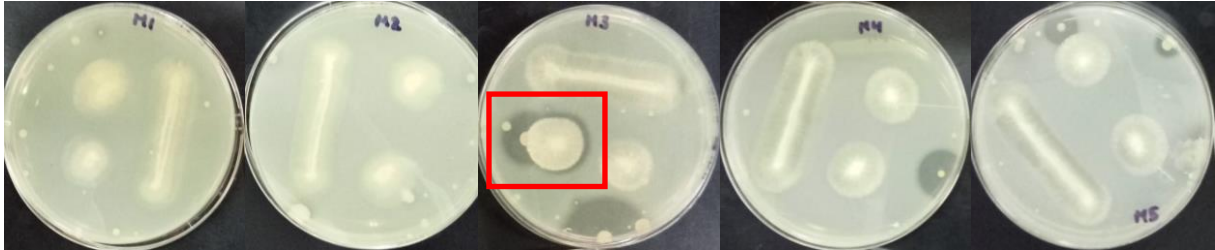


Figura 11. Placas de Agar Caseína inoculadas con las cepas aisladas de *G. candidum* a las 120 horas (5 días) de la incubación para la valoración de la actividad proteolítica. De izquierda a derecha: M1, M2, M3, M4 y M5. En rojo se señala la interacción entre la bacteria y la colonia que sí formó halo de aclaramiento.

Para comprobar si esta interacción realmente promueve la proteólisis, se sembraron 2 placas de Agar Caseína, cada una con 3 puntos de la cepa M3 de *G. candidum* y cerca de cada uno de estos puntos se sembró la bacteria de la interacción. Como control se utilizó una placa de Agar Caseína sembrada solo con 3 puntos de la cepa M3 de *G. candidum*. Las 3 placas se incubaron a 25°C durante 4 días. A diferencia de las placas anteriores, en el control aparecieron halos de aclaramiento de pequeño tamaño indicadores de una leve proteólisis (**Figura 12A**). Aun así, las placas sembradas con ambos organismos mostraron alrededor de las colonias de *G. candidum* halos de aclaramiento de gran tamaño que confirman que la interacción con la bacteria potencia la actividad proteolítica de *G. candidum* (**Figura 12B y 12C**).

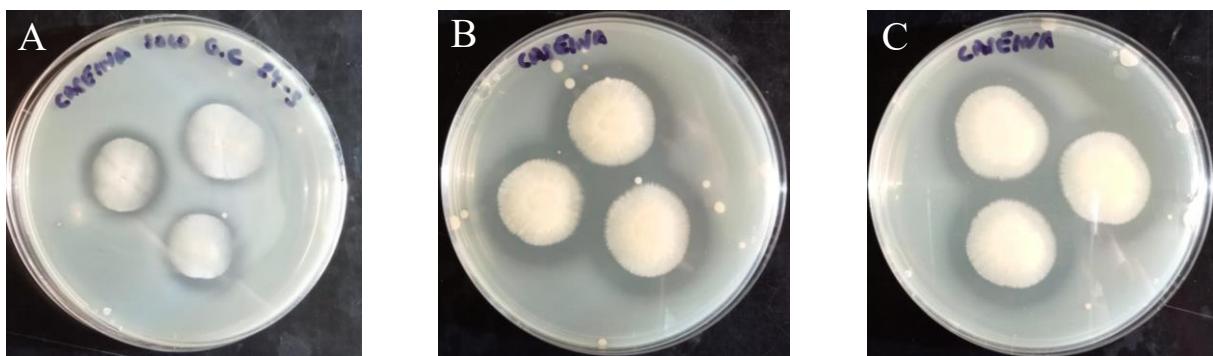


Figura 12. (A) Placa control de Agar Caseína inoculada con la cepa M3 de *G. candidum* a las 96 horas de la incubación. (B y C) Placas de Agar Caseína inoculadas con la cepa M3 de *G. candidum* y con la bacteria de la contaminación a las 96 horas para la valoración de la actividad proteolítica de la interacción entre ambos.

Una vez comprobada la hipótesis se aisló la bacteria de la interacción en una placa de TSA utilizando una siembra en estrías por agotamiento y se incubó 1 día a 25°C para ser analizada por el espectrómetro de masas MALDI-TOF. Pasadas las 24 horas, la bacteria se inoculó por cultivo directo en un pocillo de una placa de MALDI-TOF, utilizando como control

interno una cepa de *E. coli*. Para la identificación de las muestras y la lectura de los resultados generados por el equipo se utilizó el programa informático *FlexControl*.

A partir de la muestra, el equipo estableció una identificación altamente confiable, determinando que la bacteria correspondía a la especie *Paenibacillus amylolyticus*. Una puntuación en un rango de entre 2 y 3 indica una identificación altamente fiable, obteniendo en nuestro caso 2,34. También se analizaron las 5 cepas de *G. candidum*, en este caso cultivadas 48 horas a 25°C, y al igual que la bacteria, las cepas se inocularon en la placa de MALDI-TOF por cultivo directo. El equipo relacionó las cepas con las especies *G. candidum* y *G. silvicola*, aunque en ambos casos las identificaciones fueron de baja consistencia.

4.5 Influencia de diversos factores en el crecimiento

A continuación, se muestra la tasa de crecimiento (mm/día) de cada una de las cepas en las diferentes condiciones (**Tabla 1**). En las tasas de crecimiento de los controles se puede observar que las cepas M3, M4 y M5 crecen con más facilidad que la cepa M2 y especialmente que la cepa M1.

En primer lugar, se puede observar que el crecimiento de *G. candidum* se ve estimulado a bajas concentraciones de sal, ya que a 1% y a veces también a 1,5%, el crecimiento es mayor que en los controles, que no tienen sal. El mayor crecimiento se observa a una concentración de sal del 1%, sin embargo, a partir del 2% el crecimiento se va inhibiendo progresivamente.

Por otro lado, se puede observar en todos los casos que cuanto mayor sea la actividad de agua, mayor será el crecimiento de *G. candidum*. De hecho, en algunos casos (por ejemplo, en M5) hay diferencias relativamente grandes entre el crecimiento del control, con una actividad de agua de 0,995 y el crecimiento a una actividad de agua ligeramente menor, de 0,985.

Respecto a la temperatura, hay diferencias notables entre el crecimiento de *G. candidum* a 10 o 15°C respecto al crecimiento a la que *a priori* es la temperatura óptima, 25°C. De hecho, la cepa M3 duplicó su crecimiento a 10°C tan solo siendo incubada a 5°C más, concretamente 15°C.

Finalmente, en las distintas condiciones de pH es donde menor diferencia existe en el crecimiento y donde se han observado comportamientos más diferentes en función de la cepa utilizada. Aun así, el mayor crecimiento se ha observado a un pH de 6,5 en todas las cepas a excepción de M2. Además, de forma general el crecimiento a un pH de 7,5 ha sido superior al crecimiento a un pH de 5,5. Esto es algo difícil de explicar ya que el crecimiento de los controles, donde el pH es de 5,17; ha sido superior al observado en cualquiera de los otros casos.

Tabla 1. Tasas de crecimiento de las 5 cepas aisladas de *G. candidum* en las diferentes condiciones de sal, actividad de agua, temperatura y pH. Los controles tienen 0% de sal, 0,995 de actividad de agua, un pH de 5,17 y se incubaron a 25°C.

Controles					
Cepa	M1	M2	M3	M4	M5
Tasa de crec. (mm/día)	8,04	8,14	8,64	8,71	8,84
% de sal (NaCl)					
Cepa	M1	M2	M3	M4	M5
1%	8,43	9,11	9,19	8,97	9,28
1,5%	8,12	8,31	8,51	8,68	9,06
2%	7,41	7,47	7,97	7,56	7,54
2,5%	6,77	6,89	6,33	6,69	6,62
Actividad de agua (a _w)					
Cepa	M1	M2	M3	M4	M5
0,966	4,87	5,02	5,57	5,53	5,6
0,975	5,57	5,61	6,41	6,39	6,26
0,985	7,37	7,23	7,92	8,12	7,49
Temperatura (°C)					
Cepa	M1	M2	M3	M4	M5
10 °C	2,44	2,38	2,16	2,63	2,59
15 °C	4,03	3,87	4,42	4,3	4,52
pH					
Cepa	M1	M2	M3	M4	M5
5,5	6,7	6,93	7,47	7,68	7,42
6,5	7,14	7,09	7,87	8,11	7,7
7,5	7,14	7,17	7,36	8,07	7,51

4.6 Cultivo protector

A continuación, se muestran los resultados del experimento de *G. candidum* como cultivo protector frente a hongos filamentosos. Es importante destacar que en algunos casos las colonias de *G. candidum* aparecieron dispersas por toda la placa, ya que al hacer el cultivo en sobrecapa, esta pudo movilizar las artrosporas de *G. candidum* provocando su crecimiento en toda la superficie de la placa. El crecimiento de las esporas de la cepa MP15 de *P. roqueforti* (**Figura 13**) y de la cepa MP82 de *P. commune* (**Figura 14**) no se vio inhibido por *G. candidum*. En los controles, se puede observar el crecimiento de las esporas por toda la superficie de la placa, al igual que ocurre en presencia de las cepas M1 y M2, donde únicamente no hay esporas en los puntos donde crecen las colonias de *G. candidum*, es decir, este no actúa como cultivo protector frente a estas 2 cepas. Sin embargo, *G. candidum* sí actuó como cultivo protector frente a la cepa MP88 de *P. verrucosum*, pudiéndose observar zonas de aclaramiento en las placas con las cepas M1 y M2 que no aparecen en el control (**Figura 15**).

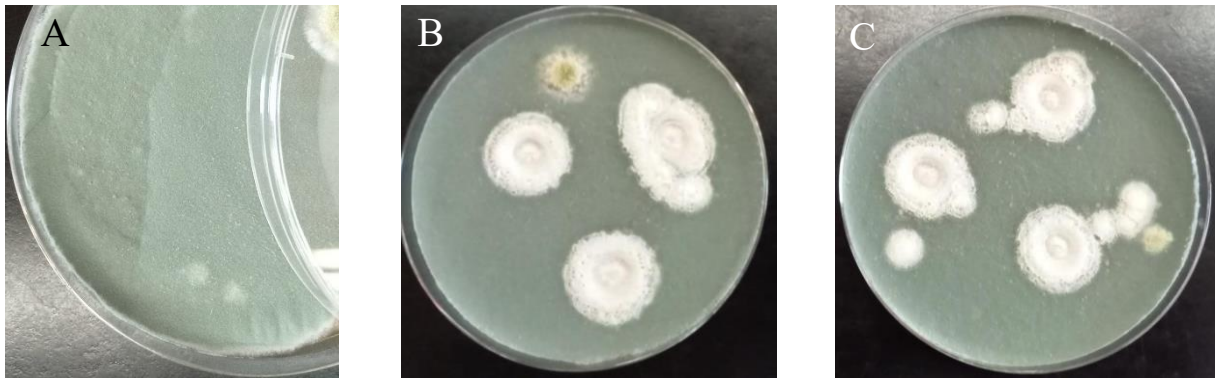


Figura 13. (A) Placa control con la suspensión de esporas de *P. roqueforti* MP15 cultivada en sobrecapa a los 5 días de incubación. (B y C) Placas con la suspensión de esporas de *P. roqueforti* MP15 cultivada en sobrecapa encima de las cepas aisladas M1 (B) y M2 (C) de *G. candidum* a los 5 días de incubación.

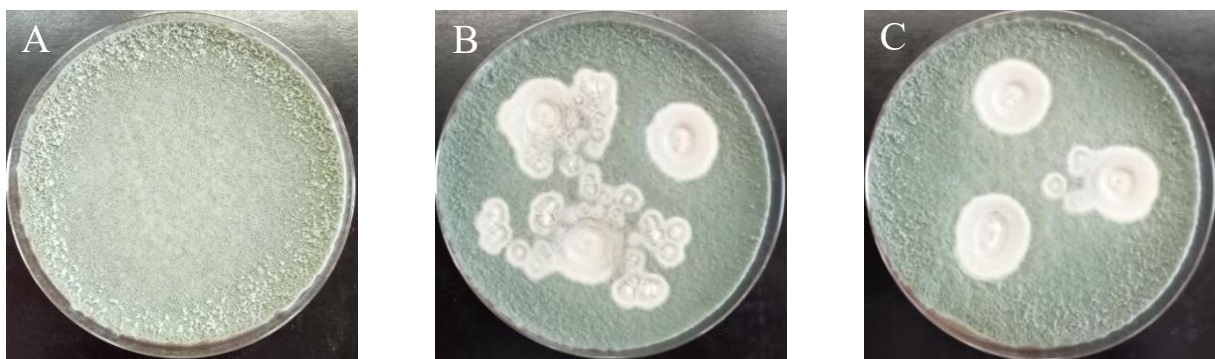


Figura 14. (A) Placa control con la suspensión de esporas de *P. commune* MP82 cultivada en sobrecapa a los 5 días de incubación. (B y C) Placas con la suspensión de esporas de *P. commune* MP82 cultivada en sobrecapa encima de las cepas aisladas M1 (B) y M2 (C) de *G. candidum* a los 5 días de incubación.

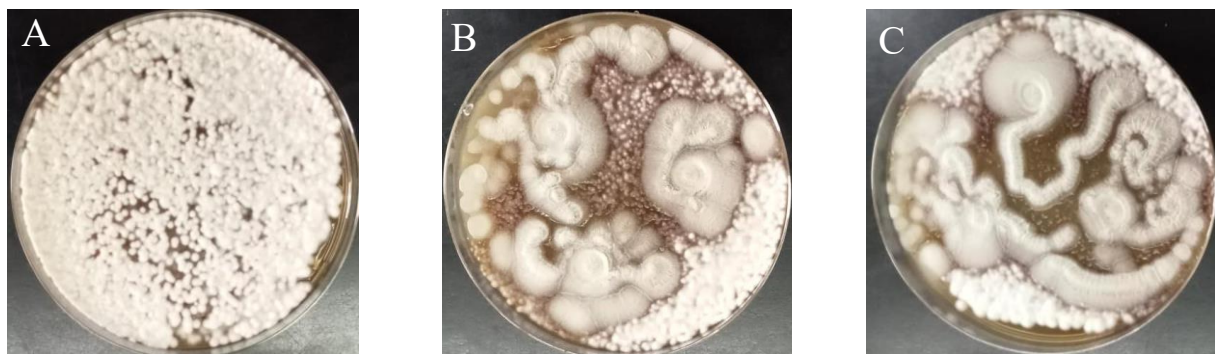


Figura 15. (A) Placa control con la suspensión de esporas de *P. verrucosum* MP88 cultivada en sobrecapa a los 5 días de incubación. (B y C) Placas con la suspensión de esporas de *P. verrucosum* MP88 cultivada en sobrecapa encima de las cepas aisladas M1 (B) y M2 (C) de *G. candidum* a los 5 días de incubación.

5. DISCUSIÓN

En lo que respecta al recuento de nuestras cepas, las unidades formadoras de colonias por gramo de alimento, en este caso de queso, fueron generalmente mayores para las cepas aisladas de quesos Brie que para las cepas aisladas de quesos Camembert. Aun así, en todos los quesos utilizados *G. candidum* tiene más de $3 \cdot 10^6$ UFC/g.

G. candidum está presente en bajas concentraciones en la leche cruda, normalmente por debajo de 10^2 UFC/mL (Šipošová *et al.*, 2021). En los quesos blandos, al inicio de la maduración suele estar presente en un rango de entre 10^4 y 10^5 UFC/g y aumenta en la primera semana de maduración hasta alcanzar un rango aproximado de entre 10^6 y 10^7 UFC/g. Esto se debe principalmente a la temperatura de la primera fase de maduración, que puede llegar incluso a los 30°C. Después, ya con temperaturas de 10 o 15°C puede alcanzar las 10^7 o 10^8 UFC/g desde el día 7 hasta el día 21 de maduración. Sin embargo, en el caso de quesos madurados a temperaturas más bajas, aproximadamente a 4°C, esta cuantificación es menor. Desde el día 21 hasta el día 28 de maduración, *G. candidum* se mantiene relativamente estable y a partir de ahí disminuye finalmente hasta las 10^6 o 10^7 UFC/g (Li *et al.*, 2020). Esta cuantificación final coincide con los recuentos realizados a nuestras 5 cepas aisladas.

Respecto a la identificación de las cepas aisladas, los resultados obtenidos en las galerías ID 32 C fueron los esperados. Según la tabla de identificación de 63 levaduras diferentes frecuentes en productos lácteos proporcionada por la casa comercial de las galerías ID 32 C (*bioMérieux*, España), todas las cepas de las especies del género *Geotrichum* asimilan la glucosa y muestran sensibilidad a la actidiona. Además, el 99% de las cepas del género *Geotrichum* también asimilan el sorbitol, la D-Xilosa, el glicerol y la sorbosa. Por otro lado, más del 90% de las cepas del género *Geotrichum* utilizan también el manitol, el DL-Lactato y la galactosa. Todas estas reacciones resultaron positivas para ambas cepas, es decir, tanto M1 como M2 asimilaron estos sustratos tal y como se esperaba.

Por otra parte, el resto de los sustratos presentes en las galerías no son asimilados por ninguna cepa perteneciente al género *Geotrichum* a excepción de la L-Arabinosa y el levulinato, que son utilizados por menos del 5% de las cepas de dicho género. Esto también coincide con los resultados obtenidos, ya que todas estas reacciones resultaron negativas para las 2 cepas utilizadas. Por todo lo comentado, podemos confirmar que las cepas aisladas pertenecen al género *Geotrichum* y asumimos que también a la especie *G. candidum* ya que es uno de los componentes más importantes y frecuentes de la microbiota de los quesos blandos y semifrescos (Boutrou y Guéguen, 2005).

Además, la especie *G. candidum* en concreto nunca es capaz de asimilar la lactosa pero sí la galactosa y posteriormente el lactato (Soullignac, 1995), aunque la utilización de este último como fuente de carbono y energía cambia según la cepa que se utilice y también según el origen de esta (Marcellino *et al.*, 2001).

Por otro lado, en función de las fotografías macroscópicas y microscópicas tomadas de las 5 cepas aisladas, se pueden adscribir dichas cepas a los distintos morfotipos de *G. candidum*.

Las cepas M1 y M2 se pueden catalogar dentro del primer morfotipo, el levaduriforme, debido a la evidente similitud morfológica que muestran las colonias a simple vista. Macroscópicamente, al igual que en el morfotipo levaduriforme, se puede observar un micelio de pequeño tamaño, mientras que las hifas ocupan la mayor parte de la colonia. Además, microscópicamente también se puede observar que al igual que el morfotipo levaduriforme, tienen una mayor producción de artrosporas y menor cantidad de hifas respecto al resto de cepas aisladas (Guéguen y Jacquet, 1982).

De forma contraria, las cepas M3, M4 y M5 se pueden incluir dentro del tercer morfotipo, ya que cuentan con una morfología más similar a un hongo que a una levadura. En este caso, al igual que el morfotipo fungiforme, macroscópicamente se puede ver que el micelio ocupa gran parte de la colonia. También se puede observar que microscópicamente tienen menor capacidad de producción de artrosporas y mayor cantidad de hifas que las otras cepas aisladas, coincidiendo también con el morfotipo fungiforme (Guéguen y Jacquet, 1982).

En lo que respecta al experimento de lipólisis, es difícil explicar que los resultados de todas las pruebas fueran negativos. El Tween 80 incrementa el rendimiento de la actividad lipolítica extracelular de *G. candidum* (Jacobsen *et al.*, 1989). Por su parte, la tributirina, al igual que los aceites vegetales, incrementa la producción de las lipasas A y C extracelulares por parte de algunas cepas del género *Geotrichum* (Ota *et al.*, 2014). Cabe destacar que dependiendo de la cepa y también de las condiciones y factores de cultivo, se pueden observar diferencias entre las distintas lipasas de *G. candidum*, no solo en la estructura primaria de las enzimas, sino también en la especificidad por el sustrato y en el grado de glicosilación (Holmquist *et al.*, 1997). Esto último puede explicar que todas las pruebas resultaran negativas.

En cuanto a los experimentos de proteólisis, los resultados de la prueba de licuefacción de la gelatina sí fueron los esperados, ya que muchas cepas de *G. candidum* tienen la capacidad de hidrolizar la gelatina (Wade *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2018). Aun así, tal y como se muestra en los resultados, esta capacidad de hidrólisis por parte de *G. candidum* suele ser bastante limitada, habiendo otras especies del género *Geotrichum* como *G. capitatum* con mayor capacidad para licuefacer la gelatina (Falih, 1997). Por otro lado, los resultados negativos de la prueba de proteólisis en Agar Caseína son más difíciles de explicar, ya que *G. candidum* lleva a cabo la hidrólisis de caseínas durante la maduración de los quesos blandos y también se ha demostrado

que *in vitro* degrada α_s y β -caseínas en aproximadamente 2 días (Boutrou *et al.*, 2006). Hay que tener en cuenta, que al igual que en la lipólisis, la aptitud proteolítica de *G. candidum* varía en función de la cepa utilizada (Eck, 1990), ya que existe una alta variabilidad en la producción de las enzimas proteolíticas dependiendo de la cepa que se utilice (Guéguen y Lenoir, 1975).

En términos generales, todas las cepas aisladas de *G. candidum* resultaron ser poco lipolíticas y poco proteolíticas. Sin embargo, al igual que ocurrió con la contaminación bacteriana de *Paenibacillus amylolyticus*, es posible que *G. candidum* vea potenciadas sus actividades lipolítica y proteolítica al interactuar con la gran multitud de microorganismos que hay presentes en los quesos. Un ejemplo de ello es la interacción con *P. camemberti*, donde ambos organismos ven mejorada su actividad proteolítica en cultivos mixtos respecto a cultivos puros (Boutrou *et al.*, 2006). Por su parte, *P. amylolyticus* es una especie bacteriana perteneciente al género *Paenibacillus*. Esta, desempeña funciones esenciales en la biotecnología industrial y farmacéutica, teniendo la capacidad de eliminar la demanda química de oxígeno (DQO), entre otras cosas (Anandan y Vittal, 2019). En lo que respecta a la identificación de baja consistencia de las 5 cepas mediante MALDI-TOF, es posible que se deba a la inoculación por cultivo directo, un método utilizado generalmente para bacterias.

Respecto a la influencia de los diversos factores en el crecimiento de *G. candidum*, según algunos estudios la tasa de crecimiento puede llegar a alcanzar los 9,13 mm/día a una temperatura óptima de entre 25 y 28°C, pero esta desciende considerablemente por debajo de los 10°C (Koňuchová y Valík, 2021). A pesar de que en nuestro caso el crecimiento de los controles, incubados a 25°C, no ha sido tan elevado, sí se ha aproximado al valor mencionado. Además, algunas cepas incubadas también a 25°C sí han tenido un crecimiento mayor a 9,13 mm/día en condiciones de 1% de sal. De hecho, a pesar de que la tolerancia a la sal por parte de *G. candidum* depende de la cepa utilizada, algunos estudios afirman que la concentración óptima de sal es del 1% (Wyder, 1998). Por otro lado, la actividad de agua óptima para el crecimiento de *G. candidum* es aproximadamente 0,99; ya que puede llegar a tener una tasa de crecimiento hasta 10 veces mayor que a una actividad de agua de 0,95 a temperaturas óptimas de entre 25 y 30°C (Plaza *et al.*, 2003). A pesar de que en nuestro caso las diferencias de crecimiento no han sido tan elevadas, sí se puede observar que a medida que aumenta la actividad de agua también lo hace de forma notable el crecimiento. Finalmente, cabe destacar que el pH más adecuado para obtener un mayor crecimiento de *G. candidum* cambia según la bibliografía, estando según algunos estudios entre y otros entre 6,0 y 7,0 (Lecocq, 1991), lo que coincide por lo general con los resultados que hemos obtenido.

Por último, se considera que *Penicillium* es el género fúngico que contamina el queso más frecuentemente, existiendo hasta 15 especies asociadas al deterioro de este. En primer lugar, *P. commune* es una especie micotoxigénica productora de ácido ciclopiazónico (CPA), una micotoxina también producida por otras especies como *P. camemberti*, aunque en este último caso no resulta contaminante (Ramos-Pereira *et al.*, 2019). En segundo lugar, la mayoría de las cepas de *P. roqueforti* producen en niveles bajos algunas micotoxinas como la roquefortina C, ácido penicílico, ácido micofenólico y patulina (Cakmakci *et al.*, 2015). Finalmente, *P. verrucosum* es productor de algunas micotoxinas nefrotóxicas como la ocratoxina A y la citrinina (Coton *et al.*, 2019; Ramos-Pereira *et al.*, 2019). Cabe destacar que es altamente probable que la inhibición de estas especies por *G. candidum* sea dependiente de las cepas utilizadas.

6. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que las 5 cepas aisladas de los diferentes quesos Camembert y Brie pertenecen a la especie *Geotrichum candidum*, pudiendo catalogar según su morfología las cepas M1 y M2 dentro del morfotipo levaduriforme y las cepas M3, M4 y M5 dentro del morfotipo fungiforme, a pesar de que estas últimas no cuenten con la alta actividad proteolítica que *a priori* deberían tener. De hecho, todas las cepas aisladas cuentan con una leve actividad tanto proteolítica como lipolítica, aunque la interacción de *G. candidum* con otros microorganismos presentes en el queso puede potenciar dichas actividades. Por otro lado, las mejores condiciones (dentro de las estudiadas) para el crecimiento de *G. candidum* son: una temperatura de 25°C, una actividad de agua de 0,995 y una concentración de sal del 1%. En el caso del pH, el mayor crecimiento se obtuvo con un valor de 6,5; pero los controles, con un pH aproximado de 5,17; tuvieron un crecimiento superior. Finalmente también podemos concluir que algunas cepas de *G. candidum* pueden actuar como cultivo protector frente a algunos hongos alterantes y/o toxigénicos del género *Penicillium*, como por ejemplo *P. verrucosum*.

7. REFERENCIAS

- Adour, L., Couriol, C., Amrane, A. y Prigent, Y. (2002) "Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* in liquid media in relation with the consumption of carbon and nitrogen sources and the release of ammonia and carbon dioxide", *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), pp. 533-542.
- Aldarf, M., Amrane, A. y Prigent, Y. (2002) "Carbon and nitrogen substrates consumption, ammonia release and proton transfer in relation with growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* on a solid medium", *Journal of Biotechnology*, 95(2), pp. 99-108.
- Amrane, A. y Prigent, Y. (1997) "Comparaison des paramètres de croissance en milieux solides et liquides de *Geotrichum candidum* Geo17 et *Penicillium camemberti* LV2", *Le Lait*, 77(5), pp. 641-648.

- Anandan, K. y Vittal, R. R. (2019) "Endophytic *Paenibacillus amylolyticus* KMCLE06 extracted dipicolinic acid as antibacterial agent derived via dipicolinic acid synthetase gene", *Current Microbiology*, 76(2), pp. 178-186.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. (1983) *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. (1990) *Yeasts: characteristics and identification*. 2.^a ed. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Becerro, P. (2012) *El queso Brie. Nota de cata y características*. Disponible en: <https://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/el-queso-brie-nota-de-cata-y-caracteristicas> (Accedido: 13 de abril de 2022).
- Bertolini, M. C., Schrag, J. D., Cygler, M., Ziomek, E. *et al.* (1995) "Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene", *European Journal of Biochemistry*, 228(3), pp. 863-869.
- BioMérieux (2022) *APIWEB*. Disponible en: <https://apiweb.biomerieux.com/login> (Accedido: 13 de Mayo de 2022).
- Boutrou, R., Aziza, M. y Amrane, A. (2006) "Enhanced proteolytic activities of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* in mixed culture", *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), pp. 325-331.
- Boutrou, R. y Guéguen, M. (2005) "Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology", *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), pp. 1-20.
- Boutrou, R., Kerriou, L. y Gassi, J. Y. (2006) "Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese", *International Dairy Journal*, 16(7), pp. 775-783.
- Bruker (2014) *FlexControl (Versión 3.4) [Programa de ordenador]*. Disponible en: <https://bruker-daltonics-flexcontrol.software.informer.com/3.4/> (Accedido: 30 de Marzo de 2022)
- Butler, E. E., Webster, R. K. y Eckert, J. W. (1962) "Taxonomy, pathogenicity and physiological properties of the fungus causing sour rot of citrus", *Phytopathology*, 55(11), pp. 1262-1268.
- Cakmakci, S., Gurses, M., Hayaloglu, A. A., Cetin, B. *et al.* (2015) "Mycotoxin production capability of *Penicillium roqueforti* in strains isolated from mould-ripened traditional Turkish civil cheese", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(2), pp. 245-249.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2003) "Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge", *International Dairy Journal*, 13(11), pp. 841-866.
- Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F. *et al.* (2001) "Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products", *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), pp. 53-58.
- Coton, M., Auffret, A., Poirier, E., Debaets, S. *et al.* (2019) "Production and migration of ochratoxin A and citrinin in Comté cheese by an isolate of *Penicillium verrucosum* selected among *Penicillium* spp. mycotoxin producers in YES medium", *Food Microbiology*, 82, pp. 551-559.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M. *et al.* (1993) "Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins", *Protein Science*, 2(3), pp. 366-382.
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M. y Magan, N. (2007) "Mould germination: data treatment and modelling", *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), pp. 17-24.
- de Hoog, G. S. y Smith, M. T. (2004) "Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs", *Studies in Mycology*, 50(2), pp. 489-515.
- de Hoog, G. S., Smith, M. T. y Guého, E. (1986) "A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs", *Studies in Mycology*, 29, pp. 1-131.
- de Hoog, G. S., Smith, M. T. y Guého, E. (1998) "*Galactomyces* Redhead & Malloch", en Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (eds.) *The yeasts, a taxonomic study*. 4.^a ed. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier, pp. 209-213.
- Desmasures, N., Bazin, F. y Guéguen, M. (1997) "Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy", *Journal of Applied Microbiology*, 83(1), pp. 53-58.
- Dieuleveux, V. y Guéguen, M. (1998) "Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese", *Journal of Food Protection*, 61(10), pp. 1281-1285.

Dieuleveux, V., Lemarinier, S. y Guéguen, M. (1998) "Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid", *International Journal of Food Microbiology*, 40(3), pp. 177-183.

Eck, A. (1990) *El queso*. Barcelona, España: Ediciones Omega.

Eliskases-Lechner, F. (2002) "*Geotrichum candidum*", en Fuquay, J. W., Fox, P. F. y Roginski, H. (eds.) *Encyclopedia of dairy sciences*. San Diego, EEUU: Academic Press, pp. 1229-1234.

Falih, A. M. (1997) "Production of extracellular enzymes by some soil yeasts", *Qatar University Science Journal*, 17(1), pp. 97-102.

Food and Drug Administration (2014) *Water activity in foods*. Disponible en: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/water-activity-aw-foods> (Accedido: 12 de abril de 2022).

Fresno, M., Tornadijo, E., Carballo, J., Bernardo, A. et al. (1997) "Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of a Spanish craft goat cheese (Armada variety)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(2), pp. 148-154.

Gaborit, P., Menard, A. y Morgan, F. (2001) "Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses", *International Dairy Journal*, 11(4-7), pp. 315-325.

Garrison, E. R. y Holdar, M. A. (1961) "Variation in cultures of *G. candidum* isolated from cream", *Journal of Dairy Science*, 44, p. 972 (Abstract).

Guéguen, M. (1984) *Contribution to knowledge of Geotrichum candidum and in particular to its variation. Consequences for dairy technology*. Tesis doctoral. Université de Caen.

Guéguen, M., Delespaul, G. y Lenoir, J. (1974) "La flore fongique superficielle des fromages de St-Nectaire et de tome de Savoie", *Revue Laitière Française*, 325, pp. 795-816.

Guéguen, M. y Jacquet, J. (1982) "Etudes sur les caractères cultureux et la morphologie de *Geotrichum candidum* Link", *Le Lait*, 62(621-622), pp. 625-644.

Guéguen, M., Jacquet, J., Allain-Garnier, A., Pineau, A. et al. (1984) "Sur les interactions microbiennes de *Geotrichum candidum* Link", *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 2, pp. 139-152.

Guéguen, M. y Lenoir, J. (1975) "Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques", *Le Lait*, 55(543-544), pp. 145-162.

Guéguen, M. y Lenoir, J. (1976) "Caractères du système protéolytique de *Geotrichum candidum*", *Le Lait*, 56(557), pp. 439-448.

Hang, Y. D., Splittstoesser, D. F. y Landschoot, R. L. (1974) "Propagation of *Geotrichum candidum* in acid brine", *Journal of Applied Microbiology*, 27(4), pp. 807-808.

Hannan, Y. y Guéguen, M. (1985) "Activités endopeptidasiques du levain fongique *Geotrichum candidum* en fonction de sa croissance", *Science des Aliments*, 5, pp. 147-152.

Harrigan, W. F. y McCance, M. E. (1979) *Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*. León, España: Academia.

Hartmann, K. y Maubois, J. L. (2017) "Mould surface-ripened cheeses", en Papademas, P. y Bintsis, T. (eds.) *Global cheesemaking technology: cheese quality and characteristics*. Chichester, Inglaterra: Wiley, pp. 392-396.

Holmquist, M., Tessier, D. C. y Cygler, M. (1997) "Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II", *Biochemistry*, 36(48), pp. 15019-15025.

Hudecová, A., Valík, L. y Liptáková, D. (2009) "Influence of temperature on the surface growth of *Geotrichum candidum*", *Acta Chimica Slovaca*, 2(2), pp. 75-87.

Hudecová, A., Valík, L. y Liptáková, D. (2011) "Surface growth of *Geotrichum candidum*: effect of the environmental factors on its dynamics", *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 5(1), pp. 17-22.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1978) *Microorganisms in foods 1: their significance and methods of enumeration*. 2.^a ed. Toronto, EEUU: University of Toronto Press.

Jacobsen, T., Jensen, B., Olsen, J. y Allermann, K. (1989) "Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(3), pp. 256-261.

- Jensen, R. G. (1974) "Characteristics of the lipase from the mold, *Geotrichum candidum*: a review", *Lipids*, 9(3), pp. 149-157.
- Koňuchová, M. y Valík, L. (2021) "Modelling the radial growth of *Geotrichum candidum*: effects of temperature and water activity", *Microorganisms*, 9(3):532.
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (eds.) (1998) *The yeasts, a taxonomy study*. 4.^a ed. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Lactocyex S.L (2019) *Cultivos bio-protectores y probióticos*. Disponible en: http://www.lactocyex.com/prod_auxiliar_industria_lactea_cultivos-bioprotectores.html (Accedido: 15 de abril de 2022).
- Lecocq, J. (1991) *Interactions entre Geotrichum candidum et Brevibacterium linens. Influence de facteurs intervenant en technologie fromagere*. Tesis doctoral. Université de Caen.
- Lecocq, J. y Guéguen, M. (1994) "Effects of pH and sodium chloride on the interactions between *Geotrichum candidum* and *Brevibacterium linens*", *Journal of Dairy Science*, 77(10), pp. 2890-2899.
- Li, Y., Zhang, X., Yang, J. J., Ma, X. Y. *et al.* (2020) "Influence of the addition of *Geotrichum candidum* on the microbial, chemical, textural, and sensory features of soft soy cheese", *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11), e14823.
- Litthauer, D., Louw, C. H. y du Toit, P. J. (1996) "*Geotrichum candidum* P-5 produces an intracellular serine protease resembling chymotrypsin", *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(10), pp. 1123-1130.
- Ma, W., Zhang, Y., Wang, C., Liu, S. *et al.* (2018) "A new disease of strawberry, fruit rot, caused by *Geotrichum candidum* in China.", *Plant Protection Science*, 54(2), pp. 92-100.
- Magnusson, J. y Schnürer, J. (2001) "*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound", *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), pp. 1-5.
- Marcellino, N. y Benson, D. R. (2013) "The good, the bad, and the ugly: tales of mold-ripened cheese", *Microbiology Spectrum*, 1(1), pp. 1-26.
- Marcellino, N., Beuvier, E., Grappin, R., Guéguen, M. *et al.* (2001) "Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France", *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), pp. 4752-4759.
- Molimard, P., Vassal, L., Bouvier, I. y Spinnler, H. E. (1995) "Suivi de croissance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* en culture pure et en association au cours de l'affinage de fromages expérimentaux à pâte molle de type camembert", *Le Lait*, 75(1), pp. 3-16.
- Motic (2021) *Motic Images Plus (Versión 3.0) [Programa de ordenador]*. Disponible en: https://www.motic.com/Eur_EuropeDownload/ (Accedido: 11 de Mayo de 2022)
- Mourgues, R., Bergère, J. L. y Vassal, L. (1983) "Possibility of improving organoleptic quality of Camembert cheese using *Geotrichum candidum*", *La Technique Laitière*, 978, pp. 11-15.
- Nielsen, M. S., Frisvad, J. C. y Nielsen, P. V. (1998) "Colony interaction and secondary metabolite production of cheese-related fungi in dual culture", *Journal of Food Protection*, 61(8), pp. 1023-1029.
- Ota, Y., Sawamoto, T. y Hasuo, M. (2000) "Tributyryn specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(11), pp. 2497-2499.
- Pažakova, J., Pipova, M., Nagy, J. y Turek, P. (2003) "The growth of *Geotrichum candidum* at different temperatures and sodium chloride concentrations", *Folia Veterinaria*, 47(3), pp. 212-214.
- Perkins, V., Vignola, S., Lessard, M. H., Plante, P. L. *et al.* (2020) "Phenotypic and genetic characterization of the cheese ripening yeast *Geotrichum candidum*", *Frontiers in Microbiology*, 11:737.
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009) "Primary keys and miscellaneous fungi", en Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (eds.) *Fungi and food spoilage*. 3.^a ed. Nueva York, EEUU: Springer, pp. 53-143.
- Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N. y Viñas, I. (2003) "Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*", *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), pp. 549-554.
- Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J. P. y Guéguen, M. (2008) "Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*", *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), pp. 327-332.

- Ramos-Pereira, J., Mareze, J., Patrinoú, E., Santos, J. A. *et al.* (2019) "Polyphasic identification of *Penicillium* spp. isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses", *Food Microbiology*, 84:103253.
- Ratray, F. P. (2002) "Cheese | Secondary cultures", en Fuquay, J. W., Fox, P. F. y Roginski, H. (eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, EEUU: Academic Press, pp. 275-281.
- Ratray, F. P. y Eppert, I. (2021) "Secondary cultures", en McSweeney, P. L. H. y McNamara, J. P. (eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 3.^a ed. San Diego, EEUU: Academic Press, pp. 336-342.
- Ribadeau-Dumas, B. (1984) "Maîtrise de l'affinage des fromages de type Camembert", *Le Lait*, 64(643-644), pp. 448-468.
- Robinson, P. M. y Griffith, P. J. (1977) "Effect of restricted aeration on chemotropism, morphogenesis and polarity of lateral branch induction in *Geotrichum candidum* Link ex Pers", *Transactions of the British Mycological Society*, 68(2), pp. 311-314.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Iizurni, T. *et al.* (1989) "cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase", *The Journal of Biochemistry*, 106(3), pp. 383-388.
- Šipošová, P., Koňuchová, M., Valík, L., Trebichavská, M. *et al.* (2021) "Quantitative characterization of *Geotrichum candidum* growth in milk", *Applied Sciences*, 11(10):4619.
- Soullignac, L. (1995) *Propriétés des levures fromagères: influence des sources de carbone utilisées sur leurs aptitudes à désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme*. Tesis doctoral. Institut National Agronomique Paris Grignon.
- Species 2000 (2022) *Catalogue of Life*. Disponible en: <https://www.catalogueoflife.org/> (Accedido: 25 de Mayo de 2022).
- Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Sarmiento, R. M. y Carballo, J. (1998) "Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk", *Le Lait*, 78(6), pp. 647-659.
- Uraz, T. y Özer, B. H. (2014) "Starter cultures | Molds employed in food processing", en Batt, C. A. y Tortorello, M. (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2.^a ed. Massachusetts, EEUU: Academic Press, pp. 522-528.
- van den Tempel, T. y Nielsen, M. S. (2000) "Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production", *International Journal of Food Microbiology*, 57(3), pp. 193-199.
- Vicent-Soler, J. y Gacto, M. (1991) "Characterization of a neutral proteinase from *Geotrichum lactis* cells", *Microbios*, 66(268-269), pp. 157-171.
- von Arx, J. A. (1977) "Notes on *Dipodascus*, *Endomyces* and *Geotrichum* with the description of two new species", *Antonie van Leeuwenhoek*, 43(3-4), pp. 333-340.
- Wade, W. N., Vasdinnyi, R., Deak, T. y Beuchat, L. R. (2003) "Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of *Geotrichum candidum* with Salmonella", *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), pp. 101-111.
- Welthagen, J. J. y Viljoen, B. C. (1999) "The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese", *Food Microbiology*, 16(1), pp. 63-73.
- Wojtatowicz, M., Chrzanowska, J., Juszczak, P., Skiba, A. *et al.* (2001) "Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese", *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), pp. 135-140.
- Wolfe, B. (2015) *Geotrichum candidum: a yeast holding on to its moldy past*. Disponible en: <https://microbialfoods.org/geotrichum-candidum-mold-transition/> (Accedido: 9 de abril de 2022).
- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J. y Smit, G. (2002) "Microbes from raw milk for fermented dairy products", *International Dairy Journal*, 12(2-3), pp. 91-109.
- Wyder, M. T. (1998) *Identification and characterisation of the yeast flora in kefir and smear ripened cheese. Contribution of selected yeasts to cheese ripening*. Tesis doctoral. ETH Zürich.