



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

INSTITUTO DE LACTOLOGÍA INDUSTRIAL

(UNL-CONICET)

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de

**DOCTOR EN QUÍMICA**

En el campo de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“BIOFORMACIÓN DE FLAVOUR EN QUESOS VÍA  
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS POR FERMENTOS  
LÁCTICOS PRIMARIOS Y ADJUNTOS”**

**Guillermo Hugo Peralta**

Directora: Dra. Erica Rut Hynes

Codirectora: Dra. Carina Viviana Bergamini

**Miembros del Jurado:**

Dr. Claudio Bernal

Dra. Silvia González

Dr. Christian Magni

**SANTA FE**

**-2014-**

# *Agradecimientos*

A mi directora, la Dra. Erica Hynes y a mi codirectora, la Dra. Carina Bergamini, agradecerles la oportunidad que me dieron para ser parte de un excelente grupo de investigación, como así también agradecerles la valiosa orientación, el tiempo dedicado a mi formación, el apoyo constante y sobre todo la paciencia que me han tenido.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por su aporte a la realización de la presente tesis a través de su programa de becas doctorales.

A la Universidad Nacional del Litoral (UNL), y la ANPCyT por el financiamiento de los proyectos que permitieron desarrollar el presente trabajo.

A los miembros del Jurado, por el interés y tiempo dedicados a la evaluación de la presente tesis.

A Cristina Perotti, investigadora del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), agradecerle el tiempo que ha dedicado en el asesoramiento de técnicas cromatográficas, análisis multivarido, entre otras.

A Verónica Wolf, por el asesoramiento en las determinaciones de compuestos volátiles por SPME-GC.

A Carlos Meinardi y Mario Candiotti, por su colaboración y asesoramiento en las elaboraciones de quesos en la planta piloto del INLAIN. Y por sus palabras de aliento en varias oportunidades.

A cada uno de los integrantes del INLAIN: investigadras, docentes, becarios y pasantes con los que pude compartir muchos lindos momentos, o en algunos casos simplemente compartí un mate, un viaje, una charla en los flujos de siembra o simplemente una sonrisa que hicieron que el lugar de trabajo sea un ambiente muy cálido para trabajar (Carlos Z., Jorge R., Andrea Q., Susana P., Silvina R., Viviana S., Ana B., Gabriel V., Patricia B., Diego M., Daniela G., Facundo C., Claudia V., Ayelén V., Florencia Z., Mariángeles B., Elisa A., Silvina P., Sofía I., Sofía H., Eliana S., Noelia D., Noelia P., Leila P., Anela L., Mateja K., Verónica F., Florencia B., Pablo T., Joaquin P., Triana A., Eugenia S., Carolina C., Tatiana B.).

A mis amigos de cursado, con los cuales compartí muchas lindas aventuras, de las que estoy seguro que seguiremos compartiendo (Silvana F., Helena R., Franchezca L., Gisela Y., María K., María T., Diego F., Pablo L., Nicolás P., Matías P., Nicolás V.).

A toda mi familia quienes desde la distancia estuvieron acompañándome y apoyándome siempre.

A todos ellos... MUCHAS GRACIAS

# Publicaciones

## Revistas Internacionales

Peralta, G. H.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C. y Hynes, E. R. (2014). Evaluation of volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* I90 in a hard-cooked cheese model using solid-phase microextraction. *Dairy Science & Technology* 94:73-81.

Bergamini, C. V.; Peralta, G. H.; Milesi, M. M. y Hynes, E. R. (2013). Growth, survival and peptidolytic activity of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model. *Journal of Dairy Science* 96: 5465-5476.

## Congresos Internacionales

Peralta, G. H.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C. y Hynes, E. R. (2012). Aminotransferase Profile of *Lactobacillus paracasei* I90 Led Flavor Formation in Model Cheeses, *6th IDF Cheese Ripening & Technology Symposium, 21-24 Mayo*, Wisconsin- Estados Unidos.

Peralta, G. H.; Candiotti, M. C.; Bergamini, C. V. y Hynes, E. R. (2013). Production of flavour compounds by individual or mixed cultures of lactic acid bacteria. *IV International Symposium on Lactic Acid Bacteria*. Tucuman – Argentina.

Peralta, G. H.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V.; Abeijón Mukdsi, C; Perotti, M. C. y Hynes, E. R. (2011). Flavour compounds produced by *Lactobacillus paracasei* I90 in a hard cheese model. *10th Symposium on Lactic Acid Bacteria*, 28 Agosto - 1 de Septiembre, Egmond aan Zee - Netherlands.

## Congresos Nacionales

Peralta, G. H.; Bergamini, C. V.; Wolf, I. V.; Perotti, M. C. y Hynes, E. R. (2012). Influencia de la adición de cultivos atenuados de *Streptococcus thermophilus* en queso cremoso Agosto *II Simposio Argentino de Lactología*. 16-17 Agosto, Santa Fe - Santa Fe.

Peralta, G. H.; Bergamini, C. V. y Hynes E. R. (2012). Comparación de métodos de lisis y permeabilización de *Streptococcus thermophilus* para su uso en quesería. *II Simposio Argentino de Lactología*. 16-17 Agosto, Santa Fe - Santa Fe.

Cuffia, F.; Peralta, G. H.; Perotti, M. C. Bergamini, C. V. y Hynes, E. R. (2012). Actividades aminotransferasa y glutamato dehidrogenasa en cepas de *Lactobacillus helveticus* autóctonas y comerciales. *II Simposio Argentino de Lactología*. 16-17 Agosto, Santa Fe - Santa Fe.

Peralta, G. H.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C. y Hynes, E. R. (2011). El perfil de aminotransferasas de *Lactobacillus paracasei* I90 define la bioformación de compuestos de aroma en queso. *Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas*. 28-30 Marzo, San Rafael - Mendoza.

Peralta, G. H.; Bergamini, C. V., Suárez, V. y Hynes, E. R. (2009). Actividades aminotransferasa y glutamato dehidrogenasa en cepas de lactobacilos aisladas de queso. *XII Congreso Argentino de Microbiología*. 13-16 Septiembre, Buenos Aires.

Bergamini, C. V.; Peralta, G. H. y Hynes, E. R. (2009). Ácidos orgánicos en queso de diferentes variedades por cromatografía líquida. *XVIII Congreso Argentino de Química* 13-16 Septiembre, Lanús, Buenos Aires.

Peralta, G. H.; Bergamini, C. V.; Wolf, I. V.; y Hynes, E. R. (2009). Producción de diacetilo y acetoína en quesos por metabolismo del aspartato. *XXVIII Congreso Argentino de Química*. 13-16 Septiembre, Lanús, Buenos Aires.

# Resumen

El catabolismo de aminoácidos (AA) por bacterias lácticas (BAL) genera gran cantidad de compuestos volátiles de importancia clave en el aroma de quesos, y se inicia mediante reacciones de transaminación catalizadas por aminotransferasas (AT). Para que estas reacciones se produzcan, es necesaria la presencia de un aceptor de grupo amino, generalmente  $\alpha$ -cetoglutarato, que se encuentra en baja concentración en el queso, por lo que ha sido identificado como el factor limitante en estas reacciones. La utilización de cultivos con alta actividad glutamato dehidrogenasa (GDH), enzima que cataliza la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del glutamato, se ha propuesto como una estrategia para aumentar la concentración de este compuesto y consecuentemente las reacciones de transaminación. Los niveles y la especificidad de las AT y GDH en las BAL aparecen entonces como rasgos fundamentales para la caracterización de los fermentos como productores de aroma.

En una primera etapa de la tesis, se estudiaron las actividades AT hacia ocho AA y la actividad GDH, en un elenco de BAL de origen comercial o autóctono, comúnmente usadas como fermentos primarios y adjuntos (Capítulo 1). Entre los cultivos caracterizados, las dos cepas de *S. thermophilus* presentaron los mayores niveles de actividad GDH, mientras que los lactobacilos mostraron niveles de actividad GDH menores y similares entre ellos. La mayoría de las cepas mostró especificidad de AT hacia el Asp, con actividades más elevadas hacia este aminoácido que hacia los demás ensayados. Por otro lado, en un estudio bioinformático realizado en esta primera etapa, se observó que para cepas de las mismas especies de los cultivos estudiados en esta tesis, también de interés en quesería, y cuyos genomas se hallan completamente secuenciados, los genes necesarios para formar compuestos de aroma a partir del catabolismo de los AA están presentes.

En este trabajo de tesis también se determinó la influencia de diferentes métodos de atenuación (etanol, dodecil sulfato de sodio - SDS, ultrasonido, calor, congelado, disruptor de perlas, mutanolisina), sobre la liberación de enzimas intracelulares y la viabilidad de dos cepas de *S. thermophilus* con alta actividad GDH, con vistas a aplicar estos métodos para una mayor producción de  $\alpha$ -cetoglutarato y de aroma en queso (Capítulo 2 y Capítulo 3). Se verificó que los tratamientos de atenuación tuvieron diferentes efectos, hallándose varios entre ellos capaces de influir sobre las envolturas celulares y contribuir a la permeabilización de las células. Los tratamientos de SDS y etanol fueron los que más afectaron la viabilidad. En cuanto al aumento de los marcadores de lisis o permeabilización (enzimas intracelulares

lactato dehidrogenasa y  $\beta$ -galactosidasa), los tratamientos con SDS y etanol resultaron ser eficientes como agentes permeabilizantes, mientras que la mutanolisina, ultrasonido y disrupción mecánica resultaron buenos métodos de lisis celular.

Una vez seleccionados los métodos de atenuación más apropiados, se aplicaron a una de las cepas de *S. thermophilus*, y este cultivo se utilizó en dos modelos de la matriz alimentaria real: queso cremoso miniatura y extracto de queso estéril (Capítulo 3). En ambos modelos, se determinó la influencia del cultivo atenuado sobre la producción de péptidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos de aroma, que mostraron pocas diferencias entre los tratamientos aplicados y el control sin atenuar. En general, los resultados dejaron en evidencia que la integridad celular de la cepa ensayada de *S. thermophilus* no es la principal causa de la baja producción de aroma por parte del fermento.

Finalmente, se determinó el efecto de dos cepas de lactobacilos mesófilos (*Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72) con diferente especificidad y perfil de ATs, sobre la fermentación de azúcares, la peptidólisis, el metabolismo de aminoácidos y la producción de compuestos de aroma en el modelo de extracto estéril. Asimismo, se indagó sobre la cooperación entre el fermento primario (*S. thermophilus* 2) sometido o no a diferentes tratamientos de atenuación, y *Lb. paracasei* 90 o *Lb. casei* 72 (Capítulo 4). En general, el perfil de compuestos volátiles en los extractos se correlacionó con la especificidad de las ATs de *Lb. paracasei* 90 o *Lb. casei* 72, lo que indica que los lactobacilos lideraron la formación de aroma en el modelo. La cepa *Lb. paracasei* 90, que mostró una mayor especificidad hacia el Asp, presentó mayores niveles de diacetilo y acetoína, compuestos que pueden derivar de este AA. Por su parte, la cepa *Lb. casei* 72, que presentó niveles similares de especificidad hacia los aminoácidos ramificados, aromáticos y Asp, se diferenció principalmente de los extractos sin inocular por un incremento de 3-metilbutanal, compuesto derivado de Leu. Sólo se observaron cambios mínimos debido a la inoculación conjunta de lactobacilos y estreptococos en algunos compuestos volátiles, que intensificaron la tendencia marcada por los lactobacilos. Estos resultados refuerzan la importancia de las BAL no fermento o de los cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos en el aroma y la calidad de quesos elaborados únicamente con *S. thermophilus*.

Los resultados del presente trabajo destacan la complejidad del proceso de formación de aroma en el queso y reafirman la necesidad de profundizar la investigación dirigida al diseño racional de fermentos lácticos.

# Índice de Contenidos

## *Introducción*

1. El queso como alimento y biorreactor.....	1
2. Microbiota del queso .....	2
2.1. Fermentos primarios.....	3
2.2. Bacterias lácticas no fermento y cultivos adjuntos, de afinado o maduración .....	5
3. Factores que influyen en el crecimiento de las bacterias en el queso .....	7
3.1. Actividad de agua.....	8
3.2. pH y ácidos orgánicos .....	9
3.3. Temperatura de maduración.....	9
3.4. Potencial redox.....	9
4. Transformaciones de los componentes del queso durante la maduración.....	10
4.1. Lactosa, galactosa y lactato .....	10
4.2. Citrato .....	11
4.3. Lípidos .....	13
4.4. Proteínas .....	14
4.5. Aminoácidos.....	16
5. Estrategias para aumentar el aroma en queso.....	22
5.1. Adición de sustancias específicas.....	23
5.1.1. Enzimas exógenas .....	23
5.1.2. Aminoácidos libres.....	23
5.1.3. $\alpha$ -cetoácidos.....	24
5.2. Selección de cultivos .....	25
5.2.1. En base a su perfil enzimático .....	25
5.2.2. En base a la capacidad autolítica.....	26
5.3. Atenuación de cultivos .....	26

## *Objetivos*

Objetivo general .....	31
Objetivos particulares.....	31



## *Capítulo 1:*

### *Enzimas clave para el metabolismo de aminoácidos en un elenco de bacterias lácticas seleccionadas*

1. Introducción .....		33
2. Materiales y Métodos .....		35
2.1. Cepas y condiciones de crecimiento.....		35
2.2. Curvas de crecimiento .....		36
2.3. Preparación de los extractos libres de células (ELC) .....		37
2.4. Determinación de la actividad Glutamato Dehidrogenasa (GDH).....		37
2.5. Determinación de la actividad Aminotransferasa (AT).....		39
2.6. Determinación de proteínas.....		42
2.7. Análisis bioinformático.....		42
2.8. Análisis estadístico .....		44
3. Resultados y Discusión .....		44
3.1. Eficiencia de la disrupción celular .....		44
3.2. Curvas de crecimiento .....		45
3.3. Actividad Glutamato Dehidrogenasa .....		49
3.4. Actividad Aminotransferasa .....		51
3.5. Análisis bioinformático .....		60
4. Conclusiones .....		67

## *Capítulo 2*

### *Comparación de métodos de lisis y permeabilización sobre dos cepas de Streptococcus thermophilus*

1. Introducción .....		69
2. Materiales y métodos .....		71
2.1. Diseño experimental.....		71
2.2. Cepas y condiciones de crecimiento.....		72
2.3. Preparación de las células.....		72
2.4. Métodos de atenuación.....		73
2.4.1. Mutanolisina.....		73
2.4.2. Dodecil sulfato de sodio (SDS).....		74
2.4.3. Etanol.....		74
2.4.4. Disruptor celular de perlas.....		74

2.4.5	Ultrasonido .....	75
2.4.6	Congelado.....	75
2.4.7	Calor .....	75
2.5	Determinación de la viabilidad.....	75
2.6	Observación microscópica .....	76
2.7	Determinación de la actividad lactato dehidrogenasa (LDH) .....	76
2.8	Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL).....	76
3.	Resultados .....	77
3.1	Estudios preliminares .....	77
3.2	Efecto del tratamiento en la viabilidad.....	78
3.3	Observación microscópica .....	80
3.4	Efecto del tratamiento de atenuación en las actividades LDH y $\beta$ -GAL.....	81
3.4.1	Etanol.....	81
3.4.2	SDS.....	82
3.4.3	Ultrasonido .....	83
3.4.4	Disruptor de perlas .....	83
3.4.5	Mutanolisina.....	84
3.4.6	Calor .....	85
3.4.7	Congelado.....	85
3.4.8	SDS + congelación y SDS + calor.....	86
3.4.9	Etanol + congelación y etanol + calor .....	87
4.	Discusión.....	88
5.	Conclusiones .....	95

### Capítulo 3

#### *Influencia de cultivos atenuados de *Streptococcus thermophilus* en la producción de compuestos de aroma en queso*

1.	Introducción .....	97
2.	Materiales y métodos .....	99
2.1	Diseño experimental.....	99
2.2	Cepas y condiciones de crecimiento.....	100
2.3	Atenuación de las células de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	101
2.4	Modelo de queso miniatura .....	101
2.5	Modelo de extracto estéril .....	103
2.6	Ensayos .....	106

2.6.1	Composición global y pH.....	106
2.6.2	Análisis microbiológicos.....	107
2.6.3	Proteólisis: determinación de nitrógeno en fracciones solubles del queso.....	108
2.6.4	Azúcares y ácidos orgánicos.....	109
2.6.5	Aminoácidos libres (AA).....	110
2.6.6	Compuestos volátiles.....	111
2.6.7	Determinación de las actividades enzimáticas lactato dehidrogenasa (LDH) y $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL).....	112
2.6.8	Análisis estadístico.....	112
3.	Resultados.....	113
3.1	Quesos cremosos miniatura.....	113
3.1.1	Composición global.....	113
3.1.2	Recuentos microbiológicos.....	113
3.1.3	Actividades enzimáticas (LDH y $\beta$ -GAL).....	114
3.1.4	Lactosa y galactosa.....	116
3.1.5	Nitrógeno soluble.....	119
3.1.6	Ácidos orgánicos.....	120
3.1.7	Aminoácidos libres (AA).....	123
3.1.8	Compuestos volátiles.....	128
3.2	Extractos de queso.....	132
3.2.1	Viabilidad y pH.....	132
3.2.2	Lactosa y galactosa.....	132
3.2.3	Ácidos orgánicos.....	133
3.2.4	Aminoácidos libres (AA).....	136
3.2.5	Compuestos volátiles.....	140
4.	Discusión.....	143
5.	Conclusiones.....	153

## *Capítulo 4*

### *Influencia de lactobacilos mesófilos en la producción de compuestos de aroma y cooperación con fermentos lácticos primarios*

1.	Introducción.....	156
2.	Materiales y métodos.....	158
2.1.	Diseño experimental.....	158

2.2. Cepas y condiciones de crecimiento.....	158
2.3. Preparación, inoculación e incubación de los extractos de quesos.....	159
2.4. Análisis durante la incubación.....	159
2.5. Análisis estadístico .....	160
3. Resultados .....	160
3.1. Recuentos microbiológicos .....	160
3.2. Determinación de pH.....	161
3.3. Lactosa y galactosa.....	162
3.4. Ácidos orgánicos .....	165
3.5. Aminoácidos libres (AA) .....	171
3.6. Compuestos volátiles.....	177
4. Discusión.....	184
5. Conclusiones .....	198
<i>Conclusiones finales</i> .....	200
<i>Referencias</i> .....	203

# Índice de Figuras

## Introducción

- Figura 1.** Metabolismo del citrato en bacterias lácticas. Las reacciones enzimáticas están indicadas por las flechas continuas, y las reacciones químicas están indicadas por flechas punteadas. Adaptado de Hutkins, 2001. .... 12
- Figura 2.** Vías de degradación de los triglicéridos durante la maduración de los quesos. .... 14
- Figura 3.** Degradación del paracaseinato de calcio durante la maduración del queso. .... 15
- Figura 4.** Catabolismo de los aminoácidos vía reacción de transaminación. Adaptado de Tanous y col. (2002). .... 19
- Figura 5.** Modelo teórico de la hipótesis planteada acerca de la influencia del tratamiento de permeabilización (A) y lisis (B) en la accesibilidad en las enzimas intracelulares (●) a sus respectivos sustratos extracelulares (▼). .... 28

## Capítulo 1

- Figura 1.1.** Curva de calibrado del ácido glutámico para la determinación de las aminotransferasas. 40
- Figura 1.2.** Curva de calibrado de proteínas por el método de Bradford. .... 42
- Figura 1.3.** Porcentaje de lisis celular al utilizar el molino de perlas. Relación perlas (g) / células (mL) (0,3, 0,7 y 1,2). 3 ciclos (■) y 5 ciclos (■). .... 45
- Figura 1.4.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus plantarum*: 33, 91, 89, 29 y 87. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación. .... 47
- Figura 1.5.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus casei*: 81, 72 y BL23 y *Lactobacillus paracasei* 90. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación. .... 47
- Figura 1.6.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus rhamnosus*: 73, 77, 78 y 75. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación. .... 48
- Figura 1.7.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus fermentum*: 28 y 46. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación. .... 48
- Figura 1.8.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Streptococcus thermophilus*: 1 y 2. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación. .... 49
- Figura 1.9.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus helveticus*: 133, 138, 209 y 3. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación. .... 49
- Figura 1.10.** Actividad GDH en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios  $\pm$  desviación estándar de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas. .... 50

**Figura 1.11.** Análisis de componentes principales de los niveles de actividad AT hacia ocho aminoácidos. A.- Gráfico de loading para CP1 vs. CP2. B- Gráfico de scores para CP1 vs. CP2. Las elipses encierran las muestras agrupadas de acuerdo al análisis de cluster jerárquico. Referencias: (●) *Lb. casei*, (■) *Lb. fermentum*, (×) *Lb. helveticus*, (▲) *Lb. paracasei*, (+) *Lb. plantarum*, (●) *Lb. rhamnosus*, (◆) *S. thermophilus*. ..... 54

**Figura 1.12.** Actividad Aspartato Aminotransferasa (AspAT) en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios ( $\pm$  desviación estándar) de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas. .... 54

**Figura 1.13.** Actividad Aminotransferasa hacia los aminoácidos ramificados (Leu, Ile, Val), aromáticos (Tyr, Trp y Phe) y Met en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas. Referencias: actividad AT hacia Leu (■), Ile (■), Val (■), Tyr (■), Trp (■), Phe (■) y Met (■). ..... 55

**Figura 1.14.** La figura representa los genes hallados mediante búsqueda bioinformática en las especies de: *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *S. thermophilus* (A), *Lb. fermentum* (B) y *Lb. helveticus* (C). Las flechas verdes ( $\rightarrow$ ) indican que se encontró al menos un gen de la enzima correspondiente en alguna de las cepas dentro de la especie. Las flechas rojas ( $\rightarrow$ ) indican que no se halló el gen correspondiente a la enzima en ninguna de las cepas dentro de la especie estudiada. .... 61

## Capítulo 2

**Figura 2.1.** Disminución de la viabilidad de una cepa comercial de *S. thermophilus* (St1) después de someterla a cuatro tratamientos de atenuación. Los resultados se expresan en log UFC mL<sup>-1</sup>. El recuento inicial fue alrededor de 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y el recuento después del tratamiento se indica por la punta de la flecha. .... 78

**Figura 2.2.** Disminución de la viabilidad de dos cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus*: St1 y St2, sometidas a distintos tratamientos de atenuación. El recuento inicial fue alrededor de 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y el recuento después del tratamiento se indica por la punta de la flecha. .... 80

**Figura 2.3.** Las imágenes son fotos tomadas en un microscopio óptico antes (A) y después (B) del tratamiento de disrupción celular. .... 81

**Figura 2.4.** Las imágenes son fotos tomadas en un microscopio óptico antes (A) y después (B) del tratamiento de ultrasonido. .... 81

**Figura 2.5.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación de etanol 40 % a 37 °C durante 30 min. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 82

**Figura 2.6.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación en SDS 0,1 % a 37 °C durante 30 min. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 82

**Figura 2.7.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación con ondas de ultrasonido a 10 °C durante 1 hora. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 83

- Figura 2.8.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de disrupción en un disruptor celular de perlas a 5 °C durante 3 minutos. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 84
- Figura 2.9.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación con mutanolisina 100 y 200 U a 37 °C durante 22 h. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 84
- Figura 2.10.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación de calentamiento a 63 °C durante 20 s. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 85
- Figura 2.11.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación por congelamiento a -80 C° durante 48 horas. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 85
- Figura 2.12.** Actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación en SDS 0,1 % a 37 °C durante 30 min sumado a un tratamiento posterior de calor (A) o congelado (B). Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 86
- Figura 2.13.** Actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación con etanol 40 % a 37 °C durante 30 min sumado a un tratamiento posterior de calor (A) o congelado (B). Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas. .... 87
- Figura 2.14.** Gráfico comparativo del efecto producido por los tratamientos estudiados en las actividades LDH y  $\beta$ -GAL. Los valores corresponden a las diferencias entre las muestras tratadas y sus respectivos controles. En el caso en el que la diferencia de las actividades respecto del control haya sido menor que cero, se le asignó el mínimo valor de la tabla (cero). .... 88

### Capítulo 3

- Figura 3.1.** Quesos Cremoso miniatura elaborados en condiciones microbiológicas controladas, inmediatamente después de la elaboración. Los gráficos A y B corresponden a una de las tres réplicas de la primera y segunda experiencia, respectivamente. .... 103
- Figura 3.2.** Hormas de quesos Cremoso elaborados en la planta piloto del INLAIN, inmediatamente después de la elaboración. .... 104
- Figura 3.3.** Mezcla de queso y agua (1+1) después de ser sometida a un proceso de homogeneización y posterior centrifugación. Fase superior, inferior, e intermedia corresponden a la grasa, proteínas y fase acuosa, respectivamente. .... 105
- Figura 3.4.** Recuentos de *S. thermophilus* 2 en queso Cremoso miniatura a 3, 15, 30 y 60 días de maduración. A- Primera experiencia: C (—▲—), EM (—▲—), y EA (—▲—). B- Segunda experiencia: C (—▲—), EU (—▲—), ED (—▲—) y ES (—▲—). .... 114

- Figura 3.5.** Actividades enzimáticas indicadoras en los quesos miniatura de la primera experiencia a los 3, 30 y 60 días de maduración. **A-** Actividad LDH; **B-** Actividad  $\beta$ -GAL. Referencias: C (—▲—), EM (—▲—), y EA (—▲—). ..... 115
- Figura 3.6.** Actividades enzimáticas indicadoras en los quesos miniatura de la segunda experiencia a 3, 30 y 60 días de maduración. **A-** Actividad LDH, **B-** Actividad  $\beta$ -GAL. Referencias: C (—▲—), EU (—▲—), ED (—▲—) y ES (—▲—). ..... 116
- Figura 3.7.** Concentración de lactosa (**A**) y galactosa (**B**) en los quesos miniatura de la primera experiencia a 3 y 60 días de maduración. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (■), EM (■), EA (■). ..... 117
- Figura 3.8.** Concentración de lactosa (**A**) y galactosa (**B**) en los quesos miniatura de la segunda experiencia a 3 y 60 días de maduración. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (■), EU (■), ED (■) y ES (■). ..... 119
- Figura 3.9.** Evolución del contenido de nitrógeno en las distintas fracciones solubles (NS-pH 4,6, NS-TCA, NS-PTA), expresado como proporción (%) del nitrógeno total (NT), durante la maduración de los quesos de la primera experiencia. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (■), EM (■), EA (■). ..... 120
- Figura 3.10.** Análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos y azúcares a 3 días de elaboración en la primera (**A**) y la segunda experiencia (**B**). ..... 123
- Figura 3.11.** Aminoácidos totales en los quesos miniatura a 3, 30 y 60 días de maduración, de la primera experiencia (**A**): C (■), EM (■), EA (■), y de la segunda experiencia (**B**): C (■), EU (■), ED (■) y ES (■). Los valores corresponden al promedio y desviación estándar de las replicas de elaboración de los quesos miniatura. .... 124
- Figura 3.12.** Aminoácidos libres en los quesos miniatura de la primera experiencia a 3 (**A**), 30 (**B**) y 60 (**C**) días de maduración. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (—▲—), EM (—▲—), y EA (—▲—). ..... 126
- Figura 3.13.** Aminoácidos libres en los quesos miniatura de la segunda experiencia a 3 (**A**), 30 (**B**) y 60 (**C**) días de maduración. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (—▲—), EU (—▲—), ED (—▲—) y ES (—▲—). ..... 127
- Figura 3.14.** Concentración de lactosa (**A**) y galactosa (**B**) en los extractos de quesos Cremoso incubados durante 14 días. Referencias: extracto sin inocular (■), extracto inoculado con *S. thermophilus* viable (■), *S. thermophilus* tratado con ultrasonido (■), o tratado con alcohol (■).. 133
- Figura 3.15.** Variación de la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato (**A**) y ácido pirúvico (**B**) en los extractos inoculados en relación al extracto sin inocular. Referencias: extracto inoculado con *S. thermophilus* viable (■), *S. thermophilus* tratado con ultrasonido (■), o tratado con alcohol (■).. 135
- Figura 3.16.** Análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos, lactosa y galactosa determinados en los extractos de queso. Gráfico de loading (**A**) y gráfico de scores (**B**). Referencias: (○) 3 días y (○) 14 días de incubación. .... 136
- Figura 3.17.** Niveles de AA totales en los extractos de queso cremoso a 3 y 14 días de incubación. Referencias: extracto sin inocular (■), extracto inoculado con *S. thermophilus* viable (■), *S. thermophilus* tratado con ultrasonido (■), o tratado con alcohol (■). ..... 137



<b>Figura 3.18.</b> Aminoácidos libres en los extractos de queso a 14 días de incubación. Referencias: extracto sin inocular (▧), extracto inoculado con <i>S. thermophilus</i> viable (▨), <i>S. thermophilus</i> tratado con ultrasonido (▩), o tratado con alcohol (▪).....	138
<b>Figura 3.19.</b> Perfil de los AA en los extractos de queso Cremoso sin inocular (▧) e inoculado con las células de <i>S. thermophilus</i> viable (▨).....	139
<b>Figura 3.20.</b> Gráfico de loading (A) y scores (B) del análisis de componentes principales de los AA presentes en los extractos de queso a 14 días de incubación.....	139
<b>Figura 3.21.</b> Gráficos de loading (A) y scores (B) del análisis de componentes principales de los compuestos volátiles que derivan de los aminoácidos a 14 días de incubación. Variables: v <sub>1</sub> acetaldehído, v <sub>4</sub> 3-metilbutanal, v <sub>5</sub> etanol, v <sub>6</sub> diacetilo, v <sub>10</sub> acetato de isoamilo, v <sub>14</sub> acetoina, v <sub>16</sub> acético, v <sub>18</sub> benzaldehído, v <sub>20</sub> 1,2-propanodiol, v <sub>21</sub> butírico, v <sub>24</sub> 4-OH-benzaldehído, v <sub>26</sub> alcohol bencílico, v <sub>27</sub> benzotiazol, v <sub>28</sub> fenol.....	143

## Capítulo 4

<b>Figura 4.1.</b> Concentración de lactosa en los extractos inoculados con <i>Lb. paracasei</i> 90 (A) y <i>Lb. casei</i> 72 (B) a 3 y 14 días de incubación. Diferentes letras en la parte superior de cada barra para cada tiempo de incubación indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).....	163
<b>Figura 4.2.</b> Concentración de galactosa en los extractos inoculados con <i>Lb. paracasei</i> 90 (A) y <i>Lb. casei</i> 72 (B) a 3 y 14 días de incubación. Diferentes letras en la parte superior de cada barra para cada tiempo de incubación indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).....	164
<b>Figura 4.3.</b> Variación de la concentración de $\alpha$ -cetoglutarato (A) y ácido pirúvico (B) en los extractos inoculados en relación al control sin inocular a 3 y 14 días de incubación. Referencias: extractos inoculados con <i>Lb. paracasei</i> 90 (▣) y extractos inoculados con <i>Lb. casei</i> 72 (▤).....	168
<b>Figura 4.4.</b> Gráficos de loading y scores para CP1 vs. CP2 (A), CP1 vs. CP3 (B) del análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos y azúcares presentes en los extractos de queso a los 14 días de incubación. Referencias: Control (●), <i>Lb. paracasei</i> 90 (●), <i>Lb. casei</i> 72 (●).....	171
<b>Figura 4.5.</b> Niveles de AA totales en los extractos de ambas experiencias a 3 y 14 días de incubación: control (▧), extractos de la experiencia 1, inoculados con <i>Lb. paracasei</i> 90 (▨) y extractos de la experiencia 2, inoculados con <i>Lb. casei</i> 72 (▩). Diferentes letras en la parte superior de cada barra para cada experiencia indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).....	172
<b>Figura 4.6.</b> Concentración de AA individuales en los extractos de queso de la primera experiencia a 14 días de incubación con niveles $< 3$ mg / 100 mL (A) y $> 3$ mg / 100 mL (B). Los valores representan el promedio y desviación estándar de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio.....	173
<b>Figura 4.7.</b> Concentración de AA individuales en los extractos de queso de la primera experiencia a 14 días de incubación con niveles $< 7$ mg / 100 mL (A) y $> 7$ mg / 100 mL (B). Los valores representan el promedio y desviación estándar de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio.....	174
<b>Figura 4.8.</b> Perfil de AA en los extractos control (▧) y testigo inoculados únicamente con las cepas individuales de <i>Lactobacillus paracasei</i> 90 (▨) y <i>Lb. casei</i> 72 (▩).....	176
<b>Figura 4.9.</b> Gráfico de loading (A) scores (B) del análisis de componentes principales de los AA presentes en los extractos de queso a los 14 días de incubación. Referencias: Control (●), extractos de	

la experiencia 1, inoculados con *Lb. paracasei* 90 (●), extractos de la experiencia 2, inoculados con *Lb. casei* 72 (●)..... 177

**Figura 4.10.** Área de los compuestos volátiles: diacetilo (A), acetoína (B) y 3-metilbutanal (C) en los extractos control (■) e inoculados con *Lb. paracasei* 90 (■) a 3 y 14 días de incubación. Los valores representan las áreas promedio de los compuestos volátiles afectados por un factor de  $10^{-3}$ . ..... 180

**Figura 4.11.** Área relativa de los compuestos volátiles: diacetilo (A), acetoína (B) y 3-metilbutanal (C) en los extractos control (■) e inoculados con *Lb. casei* 72 (■) a 3 y 14 días de incubación. Los valores representan las áreas promedio de los compuestos volátiles afectados por un factor de  $10^{-3}$ . 181

**Figura 4.12.** Posibles vías metabólicas del ácido pirúvico en bacterias lácticas, relacionada con la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato. Adaptado de: Liu, 2003; Tanous y col., 2005..... 187

# Índice de tablas

## *Introducción*

<b>Tabla 1.</b> Compuestos de aroma derivados de los aminoácidos y notas aromáticas asociadas a los mismos. ....	17
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## *Capítulo 1*

<b>Tabla 1.1.</b> Cepas de lactobacilos y estreptococos estudiadas en el presente capítulo. ....	36
<b>Tabla 1.2.</b> Procedimiento para la determinación de la actividad glutamato dehidrogenasa. ....	38
<b>Tabla 1.3.</b> Procedimiento para la determinación de la actividad aminotransferasa: primera reacción. ....	40
<b>Tabla 1.4.</b> Procedimiento para la determinación de la actividad aminotransferasa: segunda reacción. ....	41
<b>Tabla 1.5.</b> Cepas de bacterias lácticas utilizadas en la búsqueda bioinformática. ....	43
<b>Tabla 1.6.</b> Densidad óptica y recuentos en el medio de cultivo al momento de la cosecha y en el buffer de resuspensión antes y luego de la disrupción, y porcentaje de disrupción obtenido. ....	46
<b>Tabla 1.7.</b> Actividad Aminotransferasa en los ELC de las cepas estudiadas hacia ocho aminoácidos. Los valores son los promedios de dos réplicas - duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas. La desviación estándar se presenta entre paréntesis. ....	53
<b>Tabla 1.8.</b> Actividad Aminotransferasa endógena en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas, y la desviación estándar (en gris). ....	56
<b>Tabla 1.9.</b> Número de genes que codifican las enzimas involucradas en la ruta de transaminación del catabolismo de aminoácidos en los genomas de bacterias lácticas disponibles en la base de datos del NCBI. ....	66

## *Capítulo 2*

<b>Tabla 2.1.</b> Tratamientos de atenuación aplicados e índices de permeabilización sobre dos cepas comerciales de <i>Streptococcus thermophilus</i> (St1 y St2). ....	72
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## *Capítulo 3*

<b>Tabla 3.1.</b> Diseño experimental. ....	100
<b>Tabla 3.2.</b> Gradiente de elución para la separación de los aminoácidos derivatizados. ....	111
<b>Tabla 3.3.</b> Composición global de los quesos Cremoso miniatura. ....	113

<b>Tabla 3.4.</b> Ácidos orgánicos (mg / 100 g) en los quesos miniatura de las dos experiencias a 3 y 60 días de maduración.....	122
<b>Tabla 3.5.</b> Compuestos volátiles identificados en los quesos miniatura de la primer experiencia. ...	130
<b>Tabla 3.6.</b> Compuestos volátiles identificados en los quesos miniatura de la segunda experiencia..	131
<b>Tabla 3.7.</b> Descenso de pH durante la incubación de los extractos de queso control y experimentales. .....	132
<b>Tabla 3.8.</b> Ácidos orgánicos en los extractos de queso (mg / mL). .....	135
<b>Tabla 3.9.</b> Compuestos compuestos volátiles en los extractos de queso a 3 y 14 días de incubación. .....	142

## **Capítulo 4**

<b>Tabla 4.1.</b> Diseño experimental.....	158
<b>Tabla 4.2.</b> Recuentos microbiológicos de <i>Lb. paracasei</i> 90 y <i>Lb. casei</i> 72 en los extractos durante la incubación, expresados en UFC mL <sup>-1</sup> . .....	161
<b>Tabla 4.3.</b> Valores de pH de los extractos durante la incubación.....	162
<b>Tabla 4.4.</b> Ácidos orgánicos (mg / 100 mL) en los extractos de quesos correspondientes a la experiencia 1. ....	169
<b>Tabla 4.5.</b> Ácidos orgánicos (mg / 100 mL) en los extractos de quesos correspondientes a la experiencia 2. ....	169
<b>Tabla 4.6.</b> Compuestos volátiles identificados en los extractos de queso control e inoculados con <i>Lb. paracasei</i> 90. ....	182
<b>Tabla 4.7.</b> Compuestos volátiles identificados en los extractos de queso control e inoculados con <i>Lb. casei</i> 72.....	183

# Abreviaturas

## *Generales*

**AA:** Aminoácidos.

**ANOVA:** Análisis de la varianza.

**FID:** Detector de ionización de llama.

**GC:** Cromatógrafo Gaseoso/Cromatografía Gaseosa.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.

**BAL:** Bacterias lácticas.

**MS:** Espectrómetro de masas/Espectrometría de masas.

**n.d:** No detectado.

**NSLAB:** Bacterias lácticas no pertenecientes al fermento primario.

**NS-pH 4,6:** Nitrógeno soluble a pH 4,6.

**NS-TCA:** Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético.

**NS-PTA:** Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico.

**NT:** Nitrógeno total.

**APC:** Análisis por componentes principales.

**CP:** Componentes principales.

**SPME:** Microextracción en fase sólida.

**UFC:** Unidad formadora de colonias.

**BAL GDH (+):** Bacterias lácticas con actividad glutamato dehidrogenasa.

**BAL citrato (+):** Bacterias lácticas con capacidad de metabolizar el citrato.

**NAD(P)<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) oxidado.

**NAD(P)H:** Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido.

## *Específicas del Capítulo 1*

**AT:** Aminotransferasa.

**BcAT:** Aminotransferasa específica de aminoácidos ramificados.

**ArAT:** Aminotransferasa específica de aminoácidos aromáticos.

**AspAT:** Aminotransferasa específica del ácido aspártico.

**GDH:** Glutamato dehidrogenasa.

**KdcA:**  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa.

**AlcDH:** Alcohol dehidrogenasa.

**AldDH:** Aldehído dehidrogenasa.

**KaDH:** Complejo  $\alpha$ -cetoácido dehidrogenasa.

**PTA:** Fosfato butiltransferasa.

**Ack:** Fosfotransferasa con un grupo carboxilo como aceptor.

**D-HicDH:** D-hidroxiácido dehidrogenasa.

**EstA:** Esterasa.

### *Específicas del Capítulo 2*

**LDH:** Lactato dehidrogenasa.

**$\beta$ -GAL:**  $\beta$ -galactosidasa.

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio.

**CA:** Células acondicionadas para los tratamientos de atenuación.

**U:** Unidad Internacional.

**ONPG:** orto-nitrofenilgalactopiranosido.

**ONP:** orto-nitrofenil.

### *Específicas del Capítulo 3*

**EA:** Queso elaborado con fermento sin atenuar + fermento atenuado con alcohol.

**EM:** Queso elaborado con fermento sin atenuar + fermento atenuado con mutanolisina.

**ES:** Queso elaborado con fermento sin atenuar + fermento atenuado con SDS.

**EU:** Queso elaborado con fermento sin atenuar + fermento atenuado con ultrasonido.

**ED:** Queso elaborado con fermento sin atenuar + fermento atenuado con disruptor de perlas.

**Sta:** Extracto de queso inoculado con células atenuadas con alcohol.

**Stu:** Extracto de queso inoculado con células atenuadas con ultrasonido.

### ***Específicas del Capítulo 4***

**90:** extracto de queso inoculado con *Lb. paracasei* 90.

**St+90:** extracto de queso inoculado con *Lb. paracasei* 90 + un cultivo comercial de *S. thermophilus* sin atenuar.

**Stu+90:** extracto de queso inoculado con *Lb. paracasei* 90 + un cultivo comercial de *S. thermophilus* atenuado con ondas de ultrasonido.

**Sta+90:** extracto de queso inoculado con *Lb. paracasei* 90 + un cultivo comercial de *S. thermophilus* atenuado con alcohol.

**72:** extracto de queso inoculado con *Lb. casei* 72.

**St+72:** extracto de queso inoculado con *Lb. casei* 72 + un cultivo comercial de *S. thermophilus* sin atenuar.

**Stu+72:** extracto de queso inoculado con *Lb. casei* 72 + un cultivo comercial de *S. thermophilus* atenuado con ondas de ultrasonido.

**Sta+72:** extracto de queso inoculado con *Lb. casei* 72 + un cultivo comercial de *S. thermophilus* atenuado con alcohol.

### ***Nomenclatura de aminoácidos***

**Ala:** alanina.

**Arg:** arginina.

**Asp:** ácido aspártico.

**Cys:** cisteína.

**Glu:** ácido glutámico.

**Gly:** glicina.

**His:** histidina.

**Ile:** isoleucina.

**Leu:** leucina.

**Lis:** lisina.

**Orn:** ornitina

**Met:** metionina.

**Phe:** fenilalanina.

**Pro:** prolina.

**Ser:** serina.

**Thr:** treonina.

**Tyr:** tirosina.

**Val:** valina.

**Trp:** triptofano



# *Introducción*

## **1. El queso como alimento y biorreactor**

La denominación queso se utiliza de manera genérica para un grupo de productos fermentados a base de leche, cuyo proceso de obtención se fundamenta en la deshidratación, y que se producen en todo el mundo en una gran cantidad de tipos y variedades (Fox y McSweeney, 2004). El queso, junto con el pan y el vino, forma parte de un conjunto de alimentos fermentados milenarios que acompañan a la humanidad desde muy temprano: los primeros elementos de arcilla para desuerar cuajadas datan del período conocido como la revolución agrícola neolítica, unos 9.000 años atrás.

Los primeros quesos nacieron en torno al mediterráneo y eran de leche de oveja y cabra, las primeras hembras lecheras domesticadas (Nantet, 1994). En la actualidad, existen más de 1.000 variedades de queso en todo el mundo (Beresford y col., 2001; Fox y McSweeney, 2004). Al principio, el descubrimiento de que el alimento deshidratado y fermentado duraba más que la leche llevó a repetir la tecnología de obtención de quesos para conservar los sólidos de la leche por un período más largo. Con el correr de los años, este producto adquirió una importancia fundamental en la dieta occidental, en la que aporta significativamente calcio y proteínas, y en la cultura gastronómica y la alta cocina, por sus cualidades sensoriales y nutritivas (Fox y McSweeney, 2004).

La legislación argentina define como queso al producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, sólo o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes. A su vez hace una diferencia entre el Queso Fresco, que está listo para el consumo poco después de su fabricación, y el Queso Madurado, que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso (Código Alimentario Argentino, ANMAT, 2013).

Según las últimas estadísticas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MGAP), alrededor del 50 % de producción de leche en la Argentina es destinada a la actividad quesera, y el resto se divide en leche fluida, leche en polvo, yogur, etc. Los quesos típicamente comercializados en la Argentina son: quesos de pasta blanda (Cuartirolo, Petit Suisse, Mozzarella, Brie, Saint Paulin), quesos de pasta semidura (Gruyere, Emmenthal, Fontina, Pategrás, Holanda, Cheddar, Danbo, Tybo) y quesos de pasta dura (Parmesano, Goya,

Romano, Sardo, Provolone, Rallado), de los cuales, los de pasta blanda son los que tienen un mercado más amplio.

En los últimos 20 años, Argentina se ha encontrado siempre en el “top 15” de países productores de queso, lugar que comparte con economías desarrolladas como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Irlanda, Alemania, Italia y Francia (Sørensen, 2005; FAO, 2013). En el período desde 1995 hasta el año 2000, la producción de quesos en América del Sur aumentó hasta llegar a un punto máximo de 975.000 toneladas, para luego comenzar a disminuir hasta el año 2003. Este descenso fue especialmente causado por Argentina, debido a la crisis de principio de los 2000 (Sørensen, 2005). Sin embargo, en los últimos años la producción de queso se ha ido incrementando; como lo permiten ver los números de toneladas publicados para los años 2007, 2009 y 2012, que fueron de 233.010, 243.409 y 563.943, respectivamente (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, MGAyP).

El queso puede considerarse como un biorreactor ya que se trata de un sustrato sólido, en el cual existe una biomasa activa, y también enzimas de diverso origen (Corrieu y Luquet, 2007), y se verifica una transformación continua del sustrato, desde la elaboración del queso hasta su consumo (McSweeney, 2004; Leclercq-Perlat y col., 2006; Picque y col., 2010; Preedy y col., 2013).

## **2. Microbiota del queso**

Los microorganismos son un componente esencial de todas las variedades de quesos naturales<sup>1</sup> y tienen un rol muy importante durante la elaboración y maduración. Al tratarse de un alimento fermentado, los microorganismos agregados a la leche para elaborar el queso, es decir, las BAL del fermento primario, tienen el objetivo tecnológico principal de conducir dicha fermentación, y de producir la acidificación a partir de la lactosa. Además de estas BAL agregadas *ex profeso* como fermento iniciador, en el queso aparece una segunda población de BAL, de origen adventicio, no pertenecientes al fermento o denominada NSLAB por sus siglas en inglés (non starter acid bacteria).

Además de las BAL, la microbiota del queso puede conformarse con otros géneros bacterianos, hongos y levaduras. En determinadas variedades de queso, como los madurados con hongos, los que sufren fermentación propiónica o los que poseen flora superficial, la acción de la flora secundaria otorga las características propias y particulares de la variedad.

---

<sup>1</sup> “Quesos naturales” es un término que permite diferenciar estos alimentos de los quesos fundidos, procesados, sustitutos de queso y otros que sufren fuertes tratamientos térmicos.

## 2.1. Fermentos primarios

Como ya se mencionó, la función principal del cultivo iniciador es un rol tecnológico, que tiene lugar durante la fabricación del queso y consiste en iniciar y conducir la fermentación láctica. Sin embargo, los fermentos primarios también contribuyen durante la maduración del queso, a través de la proteólisis y la formación de aroma vía la conversión de aminoácidos (Roudot-Algaron e Yvon, 1998; McSweeney y Sousa, 2000; McSweeney, 2004; Yvon y Rijinen, 2001; Ardö, 2006; Martínez-Cuesta y col., 2013). Asimismo, el fermento primario favorece la protección del alimento contra microorganismos alterantes o patógenos (Deegan y col., 2006; Dalié y col., 2010; Molloy y col., 2011).

En todo el mundo, los fermentos compuestos por diferentes variedades y cepas de la especie *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) son los más ampliamente utilizados en la elaboración de quesos, y esta es la razón de que esta especie sea la más estudiada y conocida entre todas las BAL (Monnet y col., 1994; Gao y col., 1997; Yvon y col., 1997; Gummalla y Broadbent, 1999; Tammam y col., 2000; Amárita y col., 2001a; Atilés y col., 2000; Yvon y Rinjnen, 2001; Kieronczyk y col., 2003; Sheehan y col., 2006; Gómez de Cadiñanos y col., 2013). No solamente los rasgos genéticos y fisiológicos de numerosas cepas de *Lactococcus lactis* son conocidos, sino también sus características tecnológicas. En una gran cantidad de trabajos se ha estudiado su sistema proteolítico directamente en aplicaciones en quesos, y actualmente se conoce que su contribución a este conjunto de reacciones durante la maduración aparece fundamentalmente sobre el pool de péptidos de tamaño mediano o pequeño generados por la acción previa de las enzimas microbianas, el coagulante y la plasmina sobre las caseínas intactas, aunque algún rol de las enzimas proteasas sobre péptidos de mayor tamaño también es esperado (Fox, 1989; Law y col., 1993; Farkye y col., 1995; Lynch, 1997; Joutsjoki y col., 2002; Upadhyay y col., 2004).

*Streptococcus thermophilus* es considerada mundialmente como la segunda especie de BAL, luego de *L. lactis*, más importante en la industria de los fermentos (Hols y col., 2005). En Argentina, donde *L. lactis* no se utiliza, salvo excepcionalmente y para aportar aroma, *S. thermophilus* es el fermento más usado, y se aplica en la producción de una gran variedad de quesos blandos y semiduros: Cremoso, Cuartirolo, Port Salut, Holanda, Fontina, Colonia, Edam, Barra y Pategrás (Reinheimer y col., 1997; Zalazar y col., 1999). También se utiliza como fermento - ya sean fermentos naturales o seleccionados - en muchos quesos italianos como Provolone, Pecorino, Montasio, Asiago, Caciocavallo, Crescenza, Caciotta, Mozzarella, entre otros, y en los quesos Gruyere y Emmenthal elaborados con cultivos naturales (Stiles y Holzapfel, 1997; Kandarakis y Moschopoulou, 1998; Giraffa y col., 2000; Quiberoni y col.,

## Introducción

---

2000; Fornasari y col., 2006; Hammes y Hertel, 2006), donde aparece en general acompañado por lactobacilos termófilos. En queso Cheddar, la incorporación de pequeñas proporciones de *S. thermophilus* a los fermentos de *L. lactis* es una práctica innovadora dirigida a acelerar la acidificación (Michel y Martley, 2001; Champagne y col., 2009).

El conocimiento sobre la especie es más reciente que el existente para *L. lactis*, y aunque se han realizado importantes avances, el cúmulo de conocimientos generado es comparativamente menor (Deutsch y col, 2000; 2002; Chaves y col., 2002; van den Bogaard, 2002; Helinck y col., 2004). La única especie de *Streptococcus* que se utiliza en fermentaciones lácticas es *S. thermophilus*, que es genéticamente similar al estreptococo de la cavidad oral (*S. salivarius*), pero se considera una especie aparte. Además *S. thermophilus* se diferencia de otros estreptococos (y lactococos) por su resistencia al calor, habilidad de crecer a 52 °C, habilidad de fermentar sólo un limitado número de azúcares: la mitad galactosa de la lactosa, por ejemplo, no es metabolizada por la inmensa mayoría de las cepas de *S. thermophilus* (Axelsson, 2004). El sistema proteolítico de *S. thermophilus* está constituido por un gran número de enzimas proteolíticas, y aunque no se encuentre totalmente caracterizado, y en parte es inferido de *Lactococcus lactis*, varias endopeptidasas de *S. thermophilus* han sido descritas (PepC, PepN, PepO, PepS y PepX). Una de las características del sistema proteolítico de *S. thermophilus*, es que la proteasa de pared (PrtS), enzima encargada de la hidrólisis primaria de la caseína, sólo se encuentra en algunas cepas (Shahbal y col., 1993; Hols y col., 2005; Dandoy y col., 2011). Se considera que *S. thermophilus* es una especie de baja actividad proteolítica, que alberga muchas cepas que no crecen bien solas en leche (Courtin y col., 2002; Vaningelgem y col., 2004a,b; Hols y col., 2005; Dandoy y col., 2011).

Por último, otra especie ampliamente utilizada como fermento iniciador en quesería es *Lactobacillus helveticus*. Se trata de un lactobacilo termófilo homofermentativo, con una temperatura óptima de crecimiento entre 42 y 45 °C. Se utiliza comúnmente en la producción de quesos duros de pasta cocida: en Argentina, especialmente Reggianito y Sardo, y en Italia, en Grana Padano y Parmigiano Reggiano, entre otros. También forma parte de los fermentos de queso tipo suizo: Gruyere, Emmenthal, Comté. *Lb. helveticus* puede ser inoculado como fermento seleccionado, ya que existen cepas disponibles comercialmente, o en fermentos naturales de suero, donde predomina (Stiles y Holzapfel, 1997; Giraffa y col., 2000; Klein, 2001; Depouilly y col., 2004; Gatti y col., 2004). El uso de *Lb. helveticus* en quesos de tipo híbrido basados en la tecnología Cheddar, se ha popularizado hacia fin del siglo XX en Irlanda y Estados Unidos (Kiernan y col., 2000; Morgan y col., 2002; Hannon y col., 2003, 2007; Hickey y col., 2006, 2007; Slattery y col., 2010).

A diferencia de *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* se considera una especie de elevada actividad proteolítica. La mayoría de las cepas producen una importante proteólisis en proteínas lácteas *in vitro* y en alimentos, y se ha atribuido esta característica a que existen numerosas cepas que lisan tempranamente durante la maduración, liberando las peptidasas activas a la masa del queso (Valence y col., 2000; Chen y col., 2003; Deutsch y col., 2002; Slattery y col., 2010; Griffiths y Tellez, 2013).

## **2.2. Bacterias lácticas no fermento y cultivos adjuntos, de afinado o maduración**

Se considera que el complejo no fermento o NSLAB está formado por lactobacilos mesófilos, pediococos, enterococos y leuconostoc (Beresford, 2003). Los lactobacilos mesófilos incluyen tanto especies heterofermentantes facultativas (por ejemplo *Lb. casei* y *Lb. plantarum*) como heterofermentantes obligatorias (por ejemplo *Lb. fermentum* y *Lb. brevis*) (Crow y col., 1995). Las NSLAB crecen espontáneamente durante la maduración y por lo tanto, son componentes habituales de la microflora de los quesos, pudiendo provenir de la leche de elaboración, de ingredientes usados en la elaboración de los mismos o del ambiente de la quesería (Settanni y Moschetti, 2010). Los lactobacilos pueden ser clasificados en tres grupos teniendo en cuenta su capacidad fermentante: Grupo I (homofermentantes obligatorios), Grupo II (heterofermentantes facultativos) y Grupo III (heterofermentantes obligatorios). El Grupo I se compone de lactobacilos que normalmente forman parte de la flora del fermento primario (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp.) (Beresford, 2003), mientras que las especies de los Grupos II y III se encuentran entre las que componen la flora NSLAB. Los lactobacilos heterofermentantes facultativos del Grupo II, en general, son los más frecuentemente hallados como bacterias no fermento en quesos, mientras que los miembros del Grupo III, en particular *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*, también aparecen aunque con menor frecuencia. Muchas especies de lactobacilos mesófilos han sido aisladas de queso, pero las más frecuentemente encontradas son *Lb. casei* / *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. curvatus* (Cogan y Beresford, 2002; Bude Ugarte y col., 2006).

Otra componente de la flora NSLAB está representada por los enterococos de importancia en quesos artesanales producidos en el sur de Europa a partir de leche cruda o pasteurizada y son parte de la microflora habitual (Giraffa, 2003). En Argentina, *Leuconostoc* sp. cobran importancia como NSLAB ya que aparecen frecuentemente en forma adventicia en quesos blandos y semiduros, alcanzando elevados recuentos hacia la semana 4 (Quiberoni y col., 2005).

## Introducción

---

Respecto al rol de las NSLAB durante la maduración, han sido señaladas como las responsables de ciertos defectos en quesos, entre ellos, la formación no deseada de ojos. Sin embargo, su presencia también se ha vinculado a la tipicidad del producto y a una mayor complejidad en el flavour de quesos elaborados con leche cruda. Por estas razones se ha trabajado en el desarrollo de fermentos adjuntos o de afinado, constituidos generalmente por lactobacilos mesófilos de origen no fermento, aislados de quesos de buena calidad y cuyas propiedades bioquímicas y tecnológicas hayan sido adecuadamente caracterizadas (Crow y col., 2001; Beresford, 2003; Franciosi y col., 2008; Johnston y col., 2010). De los fermentos adjuntos se espera que prosperen en el queso evitando la proliferación de NSLAB adventicias y potencialmente perjudiciales, que no produzcan ningún defecto y que, en lo posible, también aporten positivamente al flavour y la calidad del producto final (Broadbent y col., 2011).

Numerosos fermentos adjuntos de BAL de origen NSLAB, especialmente *Lb. casei/paracasei* y *Lb. plantarum*, se han estudiado y caracterizado en quesos, en general haciendo foco sobre su capacidad para prosperar, predominar y mantenerse viables en el alimento, y en sus habilidades proteolíticas y peptidolíticas. Los estudios microbiológicos comprenden tanto métodos dependientes como independientes de cultivo (Hynes y col., 2002, 2003; Bude Ugarte y col., 2006; Briggiler-Marcó y col., 2007; Milesi y col., 2010; Desfossés-Foucault y col., 2012). A modo de ejemplo, se puntualizan algunos trabajos a continuación.

Khalid y Marth (1990) estudiaron la actividad proteolítica de diez cepas de *Lactobacillus* (siete *Lb. plantarum*, dos *Lb. casei* y una de *Lb. casei* ssp. *pseudopantarum*) en leche descremada estéril incubada a 37 °C. De los resultados que obtuvieron se destaca la mayor capacidad de las cepas de *Lb. plantarum* respecto a las otras especies para hidrolizar  $\beta$ -caseína e hidrolizar parcialmente la  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-caseína, mientras que las dos cepas de *Lb. casei* no hidrolizaron la  $\beta$ -caseína en el tiempo de incubación. Lynch y col. (1996) estudiaron la influencia de un fermento adjunto de lactobacilos en la proteólisis y desarrollo de aroma en queso Cheddar bajo condiciones microbiológicas controladas. Elaboraron quesos controles que contenían solamente lactococos y quesos experimentales que contenían lactobacilos (*Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. curvatus*) como adjunto. La adición de *Lactobacillus* sp. influyó positivamente en la aceptabilidad de los quesos después de 6 meses de maduración a 7 °C. Los quesos experimentales mostraron un incremento de la población del fermento adjunto de 10<sup>4</sup> a 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> en las primeras 4 semanas, y alcanzaron mayores niveles de aminoácidos libres. Un año después, Williams y Banks (1997) estudiaron numerosas cepas de

*Lactobacillus paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. pentosus*, entre otros, para determinar sus actividades hidrolíticas. La mayoría de las cepas mostró una actividad proteolítica débil sobre el caseinato. Esta baja actividad se evidencia en el pobre crecimiento y acidificación que las NSLAB muestran en la leche. Hynes y col. (2003) evaluaron la contribución de seis cepas de lactobacilos a la maduración de la cuajada de queso (Saint-Paulin), en combinación con dos cepas de *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *cremoris* AM2 y *L. lactis* subsp. *lactis* IL416). Observaron que el impacto de los lactobacilos en el flavour fue diferente según el cultivo primario utilizado. Asimismo, verificaron que de las seis cepas de *Lactobacillus*, cuatro de ellas (*Lb. casei* 1227 y 1219, y *Lb. plantarum* 1572 y 1310) incrementaron fuertemente los aminoácidos libres totales cuando se agregaron junto a la cepa de *L. lactis* AM2 pero solo *Lb. plantarum* 1310 incrementó cuando se agregó con *L. lactis* IL416. Bergamini y col. (2006) estudiaron la influencia de dos cepas de *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus* y *Lb. paracasei*) en la proteólisis de un queso semiduro Argentino. En los quesos inoculados con los lactobacilos como adjuntos, observaron un aumento de la producción de péptidos cortos y aminoácidos libres, siendo mayor la influencia de *Lb. acidophilus*. Milesi y col. (2010) estudiaron la contribución de dos cepas de *Lactobacillus* spp. (*Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90) utilizadas como cultivo adjunto en la elaboración y maduración de quesos Cremoso. En los quesos inoculados con los lactobacilos, observaron un incremento de los aminoácidos y cambios en el perfil de ácidos orgánicos, mostrando diferencias entre las cepas. También reportaron un incremento de la producción de acetoína y diacetilo por parte de los lactobacilos.

Algunos de los estudios sobre la componente NSLAB de la microbiota de quesos abordan su posible rol probiótico, ya que varias cepas de *Lb. casei*, *paracasei* y *rhamnosus* aisladas de quesos han demostrado potencial probiótico (Bertazzoni Minelli y col., 2004, Bude Ugarte y col., 2006; Burns y col., 2012).

### **3. Factores que influyen en el crecimiento de las bacterias en el queso**

Las condiciones ambientales que rigen en el alimento tienen influencia sobre la actividad de las enzimas y microorganismos presentes. Muchas de las transformaciones bioquímicas sobre componentes de la leche, que se verifican en condiciones óptimas durante la experimentación, luego no se validan en modelos experimentales o en matrices alimentarias reales, debido entre otras causas a las condiciones ambientales. A continuación se introduce brevemente algunas consideraciones sobre estos efectos.



### 3.1. Actividad de agua

Todos los microorganismos necesitan del agua para su crecimiento, pero no es la cantidad, sino es la disponibilidad del agua el factor más importante (Cogan, 2011).

Acorde a Scott (1953) la actividad de agua es un concepto termodinámico definido como la relación entre la presión de vapor en un sistema ( $p$ ) y la presión del agua pura ( $p_o$ ) a igual temperatura:  $a_w = P / P_o$  (Fennema, 1996). Los valores de  $a_w$  varían de 0 a 1, y representan una medida indirecta del agua disponible para llevar a cabo las diferentes reacciones químicas o para el desarrollo de los microorganismos. La humedad del queso, y más precisamente la concentración de sal en la humedad, son magnitudes que se miden habitualmente, y que se relacionan con la actividad de agua en el alimento.

En el queso, la  $a_w$  desciende del valor 1, que es equivalente al de la leche, la cuajada recién obtenida y el suero, a valores menores a medida que se va perdiendo humedad y va ingresando sal como consecuencia de la operación de salado.

Durante la primera etapa de la maduración del queso, la  $a_w$  es aproximadamente 0,99, lo que favorece el crecimiento y la actividad del cultivo iniciador. Después del drenaje del suero de leche y la inmersión en salmuera, y durante la maduración, la  $a_w$  alcanza valores entre 0,917-0,988 según la variedad. Estos son significativamente más bajos que los requerimientos óptimos de los cultivos y están en el origen de grandes cambios en el metabolismo y crecimiento de las bacterias. Las actividades de agua mínima para *L. lactis*, *S. thermophilus* y *Lb. helveticus* son 0,93 - 0,98 - 0,96, respectivamente (Beresford, 2001). Durante la maduración continúa la disminución de la  $a_w$  debido a la pérdida de agua por evaporación, la hidrólisis de las proteínas a péptidos y aminoácidos y de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres. La hidrólisis de cada enlace peptídico o éster requiere una molécula de agua.

Como se mencionó en el apartado anterior, el contenido de sal en la humedad del queso está fuertemente relacionado con la  $a_w$ , ya que un aumento de sal produce una disminución de la actividad de agua, y por ende influye en el metabolismo y crecimiento de los microorganismos. El contenido de sal en la humedad en las diferentes variedades de queso se encuentra en un amplio rango que va entre 0,7 % y 6 %: Emmenthal (0,7 %), Cheddar (1,5 %), Camembert (2,5 %), Provolone (3 %), Roquefort (3 %), Blue (4,5 %), Pecorino Romano (5,5 %), Domiati (6 %) (Guinee y Fox, 2004). Por otro lado, se ha demostrado influencia de la concentración de sal en algunas de las enzimas más importantes en la formación de aroma en el queso (Curtin y col., 2001; Williams y col., 2002; De Angelis y col., 2010a).

### **3.2. pH y ácidos orgánicos**

El pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de las especies bacterianas se encuentra cercano a la neutralidad y el crecimiento frecuentemente es inhibido a valores de pH menores a 5. Debido a la acumulación de ácidos orgánicos, esto es, ácido láctico, la cuajada de queso después de la fabricación alcanza un pH que oscila entre 4,5 y 5,3. La forma no disociada del ácido láctico y otros ácidos orgánicos de cadena corta es fuertemente inhibidora del crecimiento de microorganismos (Beresford y col., 2001). Se han postulado diversas teorías para explicar estos efectos: i) toxicidad derivada de la disipación del potencial de membrana, ii) la acidificación del citosol, o iii) la acumulación de anión intracelular (Pieterse y col., 2005). Por esta razón, los valores de  $pK_a$  de los ácidos láctico, acético y propiónico cobran importancia al considerar el crecimiento de los microorganismos, siendo sus valores de 3,08, 4,75 y 4,87, respectivamente (Cogan, 2011).

Las actividades enzimáticas que intervienen en el metabolismo de los AA, son muy influenciadas por los cambios de pH. Además, esta influencia es variable entre las diversas enzimas microbianas. Curtin y col. (2001) observaron que el pH óptimo de las actividades cistiotina liasa y metionina liasa en cepas de BAL (*Lactobacillus* y *Lactococcus*) fue de 7,5 y 8 respectivamente. Por otro lado, Williams y col. (2002) informaron que las actividades aminotransferasas en lisados de dos de cepas *Lb. paracasei* fue máxima a un pH alrededor de 6 a 30 °C. Asimismo, se ha informado que el rango de pH óptimo de actividad de aminotransferasas de *Lactococcus* es entre 6,5 y 8 (Yvon y col., 1997; Yvon y col., 2000).

### **3.3. Temperatura de maduración**

Los microorganismos involucrados en la fabricación de queso son mesófilos o termófilos, con temperaturas óptimas de 30 °C o 42 °C, respectivamente. La temperatura de maduración del queso, que habitualmente se halla entre 5 y 15 °C, es un compromiso entre la necesidad de promover las reacciones de maduración, y controlar el crecimiento de la flora secundaria deseable y la propagación de bacterias alterantes y patógenas. Las temperaturas superiores promueven la maduración acelerada pero también producen cambios en la textura y sabor que son a menudo perjudiciales (Folkertsma y col., 1996).

### **3.4. Potencial redox**

La oxidación es la pérdida de electrones, mientras que la reducción es un sinónimo de ganancia de electrones. La pérdida o ganancia de electrones puede o no incluir la transferencia

de oxígeno o hidrógeno. El potencial de oxidación-reducción (redox) se expresa en voltios y es designado como  $E_h$  (Bhandari y Singh, 2011). A diferencia del pH, que es una medida de la concentración de iones hidrógeno libres en un sistema, el potencial redox es una medida de la actividad de los electrones en un sistema (Olsen y Pérez-Díaz, 2009).

El potencial redox se mide en relación al potencial del electrodo de hidrógeno estándar, al que se asigna un valor de 0 V a pH 0. A 25 °C, la transferencia de un electrón, define al  $E_h$  como:

$$E_h = E_o + 0,059 \log \frac{[Ox]}{[Red]}$$

La capacidad redox del sistema queda determinada por la cantidad total de reactivos oxidados y reducidos.  $E_o$  es un índice del potencial del sistema relativo a otros sistemas. Cuando el valor de  $E_h$  es cercano a  $E_o$ , el sistema exhibe una resistencia al cambio del potencial, similar a lo ocurrido en un sistema buffer ácido-base (Bhandari y Singh, 2011).

El  $E_h$  de la leche recién ordeñada es cercano a cero, luego por disolución de oxígeno aumenta levemente hasta aproximadamente +150 mV (Cogan y Beresford, 2002), mientras que en el queso el potencial es negativo, llegando en general a -250 mV. Aunque el mecanismo exacto de la reducción del  $E_h$  en el queso no está completamente esclarecido, lo más probable es que esté relacionado con la fermentación de la lactosa y producción de ácido láctico por el cultivo iniciador durante el crecimiento y la reducción de pequeñas cantidades de  $O_2$  disuelto en la leche (Crow y col., 1995; Ouvry y col., 2002; Hutkins y col., 2006; Brasca y col., 2007). Como consecuencia de estas reacciones, el interior del queso es esencialmente un sistema anaeróbico, que sólo puede apoyar el crecimiento de microorganismos anaerobios obligados o facultativos. Los aerobios obligados, tales como *Pseudomonas*, *Brevibacterium* y *Bacillus* no se desarrollan en el interior del queso (Cogan y Beresford, 2002).

#### **4. Transformaciones de los componentes del queso durante la maduración.**

##### **4.1. Lactosa, galactosa y lactato**

La lactosa es el principal carbohidrato de la leche de todos los mamíferos, y su concentración varía de una especie a otra. En la leche de vaca, el contenido de lactosa es de ~ 4,7 %, lo que la convierte en el sólido lácteo en mayor proporción, además de ser el que muestra mayor estabilidad, con menores variaciones que la materia grasa y las proteínas (Stelwagen, 2011).

Durante la elaboración del queso, la mayor parte de la lactosa se elimina junto con el suero, restando en la cuajada únicamente la que se encuentra disuelta en la fase acuosa de la misma. Desde la elaboración y en el primer período de maduración de los quesos, el fermento iniciador metaboliza la lactosa produciendo ácido láctico. Como consecuencia de la acidificación y la sinéresis, la concentración de lactosa que queda disponible en el queso luego de los primeros días de maduración es muy baja. Sin embargo, estas pequeñas cantidades residuales de lactosa pueden tener una influencia significativa en fenómenos clave de la maduración, como post acidificación o formación de compuestos volátiles, que sí tienen gran importancia en la calidad del queso. Por esta razón, el correcto desarrollo de la fermentación láctica es un aspecto crucial de la elaboración de quesos (McSweeney y Fox, 2004; McSweeney, 2011).

La mitad glucosa de la lactosa es metabolizada por todas las BAL que componen los fermentos y las de origen adventicio, y no llega a acumularse en los productos lácteos fermentados. En cambio, el metabolismo de la mitad galactosa de la lactosa no puede generalizarse a todas las BAL. La mayoría de las cepas de *S. thermophilus* son incapaces de fermentar la galactosa, de manera que este azúcar se acumula en el queso, lo que puede tener un gran impacto en la calidad final (Hols y col., 2005; St-Gelais y col., 2009; Høier y col., 2010). En la producción de la mayoría de los quesos suizos, *S. thermophilus* se combina con cepas de lactobacilos capaces de fermentar la galactosa, tales como *Lb. helveticus*, que convierte la galactosa a ácido láctico y contribuye a la formación de compuestos de sabor específicos (Høier y col., 2010; Anbukkarasi y col., 2013).

El lactato proveniente de la fermentación puede sufrir una serie de transformaciones durante la maduración. Las BAL del fermento producen, en general, L-lactato, que puede ser isomerizado a D-lactato, reacción que se atribuye la mayor parte de las veces a las NSLAB. En los quesos que contienen bacterias propiónicas u hongos, el lactato es un importante sustrato que determina la calidad y características específicas de los productos (McSweeney, 2004).

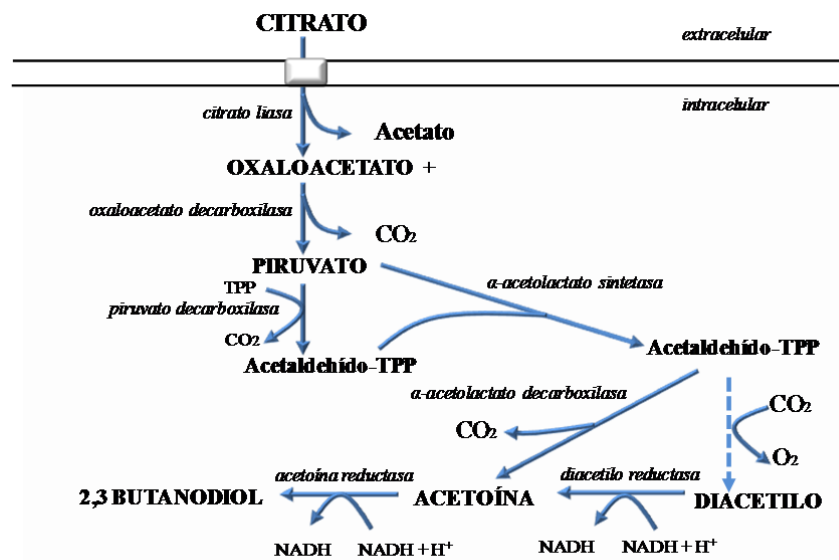
#### **4.2. Citrato**

La concentración de citrato en la leche es relativamente baja (~ 8 mM), y sumado a que la mayor parte del mismo se pierde en el suero durante la elaboración del queso, podría llegar a interpretarse que no tiene gran influencia en la maduración del mismo. Sin embargo, esta baja concentración de citrato retenida en la fase acuosa del queso es de gran importancia para el desarrollo del flavour, dado que el citrato puede ser metabolizado por las bacterias citrato

positivas generando compuestos volátiles que suman al flavour del queso (Fox y col., 2000). Los principales compuestos del metabolismo del citrato se hallan representados en la **Figura 1**.

La acetoína y diacetilo provenientes del metabolismo del citrato son compuestos sumamente importantes en el aroma de muchos quesos (Dacremont y Vickers, 1994; Christensen y Reineccius, 1995; Quintans y col., 2008; McSweeney, 2011). La fermentación del citrato con producción de CO<sub>2</sub>, es responsable del desarrollo de pequeños ojos típicos de las variedades de queso tipo “Holanda”.

El catabolismo del citrato por las BAL, se considera generalmente como una vía metabólica secundaria para la generación de energía y se produce en co-fermentación con la lactosa (Hugenholtz, 1993; Marty-Teysset y col., 1996; Bandell y col., 1998; Quintans y col., 2008). Se verifica en aquellas cepas de BAL que poseen los genes que codifican para el transporte y metabolismo de citrato. Entre las bacterias utilizadas en la industria láctea, *Leuconostoc* spp. y cepas seleccionadas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* se aplican cuando se busca formación de aroma y/o CO<sub>2</sub> a partir de citrato.



**Figura 1.** Metabolismo del citrato en bacterias lácticas. Las reacciones enzimáticas están indicadas por las flechas continuas, y las reacciones químicas están indicadas por flechas punteadas. Adaptado de Hutkins, 2001.

### 4.3. Lípidos

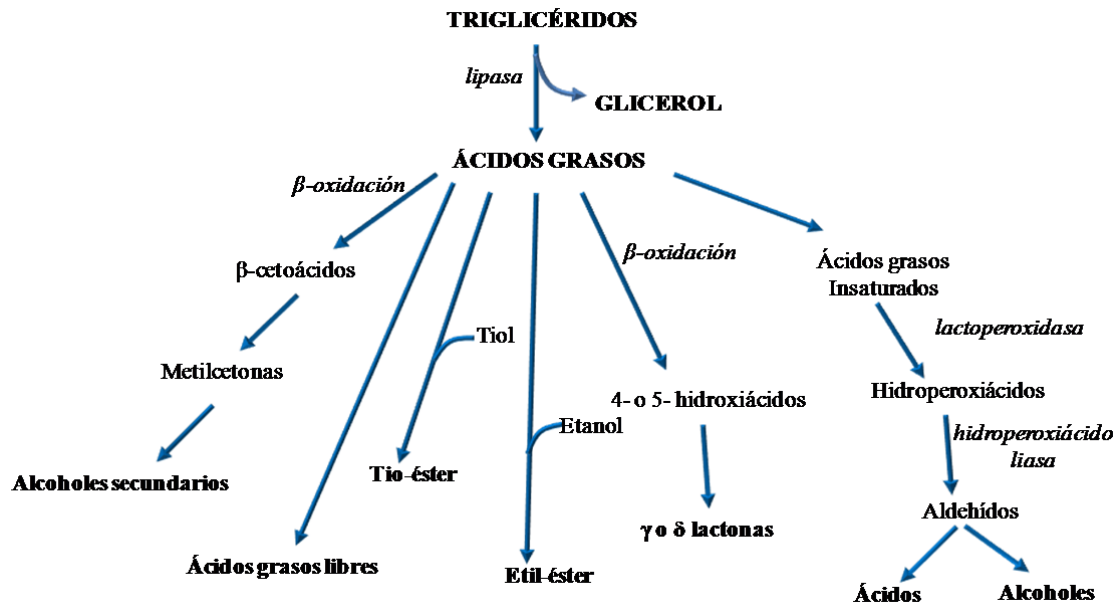
La lipólisis es un conjunto de reacciones enzimáticas que involucra la hidrólisis de los triglicéridos para dar ácidos grasos libres (AGL), algunos de los cuales pueden impactar directamente en el flavour, pero además son precursores de otros compuestos de aroma y sabor, tales como metilcetonas, alcoholes, y lactonas (McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2003; McSweeney, 2011).

Los microorganismos utilizan los AGL después de la hidrólisis del enlace éster que llevan a cabo las enzimas denominadas lipasas. En el queso, la lipólisis inicial puede deberse a la acción de la enzima nativa lipoproteína lipasa, o a lipasas microbianas. Las BAL poseen una débil, aunque cuantificable actividad hidrolítica sobre los triglicéridos, que se evidencia especialmente en quesos de larga maduración (McSweeney, 2011). Hickey y col. (2006) estudiaron la contribución de dos cepas de cultivos iniciadores (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 303 y *Lactobacillus helveticus* DPC4571) a la lipólisis en queso Cheddar. De los resultados concluyeron que las esterases del cultivo iniciador son las primeras enzimas que contribuyen a la lipólisis en el queso Cheddar elaborado con leche pasteurizada de buena calidad. Además observaron que la contribución de las NSLAB hacia la lipólisis era mínima.

En quesos duros de pasta cocida tipo italianos, como lo es el Parmesano, se han informado niveles de ácidos grasos libres intermedios entre los altos valores en quesos azules y los bajos niveles en quesos blandos (de la Fuente y col., 1993). Perotti y col. (2005) estudiaron la lipólisis en quesos Reggianito fabricados con leche pasteurizada y comprobaron que la lipólisis se acentuaba con el tiempo de maduración, hecho que atribuyeron a las BAL del fermento natural de suero. Los valores de lipólisis en quesos madurados internamente por BAL son bajos o moderados. Por el contrario, la lipólisis es un fenómeno muy acentuado en quesos madurados con hongos o que han sido elaborados con preparados de coagulantes que contienen lipasas además de la enzima proteasa coagulante (McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2003b; Collins y col., 2004).

A pesar de que los avances tecnológicos en el control de la lipólisis en el queso se basan en los hongos y / o sus lipasas, Holland y col. (2005) sugieren que las BAL también pueden aportar ésteres a quesos duros, a través de la síntesis. También se ha evidenciado una relación entre autólisis de las BAL con lipólisis, ya que se ha comprobado que el uso de cepas autolíticas incrementan el grado de la lipólisis (Collins y col., 2003a).

En la **Figura 2**, se pueden observar las principales familias de compuestos derivados de los triglicéridos.

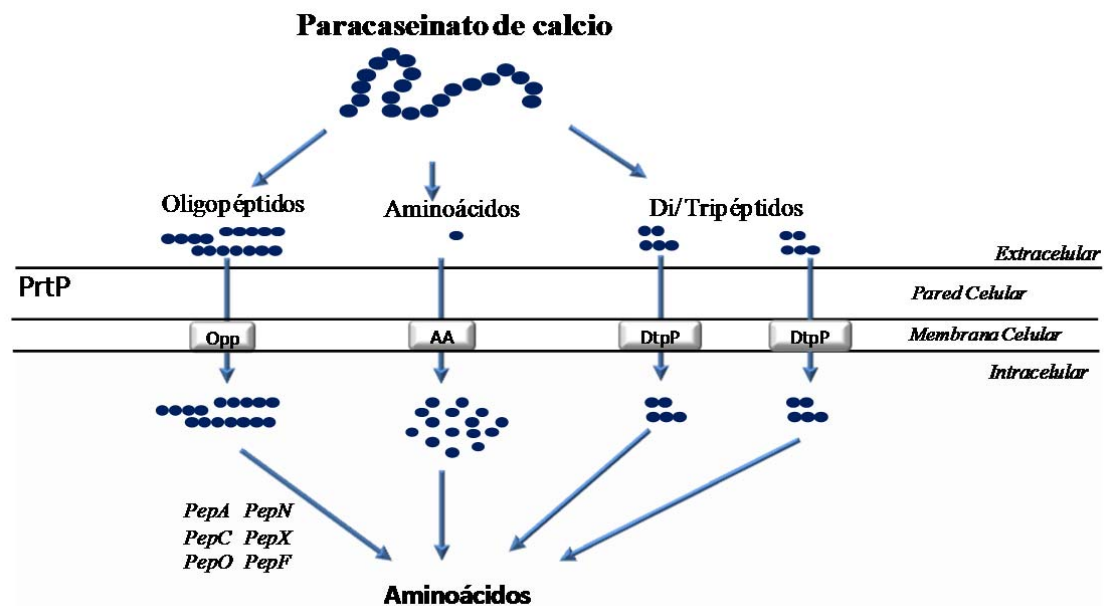


**Figura 2.** Vías de degradación de los triglicéridos durante la maduración de los quesos. Adaptado de Collins y col., 2004; Zalazar y col 2007.

#### 4.4. Proteínas

La proteólisis y peptidólisis tienen un impacto directo en la calidad del queso, ya que modifican sus propiedades estructurales y el sabor de fondo. Además, las reacciones involucradas proveen los aminoácidos y oligopéptidos que son precursores de compuestos de aroma (McSweeney, 2011). Como ya se mencionó, en el queso, el coagulante residual y la plasmina nativa de la leche generalmente inician la proteólisis sobre las caseínas intactas, y los péptidos medianos y pequeños son atacados por las enzimas de las BAL. Profundizando los conceptos anteriores sobre el sistema proteolítico de las BAL, se destaca que especialmente el de *Lactococcus*, está muy bien caracterizado a nivel fisiológico, bioquímico y genético. El sistema consiste en: i) una serina proteasa asociada a la membrana celular, que sobresale a través de la pared celular permitiendo el acceso a sustratos extracelulares ii) varios sistemas de transporte de péptidos, iii) varios sistemas de transporte de aminoácidos, iv) proteasas intracelulares, v) y una batería de peptidasas intracelulares incluyendo oligopeptidasas (PepO<sub>1</sub>, PepO<sub>2</sub>, PepF<sub>1</sub>, PepF<sub>2</sub>), que hidrolizan los péptidos grandes, de hasta al menos 30 residuos de aminoácidos, pero no las caseínas, varias aminopeptidasas (PepN, PepA, PepC, PepL), pirrolidona carboxilato peptidasa, una iminopeptidasa (PepP), una dipeptidil aminopeptidasa (PepX), tri - (PepT) y di - peptidasas dipeptidasas (PepV, PepD) generales, y específicas de la prolina (prolidasa y prolinasa, PepQ y PepR, respectivamente) (McSweeney, 2011). Por otro lado, aunque la maquinaria proteolítica de *Streptococcus*

*thermophilus* y los diversos lactobacilos termófilos y mesófilos que se emplean en fermentos para la industria láctea han sido menos caracterizados, se sabe que comparten muchos rasgos comunes con *Lactococcus lactis* en sus componentes y modos de acción en términos de conversión de caseínas en péptidos y aminoácidos libres (Desmazeaud, 1983, Rul y Monnet 1997; Christensen y col., 1999; Fernandez-Espla y Rul, 1999; Fernandez-Espla y col., 2000; Garault y col., 2002; Savijoki y col., 2006). La degradación de las caseínas juega un papel importante en el desarrollo de textura del queso y también influye en el sabor, ya que algunos péptidos pequeños y aminoácidos contribuyen al sabor de fondo, mientras que aportan flavour indirectamente como precursores de compuestos de aroma (McSweeney y Sousa, 2000; McSweeney, 2011). Ciertas peptidasas pueden contribuir favorablemente a la formación de sabor por la producción de notas de fondo como “caldo” o “umami” y mediante la degradación de péptidos amargos, mientras que otras pueden producir péptidos que causan notas indeseables de sabor amargo. La **Figura 3** muestra las principales vías por las cuales las BAL intervienen en la degradación de las proteínas. Debe recordarse que en el queso, a lo largo de la maduración, no solamente se encuentran las caseínas intactas sino también un pool de péptidos de diverso tamaño proveniente de la proteólisis causada por las enzimas no microbianas coagulante residual y plasmina (Zalazar y col., 2007; Ismail y Nielsen, 2011; McSweeney, 2011).



**Figura 3.** Degradación del paracaseinato de calcio durante la maduración del queso.



#### **4.5. Aminoácidos**

Los aminoácidos y algunos pequeños péptidos contribuyen al sabor de fondo del queso por sus propios gustos (algunos aminoácidos tienen sabor dulce, ácido o amargo). El contenido de aminoácidos en queso en general se incrementa por la actividad de las peptidasas de las BAL. Sin embargo, se conoce que el aumento de los aminoácidos libres por sobreexpresión de peptidasas, lisis del fermento, o incluso el agregado exógeno de aminoácidos libres, no mejora las características del flavour del queso (McGarry y col., 1994; Christensen y col., 1995; Wallace y Fox, 1997). Por otro lado, el perfil de los compuestos volátiles formados durante la maduración, no siempre se correlaciona con el perfil de los aminoácidos inicial (McSweeney y Sousa, 2000). Todo ello refuerza la idea de que la disponibilidad de AAL no es el paso limitante en la formación de aroma.

En efecto, el aporte de los aminoácidos al flavour, se debe principalmente a su carácter de precursores de una amplia gama de compuestos aromáticos derivados de su catabolismo, incluyendo compuestos tales como aldehídos, alcoholes, ácidos carboxílicos, amoníaco, y compuestos azufrados (McSweeney, 2011). Algunos de los productos más importantes de la degradación de los aminoácidos y sus notas de aroma asociadas se detallan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Compuestos de aroma derivados de los aminoácidos y notas aromáticas asociadas a los mismos.

Aminoácido	Metabolito	Aroma
Leucina	3-metilbutanal (isovaleraldehído)	malta, queso
	3-metilbutanol	malta, alcohol, frutal
	ácido 3-metilbutanoico (isovalerato)	dulce, queso fuerte, pútrido
Isoleucina	2-metilbutanal	malta, queso, chocolate
	2-metilbutanol	malta, alcohol
	ácido 2-metilbutanoico	dulce, queso fuerte, pútrido
Valina	2-metilpropanal (isobutanal)	malta, queso
	2-metilpropanol	malta, alcohol
	ácido 2-metilpropanoico (isobutirato)	dulce, rancio, ácido
Fenilalanina	fenilacetaldehído	floral, rosa
	feniletanol	floral, rosa
	ácido fenilacético	floral, miel
	benzaldehído	almendra amarga, dulce
	ácido feniletilacético	floral, pasto
Tirosina	ácido hidroxifenilacético	nd
	p-cresol	medicinal
	fenol	medicinal
Triptofano	3-metil indol (escatol)	naftalina
	indol	pútrido, mohoso
Metionina	3-metiltiopropional (metional)	patata cocida, azufre
	3-metiltiopropionol (metionol)	patata
	ácido 3-metiltiopropiónico	chocolate, tostado
	metanotiol	repollo cocido, ajo, cebolla, azufre
	dimetildisulfuro (DMDS)	ajo, pútrido, repollo
	dimetiltrisulfuro (DMTS)	ajo, pútrido, repollo
	dimetilsulfido	repollo, ajo, azufre
metiltioacetato	ajo	
Ácido aspártico	2,3-butanodiona (diacetilo)	manteca, nuez
	3-hidroxi-2-butanona (acetoína)	manteca, leche ácida
	ácido acético	vinagre, agrio, ácido
Treonina	acetaldehído	yogurt, pasto
	etanol	alcohol
	ácido acético	vinagre, agrio, ácido

Fuente: Singh y col., 2003; Ardö, 2006; Surburg y Panten, 2006; Yvon, 2006; Bockelmann, 2010; Jelen, 2011; Martínez-Cuesta y col., 2011.

nd: no descrito en las fuentes consultadas.

El catabolismo de los aminoácidos por BAL presentes en el queso, ha sido revisado ampliamente (Smit y col., 2005; Ardö, 2006; Yvon, 2006; Fernández y Zúñiga, 2006). La principal vía de degradación de los aminoácidos es la transaminación (**Figura 4**), reacción catalizada por enzimas denominadas aminotransferasas o transaminasas dependientes de

## Introducción

---

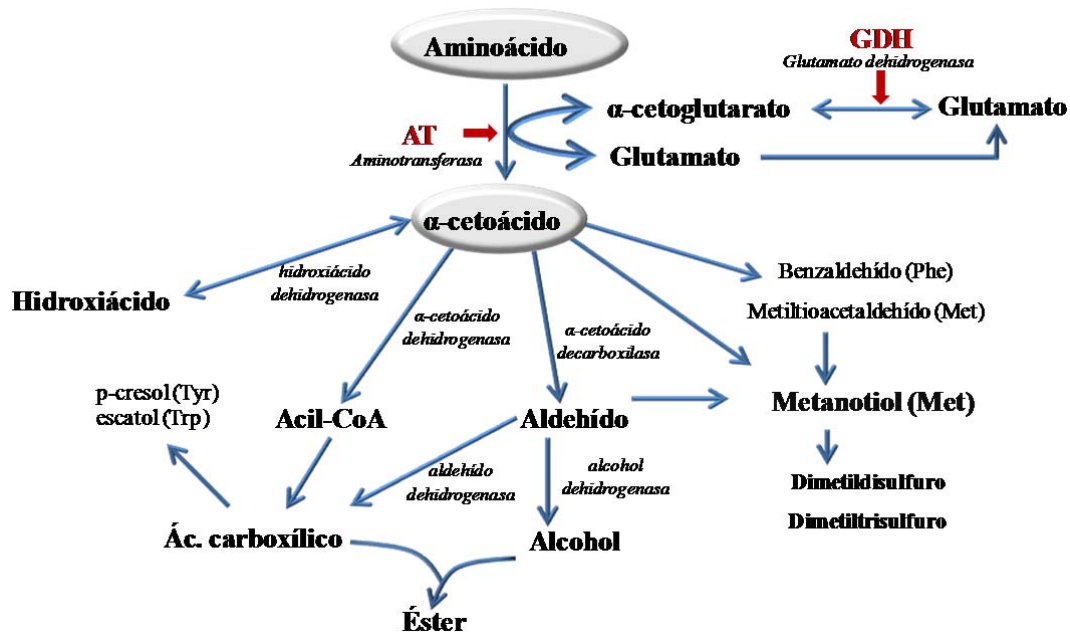
piridoxal-5-fosfato (Ardö, 2006; Yvon, 2006). Estas enzimas catalizan la transferencia de los grupos aminos de los aminoácidos hacia  $\alpha$ -cetoácidos, tales como  $\alpha$ -cetoglutarato, oxaloacetato o piruvato (Amárta y col., 2001; Casey y col., 2004; Ardö, 2006). Las aminotransferasas, por ser las enzimas que inician el catabolismo de los aminoácidos, son consideradas enzimas claves para dicha degradación y por lo tanto para la formación de aroma (Yvon y Rijnen, 2001). Las aminotransferasas son en general específicas para un aminoácido, como lo es la aminotransferasa específica de Asp, o bien son específicas para grupos de aminoácidos como lo son las aminotransferasas específicas de los aminoácidos ramificados o aminoácidos aromáticos (Yvon, 2006). Para el caso particular de la Met aún no se ha identificado una transaminasa específica que inicie la degradación, por lo que probablemente se deba a la actividad cruzada de las otras aminotransferasas mencionadas (Martínez-Cuesta y col., 2011; 2013).

La mayoría de los estudios de identificación, purificación y caracterización de aminotransferasas se realizaron en cepas de *Lactococcus lactis* (Yvon y col., 1997, 2000; Gao y Steele, 1998; Rijnen y col., 1999; Atilés y col., 2000; Engels y col., 2000; Dudley y Steele, 2001), mientras que en *Lactobacillus*, hay pocos estudios reportados (Thage y col., 2004b; Kobayashi y col., 2013). Yvon y col. (1997) purificaron y caracterizaron una AT de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 con actividad hacia los aminoácidos aromáticos, Leu y Met, presentando un rango óptimo de pH y temperatura de 6,5 - 8 y 35 - 45 °C, respectivamente. En la misma cepa, Yvon y col. (2000) purificaron y caracterizaron una segunda AT, con actividad hacia los aminoácidos ramificados (Leu, Val, Ile) y hacia la Met, presentando una mayor actividad sobre los dos primeros. Engels y col. (2000) purificaron y caracterizaron dos enzimas en *L. lactis* subsp. *cremoris* B78 con actividad hacia los aminoácidos ramificados (Val, Leu, Ile) y hacia la Met. Thage y col. (2004b) purificaron y caracterizaron una AT de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* con actividad específica sobre los aminoácidos ramificados.

Gummalla y col. (1999) informaron el catabolismo del Trp vía reacción de transaminación en cepas de *Lb. casei* y *Lb. helveticus*. Además se ha verificado que el catabolismo de los aminoácidos Phe, Leu y Met en *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* y *Lb. bulgaricus* es iniciado por reacción de transaminación (Helinck y col., 2004).

La segunda enzima importante para el metabolismo de los aminoácidos es la glutamato dehidrogenasa. Esta enzima cataliza la conversión del glutamato a  $\alpha$ -cetoglutarato, utilizando como cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) y/o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>). La importancia de esta enzima radica en el hecho de que en el

queso la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato es baja, mientras que por el contrario, la concentración de glutamato es alta. Por lo tanto, las cepas que posean una alta actividad glutamato dehidrogenasa podrían incrementar la concentración del  $\alpha$ -cetoglutarato en el queso.



**Figura 4.** Catabolismo de los aminoácidos vía reacción de transaminación. Adaptado de Tanous y col. (2002).

En general la actividad GDH ha sido detectada en varias especies de BAL, incluyendo *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. pentosus*, *Lb. acidophilus*, etc.) (Williams y col., 2006; Ruysen, 2012) y *S. thermophilus* (Helinck y col., 2004). En *Lb. plantarum* y *S. thermophilus*, esta actividad parece ser muy común, mientras que en otras especies de BAL, como *L. lactis*, es variable (Yvon, 2006). Por otro lado, se ha detectado diferente perfil de la actividad AT hacia distintos AA en distintas BAL (Yvon, 2006; Jensen y Ardö, 2010).

La importancia de los  $\alpha$ -cetoácidos que se forman en la reacción de transaminación, radica en que pueden ser convertidos en aldehídos por decarboxilación y, subsecuentemente, en alcoholes o ácidos carboxílicos por dehidrogenasas utilizando comúnmente como cofactor NAD(P)H o NAD(P)<sup>+</sup>, respectivamente (van Kranenburg y col., 2002, Yvon, 2006). Los ácidos carboxílicos pueden ser formados por una vía alternativa, la decarboxilación oxidativa. Esta vía es iniciada por una  $\alpha$ -cetoácido dehidrogenasa que transforma el  $\alpha$ -cetoácido en acil-CoA. El acil-CoA formado por las actividades de las fosfotransferasas y acil quinasas puede formar el correspondiente ácido carboxílico (Liu y col., 2008). La mayoría de los aldehídos,

alcoholes y ácidos carboxílicos contribuyen al aroma de los quesos (Ardö, 2006; Martínez-Cuesta y col., 2011). Los  $\alpha$ -cetoácidos también pueden dar lugar a compuestos que no han demostrado un impacto significativo en el flavour, como los hidroxiácidos (van Kranenburg y col., 2002; Smit y col., 2004b; Yvon, 2006; Gómez de Cadiñanos y col., 2013). Un esquema de la transaminación y subsecuentes reacciones de degradación de los  $\alpha$ -cetoácidos producidos, con las enzimas involucradas en los distintos pasos, se muestra en la **Figura 4**. La producción de aldehídos a partir de los  $\alpha$ -cetoácidos mediante la actividad  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa es poco frecuente en BAL, aunque ha sido detectada para algunas cepas, y su presencia se ha señalado como de relevancia para la producción de compuestos de flavour (Smit y col., 2004b,c; Yvon, 2006; Hanniffy y col., 2009). El gen que codifica dicha enzima ha sido informado en *L. lactis* (de la Plaza y col., 2004; Smit y col., 2005). Una característica importante de esta enzima, caracterizada por de la Plaza y col. (2004), es que la actividad se incrementó en presencia de NaCl y a pH 5,4; lo que la convierte en una enzima potencial para la formación de aroma en las condiciones ambientales del queso. Por otro lado, los  $\alpha$ -cetoácidos pueden ser convertidos en un solo paso en hidroxiácidos por la actividad de las hidroxiácido dehidrogenasas, enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas entre las BAL. Los hidroxiácidos formados, en general, son los únicos compuestos derivados del metabolismo de aminoácidos que no contribuyen al flavour (van Kranenburg y col., 2002; Yvon, 2006; Gómez de Cadiñanos y col., 2013).

Los perfiles de las principales enzimas involucradas en el catabolismo de los aminoácidos han sido estudiados previamente en varias cepas de BAL de interés en quesería (Smit y col., 2004b; Jensen y Ardö, 2010; Kananen y Ardö, 2011; Pedersen y col., 2013). Se ha sugerido que el conocimiento del perfil enzimático de una cepa puede permitir el direccionamiento de la maduración a la formación de determinados compuestos o grupos de compuestos (Yvon, 2006).

La selección debe fundamentarse en el conocimiento de los caminos metabólicos implicados en la formación de aroma y sobre todo sus pasos limitantes. La disponibilidad de los cosustratos específicos es uno de los factores que limitan las reacciones enzimáticas, tal es el caso del  $\alpha$ -cetoglutarato para llevar a cabo la transaminación en el queso (Yvon y col., 1997; 1998; 2001; Smit y col., 2004b). Otro ejemplo limitante característico es la disponibilidad del  $\text{NAD(P)}^+$ , cofactor necesario en la reacción de regeneración del  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del glutamato por la actividad GDH. Este hecho se debe fundamentalmente a la baja disponibilidad de oxígeno en el interior del queso, que impide la regeneración del  $\text{NAD(P)}^+$  a partir del  $\text{NAD(P)H}$  (Thage y col., 2005; Ardö, 2006). El  $\alpha$ -

cetoglutarato y los compuestos NAD(P)H y NAD(P)<sup>+</sup> son, respectivamente, cosustrato y cofactores comunes para diversas enzimas y esto genera una competencia entre ellas por dichos compuestos. En este sentido, se considera que las diversas aminotransferasas (AspAT, PheAT, ValAT, etc.), compiten por el  $\alpha$ -cetoglutarato (Kieronczyk y col., 2004; Thage y col., 2005), y de la misma manera, se podría sugerir que las diversas dehidrogenasas (GDH, alcohol dehidrogenasa, hidroxilácido dehidrogenasa, etc.) podrán competir por el NAD(P)H o NAD(P)<sup>+</sup>.

La mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la actualidad sobre las actividades enzimáticas implicadas en la producción de aroma en queso se realizaron en cepas de lactococos, y algunos pocos, en cepas de lactobacilos. Por otro lado, los estudios realizados en estreptococos son muy escasos. Teniendo en cuenta la importancia que tiene *S. thermophilus* como cultivo primario en la producción de una gran variedad de quesos, como así también su aplicación industrial en la elaboración de yogur, la información actual sobre sus vías metabólicas implicadas en la formación de aroma aparece como muy limitada.

La degradación de los AA ramificados (Leu, Ile, Val) iniciada por las ATs, da lugar a la formación de compuestos característicos de ciertos tipos de quesos (Yvon, 2006). El 3-metilbutanal, derivado de la degradación de la Leu, ha sido caracterizado con aroma a malta, queso, manzana y cacao en muchos quesos tales como Proosdji, Parmesano, Camembert, Azul y Cheddar (Griffith y Hammond, 1989; Sable y Cottenceau, 1999; Corrêa Lelles Nogueira y col., 2005; Carunchia Whetstine y col., 2006). El 3-metilbutanol, alcohol derivado de la reducción del 3-metilbutanal es considerado un compuesto importante en el sabor general de diversos tipos de quesos (Corrêa Lelles Nogueira y col., 2005). Esta conversión se lleva a cabo por la acción de la enzima alcohol dehidrogenasa, enzima muy activa en levaduras como así también en BAL pero con un menor nivel de actividad (Smit y col., 2009). En el mismo sentido, los aldehídos (2-metilbutanal y 2-metilpropanal) y los alcoholes (2-metilbutanol y 2-metilpropanol) compuestos derivados de la de la Ile y de la Val contribuyen al flavor de muchos quesos (Singh y col., 2003, Carunchia Whetstine y col., 2006; Yvon, 2006; Martínez-Cuesta y col., 2011).

Los AA aromáticos, (Phe, Tyr y Trp) también contribuyen al flavor de los quesos a través de su degradación iniciada por las ATs. Entre algunos de los diversos compuestos formados por el catabolismo de los mismos, podemos mencionar a los compuestos fenilacetaldehído y feniletanol, ambos derivados de la Phe, que tienen notas aromáticas floral y a rosas (Singh y col., 2003; Martínez-Cuesta y col., 2011).

El metabolismo de Asp es importante en la maduración del queso, ya que el oxaloacetato,  $\alpha$ -cetoácido formado después de la reacción de transaminación catalizada por la aspartato aminotransferasa, puede ser transformado en piruvato. Este último es un compuesto intermediario de numerosas vías metabólicas, y también puede actuar como aceptor de grupo amino en la reacción de transaminación (Liu, 2003). El metabolismo del Asp puede dar lugar a la formación de diacetilo y acetoína (Le Bars y Yvon, 2008), compuestos volátiles con importante influencia en ciertas variedades de quesos (Engels, 1997; Milo y Reineccius, 1997; Curioni y Bosset, 2002).

El catabolismo de la Met tiene un papel importante en el desarrollo del flavour del queso, ya que es precursor de volátiles que contienen azufre, los cuales influyen fuertemente en el aroma y son característicos de ciertas variedades de quesos. La contribución de estos compuestos se debe a sus bajos umbrales de olor, a su reactividad y a su alta volatilidad (Martínez-Cuesta y col., 2013). Aparte de la transaminación, la Met puede ser degradada por  $\alpha$ - $\gamma$ -eliminación, iniciada por una enzima con actividad de C-S liasa.

Otras de las posibles vías de degradación de algunos de los aminoácidos durante la maduración del queso, aunque menos frecuentes, son, por ejemplo: la decarboxilación del glutamato en  $\gamma$ -aminobutirato (GABA) (Christensen y col., 1999), o la conversión de Thr en acetaldehído y Gly, catalizada por una aldolasa (Christensen y col., 1999). Por otro lado, la Arg podría derivar en óxido nítrico, por la actividad de una óxido nítrico sintasa (Morita y col., 1997), que también podría producir citrulina como un coproducto. Este mismo AA a través de la arginina deiminasa puede formar amoníaco, Orn y dióxido de carbono (Christensen y col., 1999).

## **5. Estrategias para aumentar el aroma en queso**

El alto costo de la maduración del queso es consecuencia de los largos períodos de almacenamiento necesarios para que el producto recién elaborado adquiera la textura y flavour característico de cada variedad. La temperatura y la humedad relativa de las salas de maduración también debe ser controlada, añadiendo al costo de la maduración, que se estima en aproximadamente €500-800 por tonelada de queso madurado 9 meses. En consecuencia, la aceleración de la maduración del queso ha recibido mucha atención en la literatura científica (Law, 2001; Upadhyay y McSweeney, 2003). En la presente tesis, se estudian estrategias tecnológicas para incrementar el flavour, que en ocasiones son coincidentes o van en la misma línea que la aceleración de la maduración.

## **5.1. Adición de sustancias específicas**

### **5.1.1. Enzimas exógenas**

La adición de enzimas exógenas al queso incrementa las actividades enzimáticas disponibles y puede contribuir a la aceleración de reacciones específicas en el queso. Las principales enzimas adicionadas habitualmente al queso son:  $\beta$ -galactosidasa, proteasas, peptidasas y lipasas.

Las primeras publicaciones sobre el uso de enzimas exógenas (proteasas, peptidasas y lipasas) para acelerar la maduración del queso datan de hace más de 40 años. Sin embargo, la aplicación comercial generalizada es limitada, debido a varios obstáculos técnicos, legales, y económicos. En Europa, el permiso de la adición de enzimas varía marcadamente entre los países, debido a la protección regional de las variedades de quesos.

Las enzimas pueden ser agregadas en diferentes formas y en distintas etapas de la elaboración: (i) adición directa a la leche, (ii) agregado de la enzima en polvo directamente a la cuajada, (iii) inyección líquida a alta presión en la cuajada preformada y (iv) encapsulamiento de enzimas (Wilkinson y Kilcawley, 2005; Law, 2010). La adición directa a la leche tiene la ventaja de que se produce una buena homogenización, y por ende la enzima queda bien distribuida en la masa del queso. La desventaja de este método es el hecho de que la mayor parte de la enzima agregada se pierde en el suero, lo que implica costos muy elevados y posibles efectos adversos para la posterior utilización del suero. Se han realizado numerosos estudios acerca de la adición de enzimas a quesos para acelerar la maduración (Wilkinson, 1993; Wilkinson y Kilcawley, 2005., 1993; Kheadr y col., 2000; Kailasapathy y col., 2005; Wilkinson y Kilcawley, 2005; Azarnia y col., 2006; Azarnia y col., 2010; Kilcawley y col., 2012).

### **5.1.2. Aminoácidos libres**

La adición de aminoácidos libres también se ha planteado como estrategia para aumentar la formación de compuestos de aroma; sin embargo, con posterioridad se ha demostrado que la limitante de la formación de flavour no radica en la disponibilidad de AA en el queso. Wallace y Fox (1997) estudiaron la influencia del agregado de aminoácidos libres a la cuajada de queso Cheddar. Mientras que en algunos casos la adición de aminoácidos parecía tener un efecto beneficioso sobre el desarrollo del flavour del queso, tanto por eliminación del amargor como por la mejora de la calidad del sabor de los quesos, en otros casos tenía un efecto



perjudicial en la calidad del mismo. Además, la estrategia de agregar aminoácidos al queso, resultaba inviable a escala industrial debido al costo elevado de estos compuestos. Finalmente, Yvon y col. (1998) demostraron que la transformación de los AA vía transaminación y no el incremento de su concentración, están en el origen de la mayor intensidad de aroma en el producto.

### **5.1.3. $\alpha$ -cetoácidos**

La transformación de los aminoácidos en compuestos volátiles de aroma vía transaminación requiere de un aceptor de grupos amino, siendo el más común el  $\alpha$ -cetogluturato que, como se mencionó anteriormente, se encuentra en baja concentración en el queso y por lo tanto se constituye en el factor limitante (Yvon y col., 1998). Por esta razón, se ha propuesto la adición de  $\alpha$ -cetoácidos como una metodología para aumentar el aroma de los quesos. Esta metodología fue patentada por Yvon y Gripon (2003), quienes también protegieron resultados relacionados con la producción de  $\alpha$ -cetogluturato *in situ* mediante el uso de un fermento con actividad GDH incrementada por modificación genética.

El piruvato y el oxalacetato también pueden actuar como aceptores del grupo amino, aunque exhiben menor afinidad. Casey y col. (2004) estudiaron la influencia de la adición de piruvato y  $\alpha$ -cetogluturato a la leche de quesería en la producción de compuestos aromáticos en queso suizo tipo Gruyere. Sus resultados confirmaron el papel de los  $\alpha$ -cetoácidos sugeridos por Yvon y col. (1998) en la producción de sustancias aromáticas en el queso. Sin embargo, estos investigadores concluyen que en el queso estudiado, el  $\alpha$ -cetogluturato es poco probable que sea el aceptor para la transaminación, ya que en los mismos la concentración de piruvato es mucho mayor que la del  $\alpha$ -cetogluturato. Además, observaron que la adición de piruvato a la leche de quesería incrementó el aroma no sólo mediante el aumento del catabolismo de los aminoácidos, sino que también aumentó otros compuestos tales como butirato. El efecto positivo en la formación de compuestos de aroma y notas aromáticas por adición de  $\alpha$ -cetogluturato, también fue confirmado en queso tipo Cheddar elaborado con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Banks y col., 2001), en picadillos y salchichas inoculadas con *Pediococcus pentosaceus* y *Staphylococcus carnosus* (Tjener y col., 2004), y en una masa fermentada con *Lactobacillus sanfranciscensis* y *Lactobacillus reuteri* (Zhang y Gänzle, 2010). En el mismo sentido, Vermeulen y col. (2006) informaron un incremento de la transaminación de la Phe en la fermentación de una masa de pan fermentada con *Lactobacillus plantarum* después de la adición de  $\alpha$ -cetogluturato, a diferencia de la fermentación con *Lb. sanfranciscensis*, que no mejoró la transaminación.

## **5.2. Selección de cultivos**

En quesería, un cultivo adjunto o cultivo secundario es un fermento que se agrega con un objetivo diferente de la acidificación. Pueden agregarse en forma separada o formulados junto con el fermento iniciador o starter. En general, se reserva la denominación de cultivo adjunto para aquellos constituidos por BAL, y cultivo o fermento secundario para hongos, *Brevibacterium linens* o bacterias propiónicas, pero ambas denominaciones suelen usarse indistintamente en ocasiones. Las NSLAB que poseen actividades enzimáticas relacionadas al catabolismo de los aminoácidos han recibido una creciente atención ya que pueden mejorar e intensificar el flavour de los quesos. Dentro de las enzimas claves en este proceso bioquímico se encuentran las enzimas glutamato dehidrogenasa y aminotransferasas (Yvon, 2006).

También se han propuesto cultivos adjuntos para mejorar el sabor del queso reducido en grasa y para acelerar la maduración (Aly, 1994; Trepanier y col., 1992; Broadbent, 2013), y para disminuir el sabor amargo (Broadbent, 2013). La selección del cultivo adjunto a utilizar puede realizarse teniendo en cuenta numerosos rasgos, entre ellos, su perfil enzimático o su capacidad autolítica.

### **5.2.1. En base a su perfil enzimático**

Durante las últimas dos décadas del siglo XX se caracterizó exhaustivamente el sistema proteolítico y peptidolítico de *Lactococcus lactis* y de otros microorganismos de interés en la industria quesera. Si bien en la actualidad se conoce que la etapa limitante en la formación de flavour no es la proteólisis sino la transformación de los aminoácidos, la caracterización de los fermentos de acuerdo a su capacidad de hidrolizar la caseína y los péptidos y oligopéptidos derivados y, sobre todo, evitar o disminuir la formación de sabor amargo, sigue siendo información importante a la hora de seleccionar un fermento tanto iniciador como adjunto (Bintsis y col., 2003; Jensen y Ardö, 2010; Bergamini y col., 2013; Pedersen y col., 2013).

Desde los años 2000, se comenzó a incluir en la selección de cultivos primarios el perfil enzimático relacionado al catabolismo de los aminoácidos, por lo que se estudian las actividades aminotransferasas (Brandsma y col., 2008; Jensen y Ardö, 2010; Peralta y col., 2014; Pedersen y col., 2013), glutamato dehidrogenasa (Tanous y col., 2002; Fernández de Palencia y col., 2006; Williams y col., 2006; De Angelis y col., 2010), metionina liasa (Martínez-Cuesta y col., 2013),  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa (Fernández de Palencia y col.,

2006; Brandsma y col., 2008) y esterazas (Vafopoulou-Mastrojiannak y col., 1996; Bintsis y col., 2003).

### **5.2.2. En base a la capacidad autolítica**

Numerosos estudios confirman que existe una correlación positiva entre la capacidad de autólisis del cultivo iniciador con el aumento de la proteólisis (Crow y col., 1993a, 1995; Chapot-Chartier, 1994; Wilkinson y Kilcawley, 2005., 1994; O'Donovan y col., 1996; Kholy, 1998, Deutsch, 2002; Hannon y col., 2003; Bourdat-Deschamps y col., 2004). Estos resultados son consecuencia de la liberación de las endopeptidasas a la matriz del queso, causando una mejora de la accesibilidad de las enzimas a sus sustratos. Para el caso de la lipólisis, la información es un poco más limitada, pero existen algunos trabajos en los que se relaciona la lipólisis con la autólisis (Collins y col., 2003a; Lemee y col., 1994; Dupuis y col., 1993).

La actividad de las enzimas autolíticas ha sido investigada por varios grupos, y en general la autólisis se produce durante la fase de crecimiento exponencial. Si bien se conoce que el índice de autólisis de las BAL se ve afectado por la cepa, temperatura, pH, etapa de crecimiento, entre otros factores (Crow y col., 1995; Hannon y col., 2006b), pocos estudios se han realizado para caracterizar los parámetros que influyen en la autólisis de *Lactobacillus* spp. Dako y col. (1995), quienes estudiaron la capacidad de autólisis de nueve BAL durante la maduración del queso bajo diversas condiciones fisicoquímicas, informaron que dos cepas de *Lactobacillus* fueron las más sensibles a la lisis (*Lb. casei* L2A y *Lb. casei* 137). Kang y col. (1998) demostraron que la temperatura, el pH, la concentración de NaCl, y la fase de crecimiento afectan la velocidad y el grado de autólisis de *Lb. bulgaricus* y *Lb. casei*. En el mismo sentido, Fernández Murga y col. (2008) informaron la influencia de la temperatura y de la fase crecimiento en la autólisis de la cepa *Lb. acidophilus* CRL 640.

### **5.3. Atenuación de cultivos**

Los métodos de lisis y permeabilización en bacterias son de gran importancia para el estudio de las enzimas intracelulares, así como para la aplicación en cultivos celulares que podrán ser usados como biocatalizadores no viables.

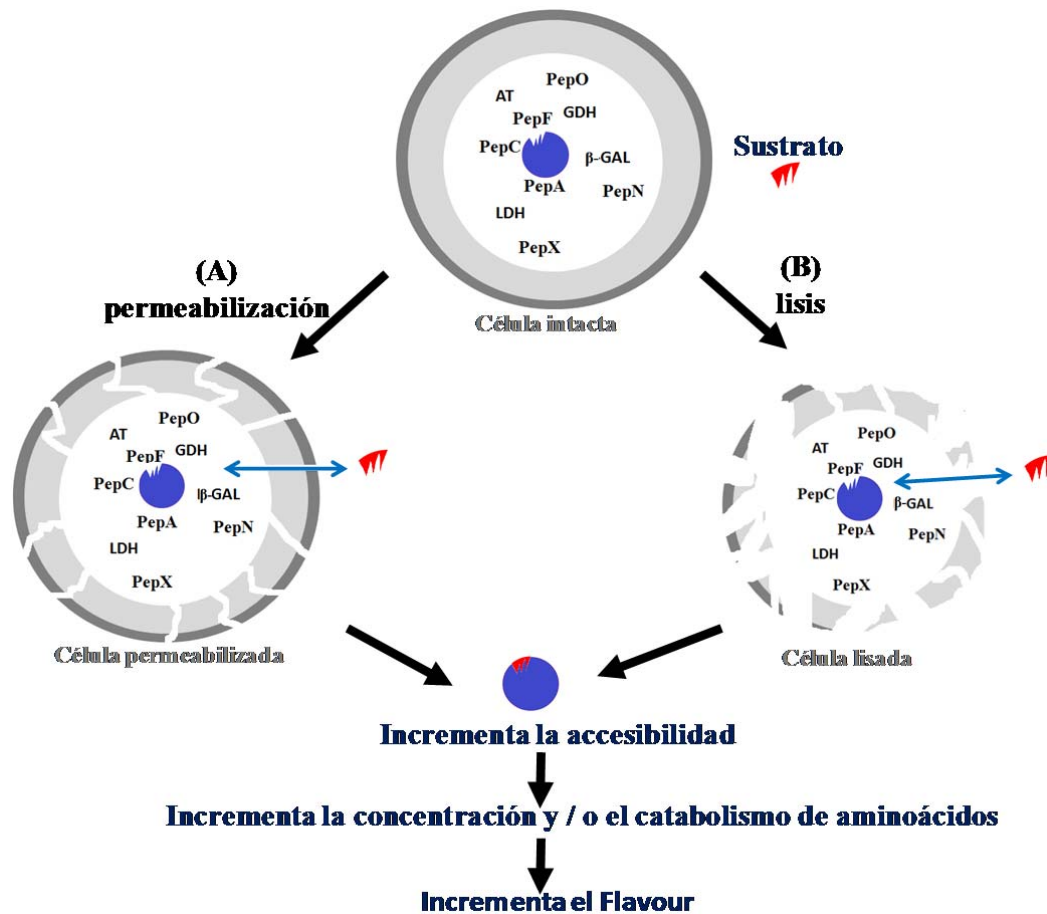
Debido a que la capacidad autolítica de las bacterias es cepa dependiente (Crow y col., 1995; Niven y Mulholland, 1998; Bunthof y col., 2001; Sheehan y col., 2005; Exterkate, 2006), durante décadas se han propuesto diversos métodos que mejoren la accesibilidad de las enzimas a los sustratos. La naturaleza de las paredes celulares de las bacterias depende en

## *Introducción*

---

gran medida del tipo de microorganismo, como así también de otros parámetros, tales como la fase de crecimiento o velocidad de crecimiento, la temperatura de incubación y la composición del medio de crecimiento (Geciova y col., 2002). Las bacterias Gram-positivas (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, o *Leuconostoc* sp. etc.), tienen una gruesa capa de peptidoglicano, que les confiere una gran resistencia. Además, el hecho de que los microorganismos tengan la capacidad de adaptarse a los cambios ambientales, hace que diversas propiedades tales como el tamaño y la estructura de las paredes sufran alteración durante la adaptación, y por lo tanto pueden influir en la disrupción celular (Middelberg, 1995).

Los numerosos métodos que involucran daño a las envolturas celulares de microorganismos podrían ser clasificados según el efecto que generen en las células, como métodos de permeabilización y métodos de lisis (**Figura 5**). En el primer caso, el método busca provocar un daño parcial de la membrana celular generando un aumento de su permeabilidad, sin llegar a perder la integridad de la célula, lo que permitiría un incremento de la accesibilidad de las enzimas a sus respectivos sustratos. Mientras que en el segundo caso, la atenuación provocaría una ruptura tal que genera la pérdida del contenido citoplasmático al medio, incluidas las enzimas de interés. En este sentido, a través de la permeabilización y lisis de fermentos primarios y/o adjuntos, se podría incrementar la accesibilidad de las enzimas involucradas en el catabolismo de los AA tales como, transaminasas, dehidrogenasas de aldehídos y alcoholes o glutamato dehidrogenasa, entre otras; y con esto una mayor producción de aroma. Por otra parte, las enzimas implicadas en el metabolismo de los AA y producción de compuestos de flavour necesitan de la presencia de cofactores, y este hecho en principio se interpretó como un requisito de la célula de que se mantuviera intacta para conservar dichas actividades enzimáticas, por lo que la permeabilización pareciera ser *a priori* el método más adecuado. Sin embargo, dos estudios recientes han comprobado que la lisis de la cepa *Lactococcus lactis* AM2, ya sea espontánea - la cepa contiene un profago - o por agregado de mutanolisina, y la permeabilización de células de *Lactococcus lactis* IFPL730 con lacticina 3147, incrementaron la formación de compuestos de flavour (Bourdat-Deschamps y col., 2004; Martínez-Cuesta y col., 2006).



**Figura 5.** Modelo teórico de la hipótesis planteada acerca de la influencia del tratamiento de permeabilización (A) y lisis (B) en la accesibilidad en las enzimas intracelulares (●) a sus respectivos sustratos extracelulares (■).

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios de atenuación (permeabilización y lisis) en BAL. Los tratamientos químicos utilizan agentes tales como alcoholes (etanol, butanol, isopropanol), solventes orgánicos (acetona, tolueno), detergentes (SDS, triton) (Somkuti y col., 1996; 1998; Sheehan y col., 2005; Doolan y Wilkinson, 2009). Por otro lado, los métodos enzimáticos utilizan enzimas como mutanolisina (Hamada y col., 1978; Coolbear y col., 1994; Kämpfer, 1995) y lisozima (Gouedranche y col. 1986; Coolbear y col., 1994; Klein y Lortal, 1999). Los métodos químicos y enzimáticos se han limitado a escala de laboratorio, principalmente debido a los costos de los productos químicos o enzimas necesarios para su utilización a gran escala, pero también a causa de las dificultades en la eliminación de sustancias químicas exógenas en el producto de interés.

Por otra parte, existen métodos físicos, que se basan en cambios de temperatura, altas presiones, disrupción mecánica en molino de perlas, ultrasonido, microfluidización (Garrido y

## Introducción

---

col., 1994; O'Reilly y col., 2002, Upadhyay y col., 2007). Además se ha propuesto el uso de bacteriocinas que inducen a la autólisis de algunas cepas (Martínez-Cuesta y col., 2006b, Morgan y col., 2002) y el uso de cultivos genéticamente modificados que se autolisan durante la maduración del queso (Rijnen y col., 2000; Curic y col., 1999; Guldfeldt y col., 2001; Joutsjoki y col., 2002). Estos métodos no implican las dificultades de los métodos químicos en cuanto a residuos en los productos alimenticios, aunque en algunos casos comparten la desventaja de los altos costos.

Aunque existe una gran cantidad de métodos de atenuación, la aplicación industrial en quesos es limitada en general a cepas autolíticas o inducidas a lisarse por bacteriocinas, choque térmico, congelado-descongelado y homogeneización de altas presiones (El-Shafe, 1994; Kebary y col., 1997; Lee y col., 2007; Hayes y col., 2011).

Petterson y Sjöström (1975) fueron los primeros en utilizar cultivos atenuados por temperatura en quesería, como estrategia para acelerar la proteólisis y reducir el tiempo de maduración. Estos autores recomendaban un tratamiento de 59 °C y 69 °C durante 15 s para cultivos mesófilos y termófilos, respectivamente. En este mismo sentido, numerosos trabajos se han presentados (Aly, 1994; El-Shafe, 1994; Kebary y col., 1997; Lee y col., 2007). Por otro lado, Klein y Lortal (1999) en su revisión de los métodos de atenuación existentes, informan que el primer queso elaborado con BAL atenuadas por congelación-descongelación fue realizado por Bartels y col. (1987). En el mismo sentido, cultivos de *Lb. helveticus* o *Lb. casei* previamente congelados a -20 °C por 24 horas, han sido utilizados por Aly (1990), como una estrategia para aumentar el aroma en queso. El tratamiento no afectó la composición global del queso pero si se observó un incremento de nitrógeno soluble, ácidos grasos libres, intensidad de aroma, y además redujo el tiempo de maduración. El Soda y col. (1992), en base a los resultados de su estudio del uso de una cepa sometida a congelación para acelerar la maduración del queso, sugieren que este tratamiento podría acelerar la maduración y reducir el sabor amargo. Sin embargo, El-Shafe (1994), quien aplicó esta misma metodología en *Leuconostoc* spp., no observó diferencias entre los quesos controles y experimentales.

Con respecto a los tratamientos químicos, la adición de una cepa de *Lactococcus lactis* atenuada con butanol aceleró la maduración del queso Gouda y redujo el sabor amargo (Klein y Lortal, 1999). Por otro lado, un método utilizando un surfactante como el dodecil sulfato de sodio fue patentado con el objetivo de acelerar la maduración (Smith y col., 2003).

En cuanto a los tratamientos con enzimas, Goudedranche y col. (1986) informaron que la adición de lisozima a queso Saint-Paulin y Camembert mejoró la textura y flavour. En este mismo sentido, detectaron que la formación de complejos proteína-enzima tiene la ventaja de

## *Introducción*

---

limitar la pérdida de la lisozima en el suero. Sin embargo, la adición de lisozima a la leche de elaboración de quesos a gran escala no es económicamente viable, y su uso se limita a la aplicación como aditivo para impedir la germinación de esporas (Klein y Lortal, 1999).

El tratamiento de ultrasonido también es uno de los potenciales métodos para ser usados como estrategia para aumentar el aroma, ya que se ha demostrado un incremento de diversas actividades enzimáticas (Wang y Sakakibara, 1997; Bunthof y col., 2001), sin embargo los estudios existentes son muy escasos (Tabatabaie y Mortazavi, 2010; Moncada y Aryana, 2012).

Finalmente, la microfluidización es otro de los potenciales métodos para acelerar la maduración, ya que estudios recientes confirman el incremento de la accesibilidad de las enzimas, pero hasta la fecha no se han registrado estudios específicos en quesos (Baldwin y Campbell, 1994; Hayes y col., 2011).

# Objetivos

## *Objetivo general:*

- Valorar la contribución de fermentos primarios termófilos y de fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos a la biosíntesis de flavour en queso.

## *Objetivos particulares:*

- Detectar la presencia de actividades enzimáticas clave implicadas en el catabolismo de los aminoácidos, mediante estrategias bioquímicas en un grupo de bacterias lácticas de origen comercial y autóctono, y mediante un enfoque bioinformático, en bacterias lácticas de interés en quesería.
- Evaluar el desempeño de diferentes métodos de atenuación - lisis y permeabilización - en dos cepas comerciales de *S. thermophilus*.
- Determinar la influencia de la atenuación de *S. thermophilus* sobre la bioformación de compuestos de aroma en dos modelos de quesos Cremoso.
- Caracterizar la fermentación de azúcares, el metabolismo de aminoácidos y producción de compuestos de aroma en un modelo de queso blando por parte de cepas de lactobacilos mesófilos con diferente perfil de aminotransferasas, y la posibilidad de cooperación en la formación de aroma entre estos fermentos y una cepa de *S. thermophilus* con alta actividad glutamato dehidrogenasa, ya sea viable o sometida a tratamientos de atenuación.



# *Capítulo 1*

*“Enzimas clave para el metabolismo de aminoácidos en un elenco de bacterias lácticas seleccionadas”*

## **1. Introducción**

En la mayoría de los procesos de fermentación láctica destinados a la obtención de diferentes productos, como yogur y queso, el rol principal de las bacterias lácticas (BAL) del fermento es la producción de ácido láctico a partir del catabolismo de la lactosa presente en dicha matriz, logrando de esta manera la acidificación del producto. Sin embargo, es conocido que ésta no es la única función que cumplen las BAL en dichos procesos, ya que las mismas poseen una gran diversidad de enzimas implicadas en el metabolismo de otros compuestos presentes en el alimento. Entre estas enzimas podemos encontrar: i) oxidorreductasas, que catalizan la transferencia de electrones, tales como la glutamato dehidrogenasa, alcohol dehidrogenasa, o aldehído dehidrogenasa, ii) transferasas, que catalizan la transferencia de grupos, como las aminotransferasas, iii) hidrolasas, que catalizan reacciones de hidrólisis, como la  $\beta$ -galactosidasa, iv) liasas, que conducen a la formación de dobles enlaces por eliminación de grupos, tales como la metionina  $\gamma$ -liasa, e v) isomerasas, que transfieren grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas como la fosfoglucosa isomerasa (Mcsweeney y Sousa 2000; Yvon y Rijnen, 2001; Ardö, 2006).

Entre las transformaciones bioquímicas que ocurren durante la maduración de quesos, se destacan la proteólisis y el catabolismo de sus productos de degradación (aminoácidos) debido al impacto significativo de las mismas en las características organolépticas del producto. En este sentido, ha sido determinado que el catabolismo de los aminoácidos (AA) es la principal vía metabólica de formación de compuestos de aroma durante la maduración de la mayoría de los quesos (Yvon, 2006). Este catabolismo es iniciado en general a través de una reacción de transaminación, en la cual las enzimas aminotransferasas (AT), catalizan la transferencia del grupo amino de los aminoácidos a un aceptor adecuado, que por lo general es el  $\alpha$ -cetoglutarato, aunque también otros  $\alpha$ -cetoácidos han sido implicados como aceptores, tales como el piruvato y el oxalacetato (Amárita y col., 2001; Casey y col., 2004; Yvon, 2006). Las AT son enzimas intracelulares, generalmente específicas para grupos de aminoácidos, tales como los aminoácidos aromáticos (ArAT), aminoácidos ramificados (BcAT) o ácido aspártico (AspAT). Sin embargo, algunas de estas enzimas han demostrado solapamientos en sus actividades. En este sentido, es importante destacar que hasta el momento no se ha identificado ninguna AT específica para la Met pero, sin embargo, varias enzimas ArAT y BcAT han demostrado cierta actividad hacia este aminoácido. Debido a que la transaminación es la reacción principal que inicia el catabolismo de los AA, la presencia de actividad aminotransferasa en las BAL es fundamental para el desarrollo del mismo, y la

consecuente formación de aroma en quesos (Yvon y Rijnen, 2001; Rijnen y col., 2003; Yvon, 2006; Martínez-Cuesta y col., 2013). Asimismo, el estudio del perfil de especificidad de las AT hacia los diferentes aminoácidos es importante porque se ha demostrado que el mismo influye en los compuestos de aroma producidos en quesos (Kieronczyk y col., 2004). Otra de las enzimas que influye directamente en el inicio del catabolismo de los AA es la glutamato dehidrogenasa (GDH) que cataliza la conversión de ácido glutámico en  $\alpha$ -cetoglutarato, compuesto aceptor de grupo amino más utilizado en la reacción de transaminación. Es decir, la GDH cataliza la reacción que repone el co-sustrato utilizado en la transaminación (Tanous y col., 2005).

La actividad AT y GDH, al igual que otras actividades enzimáticas, puede variar por género, especie y en muchos casos suele ser cepa-dependiente (Williams y col., 2006; De Angelis y col., 2010a; Jensen y Ardö, 2010; Kananen y Ardö, 2011). Por otro lado, es importante tener en cuenta que más allá de la capacidad genética de una cepa para sintetizar una enzima, su expresión puede diferir según las condiciones medioambientales presentes en la matriz de crecimiento, e incluso puede no ser expresada (Pastink y col., 2008; Taïbi y col., 2011; Pedersen y col., 2013). Asimismo, también pueden existir variaciones en la estabilidad y la actividad de cada enzima particular frente a las condiciones ambientales (pH, temperatura, inhibidores, etc.) (De Angelis y col., 2010b).

El uso de técnicas computacionales, matemáticas y estadísticas para el análisis, interpretación y generación de datos biológicos se conoce con el nombre de bioinformática (Rastogi y col., 2008). El BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es una de las herramientas simples pero más populares en bioinformática, que permite buscar secuencias biológicas similares (de ácidos nucleicos o de proteínas) dentro de las grandes bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Este programa trabaja mediante el alineamiento de secuencias comparando una secuencia problema (query) contra una gran cantidad de secuencias de la base de datos. Es importante destacar que el algoritmo que utiliza BLAST encuentra las secuencias que presentan el mayor parecido a la secuencia problema, pero no garantiza que las secuencias que alinea sean homólogas y mucho menos que tengan la misma función, simplemente provee posibles candidatos. Sin embargo, el programa calcula la significación de los resultados obtenidos, lo que permite una evaluación de los mismos. Liu y col. (2008) realizaron una búsqueda de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los aminoácidos en 20 genomas de BAL. Más recientemente, este mismo grupo volvió a utilizar esta herramienta para estudiar el sistema proteolítico de las BAL, realizando búsqueda de la secuencia de proteasas, transportadores de péptidos y peptidasas (Liu y col., 2010).

El conocimiento de las actividades AT y GDH de cepas de BAL usadas como fermentos primarios y adjuntos en elaboraciones de quesos, permitirían seleccionar una cepa o una combinación de cepas en base a su perfil enzimático, para controlar y/o direccionar la maduración hacia la obtención de un queso con características aromáticas específicas o incrementadas. El objetivo de este capítulo fue detectar la presencia de actividades enzimáticas clave implicadas en el catabolismo de los aminoácidos, mediante estrategias bioquímicas en un grupo de BAL de origen comercial y autóctono, y mediante un enfoque bioinformático, en BAL de interés en quesería.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Cepas y condiciones de crecimiento**

Veintiuna cepas de BAL fueron estudiadas: 15 de lactobacilos mesófilos, 4 de lactobacilos termófilos y 2 de estreptococos. Uno de los lactobacilos mesófilos fue una cepa de colección de genoma completo conocido (Mazé y col., 2010), *Lactobacillus casei* BL23. Las otras catorce cepas de lactobacilos mesófilos fueron aisladas de quesos de buena calidad, de origen industrial y artesanal, luego de dos meses de maduración (Bude Ugarte y col., 2006). Tres de las cepas de lactobacilos termófilos fueron aisladas de suero fermento natural (Reinheimer y col., 1995; Reinheimer y col., 1996; Quiberoni y col., 1997). Por último, tres de las cepas estudiadas fueron de origen comercial, dos cepas de estreptococos y una de *Lb. helveticus*, que por razones de confidencialidad se denominaron: *Streptococcus thermophilus* 1, *S. thermophilus* 2 y *Lb. helveticus* 3.

Las cepas autóctonas, conservadas a -80 °C en el caldo apropiado suplementado con 15 % de glicerol como criopreservante, fueron reactivadas mediante los cultivos overnight sucesivos antes del repique final en el medio de cultivo adecuado. Para los cultivos comerciales liofilizados que pueden estar constituidos por varias cepas, se procedió a aislar una cepa en particular y realizar las determinaciones enzimáticas sobre dicha cepa. Se utilizó caldo de cultivo Elliker (Biokar Diagnostics, Allonne, Francia) para las cepas de *S. thermophilus* y caldo de cultivo MRS (Biokar Diagnostics, Allonne, Francia) para los lactobacilos. Las bacterias mesófilas y termófilas fueron incubadas en microaerobiosis a 37 °C y 42 °C, respectivamente.

**Tabla 1.1.** Cepas de lactobacilos y estreptococos estudiadas en el presente capítulo.

Especie	Cepa	Origen	Referencia
<i>Lb. plantarum</i>	33	queso artesanal de leche cruda	colección INLAIN <sup>1</sup>
	91	queso Tybo B	
	89	queso Tybo B	
	29	queso artesanal de leche cruda	
	87	queso Tybo B	
<i>Lb. casei</i>	81	queso Tybo A	colección INLAIN <sup>1</sup>
	72	queso Tybo B	
	BL23	cepa salvaje	
<i>Lb. paracasei</i>	90	queso Tybo B	colección INLAIN <sup>1</sup>
<i>Lb. rhamnosus</i>	73	queso Tybo A	colección INLAIN <sup>1</sup>
	77	queso Cremoso	
	78	queso Cremoso	
	75	queso Tybo A	
<i>Lb. fermentum</i>	28	queso artesanal de leche cruda	colección INLAIN <sup>1</sup>
	46	queso artesanal de leche cruda	
<i>Lb. helveticus</i>	133	suero fermento natural	colección INLAIN <sup>1</sup>
	138	suero fermento natural	
	209	suero fermento natural	
	3	-	
<i>S. thermophilus</i>	1	-	cepa comercial
	2	-	

<sup>1</sup>INLAIN: Instituto de Lactología Industrial

<sup>2</sup>CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

## 2.2. Curvas de crecimiento

Las cepas fueron inoculadas al 2 % v/v en el medio de cultivo adecuado, que fue homogeneizado correctamente, fraccionado en tubos estériles e incubado a la temperatura mencionada anteriormente. El crecimiento microbiano fue monitoreado por medición de la densidad óptica (DO) a 560 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Lambda 20, Perkin Elmer, Singapore) para construir las curvas de crecimiento y determinar el tiempo necesario para alcanzar la fase de crecimiento logarítmica tardía. Una porción del caldo de cultivo fue separado antes de la inoculación del mismo, para ser utilizado como control (blanco) de densidad óptica.

Asimismo, se realizaron recuentos en placa en algunos puntos de muestreo para verificar la curva de crecimiento realizada con lecturas de DO.

### **2.3. Preparación de los extractos libres de células (ELC)**

Los ELC fueron obtenidos a partir de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico tardío por disrupción mecánica con perlas de vidrio de un diámetro de 106  $\mu\text{m}$  (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) en un disruptor celular Mini-Beadbeater 8TM (Biospec Products, Bartlesville, IL, Estados Unidos). En primer lugar, se realizaron experiencias preliminares para definir las condiciones óptimas para obtener un alto grado de eficiencia en el proceso de disrupción. Para ello, se eligieron al azar dos cepas, para las cuales se estudió el porcentaje de lisis utilizando tres diferentes relaciones perlas (g) / células (mL) (1,2, 0,7 y 0,3), y tres o cinco ciclos de disrupción a la máxima velocidad del disruptor. Los ciclos de disrupción se realizaron durante un minuto cada uno con enfriamientos en hielo de dos minutos cada uno entre cada ciclo de disrupción. La eficiencia de la disrupción celular fue evaluada teniendo en cuenta el recuento en placa antes y luego de la disrupción (Pedersen y col., 2013).

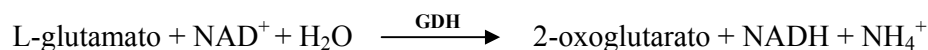
Las cepas fueron inoculadas al 2 % v/v y crecidas en el medio y condiciones descriptas previamente hasta que alcanzaron la fase de crecimiento logarítmica tardía, tiempo determinado por las curvas de crecimiento. Las células fueron cosechadas por centrifugación (10000 g - 10 min - 4 °C) y el pellet resultante se lavó 3 veces con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7 y se resuspendió nuevamente en el mismo buffer en un volumen 30 veces menor para lograr una mayor concentración celular. Esta suspensión fue trasvasada a microtubos (2 mL) conteniendo la cantidad adecuada de perlas, los cuales fueron esterilizados en su conjunto previamente. La disrupción se llevó a cabo mediante el molino de perlas Mini-Beadbeater 8TM en las condiciones establecidas en las experiencias preliminares: tres etapas de 1 minuto, con enfriamiento de 2 minutos en baño de hielo entre cada etapa, utilizando una relación perlas/células de 1,2 g / mL. El lisado celular fue centrifugado (16000 g - 15 min - 10 °C) para separar las perlas, células y detritos celulares y luego filtrado a través de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, San Pablo, Brasil). El filtrado constituyó el ELC que fue almacenado a -20 °C hasta los análisis correspondientes. La actividad GDH y AT se determinó en estos ELC utilizando el kit comercial L-Glu de R-Biopharm (Boehringer Mannheim, Alemania). Se obtuvieron duplicados de ELC a partir de dos cultivos independientes de cada cepa estudiada.

### **2.4. Determinación de la actividad Glutamato Dehidrogenasa (GDH)**

La actividad GDH fue determinada colorimétricamente midiendo la reducción de  $\text{NAD}^+$  dependiente de glutámico en una reacción acoplada con la diaforasa, de acuerdo a las indicaciones del kit comercial, con algunas modificaciones (Kieronczyk y col., 2003). El

## Capítulo 1

ácido L-glutámico es desaminado oxidativamente a 2-oxoglutarato por medio de nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) en presencia de la enzima GDH. Luego, en una reacción catalizada por la diaforasa, el NADH formado en la primera reacción convierte el cloruro de iodonitrotetrazolio (INT) a formazán, que es medido a 492 nm:



De esta manera, un volumen adecuado del ELC (50-150  $\mu\text{L}$ ) fue incubado en una mezcla de reacción conteniendo buffer fosfato de potasio/trielanolamina pH 8,6, L-glutámico,  $\text{NAD}^+$ , cloruro de iodonitrotetrazolio y diaforasa (todos los reactivos son provistos en el kit L-Glu de Boehringer) durante 1 h a 37 °C, y luego se realizó la detección por medición de la absorbancia a 492 nm. Asimismo, se realizaron controles adecuados, en los cuales no se incluyó el glutámico, para monitorear reacciones inespecíficas de reducción endógena (independiente de glutámico) de  $\text{NAD}^+$  (Williams y col., 2006). La actividad GDH fue expresada como la diferencia de absorbancia a 492 nm entre la muestra y el control respectivo, estandarizada por la cantidad de proteínas del ELC (expresada en mg). Las muestras fueron leídas contra el blanco de reacción, denominado control 2.

**Tabla 1.2.** Procedimiento para la determinación de la actividad glutamato dehidrogenasa.

	Muestra <b>M</b>	Control 1 (sin glutámico) <b>C1</b>	Control 2 (blanco de reacción) <b>C2</b>
Buffer (solución 1)	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
NAD/Diaforasa (solución 2)	67 $\mu\text{L}$	67 $\mu\text{L}$	67 $\mu\text{L}$
Cloruro de iodonitrotetrazolio (solución 3)	67 $\mu\text{L}$	67 $\mu\text{L}$	67 $\mu\text{L}$
Glutámico 25 mM	266 $\mu\text{L}$	-	266 $\mu\text{L}$
Agua	450 $\mu\text{L}$	716 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$

Medir absorbancia a 492 nm ( $A_i$ )

ELC	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	-
Volumen total	1100 $\mu\text{L}$	1100 $\mu\text{L}$	1100 $\mu\text{L}$

Incubar 1 h a 37 °C y medir la absorbancia a 492 nm ( $A_f$ )

Calcular  $A_f - A_i$  para cada muestra.

Cálculo de la actividad GDH:

$$\text{GDH} = \frac{(A_f M - A_i M) - (A_f C_1 - A_i C_1)}{P * V}$$

M= muestra.

C<sub>1</sub>= control de reacciones inespecíficas (mezcla de reacción sin el agregado de ácido glutámico).

C<sub>2</sub>= blanco (mezcla de reacción sin el agregado del ELC).

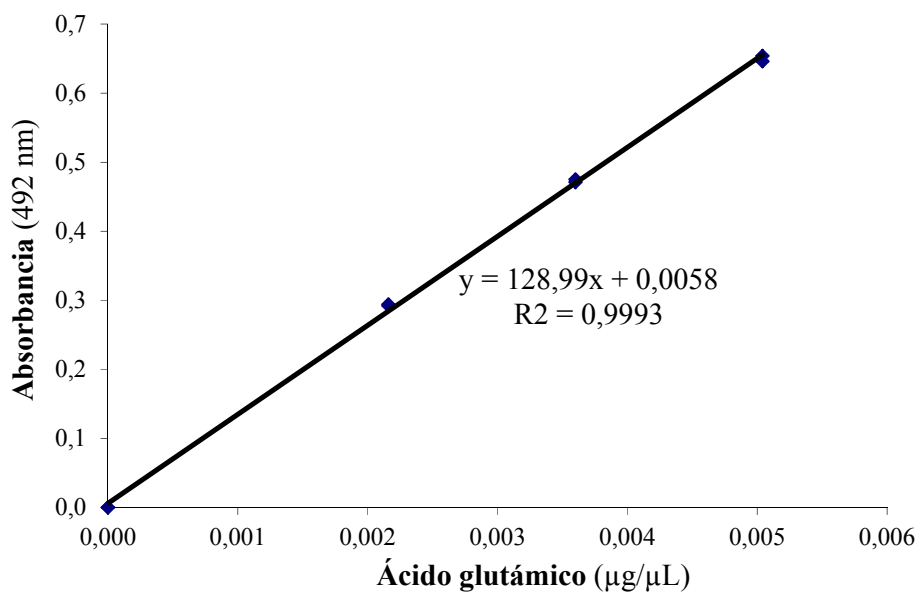
P = concentración de proteínas en el ELC (mg / μL).

V = volumen de la alícuota del ELC utilizado en la ecuación (μL).

## 2.5. Determinación de la actividad Aminotransferasa (AT)

La actividad AT hacia ocho aminoácidos: Asp, Met, aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile, Val) y aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp) fue analizada cuantificando el ácido glutámico derivado de la reacción de transaminación utilizando el mismo kit descrito anteriormente pero con algunas modificaciones experimentales. El ensayo se realizó en dos etapas; en la primera, las ATs presentes en el ELC catalizan la reacción de transaminación de un aminoácido de interés utilizando α-cetoglutarato como aceptor de grupo amino con la consecuente formación de ácido glutámico, y en la segunda reacción se cuantifica el ácido glutámico formado. De esta manera, un volumen de ELC (15 a 50 μL) fue incubado durante 20 min a 37 °C en una mezcla de reacción (protegida de la luz) conteniendo buffer tris-HCl 200 mM pH 8, fosfato de piridoxal 1mM, α-cetoglutarato 50 mM (preparado diariamente) y 15 mM del aminoácido correspondiente. Una vez finalizada la incubación, la reacción se detuvo por calentamiento a 80 °C durante 15 min. El ácido glutámico formado en la reacción de transaminación se determinó posteriormente con el kit comercial L-Glu (Boehringer), ya descrito en el ítem anterior. Asimismo, se construyó la curva de calibrado de ácido glutámico (**Figura 1.1**), utilizando el estándar provisto en el kit en las concentraciones mostradas en la **Tabla 1.4**. Los resultados de la actividad aminotransferasa fueron expresados como μg de ácido glutámico producido por tiempo de reacción (expresada en minutos) y por cantidad de proteínas del ELC (expresada en mg).





**Figura 1.1.** Curva de calibrado del ácido glutámico para la determinación de las aminotransferasas.

**Tabla 1.3.** Procedimiento para la determinación de la actividad aminotransferasa: primera reacción.

	Muestra <b>M</b>	Control 1 (sin ELC) <b>C<sub>1</sub></b>	Control 2 (sin AA) <b>C<sub>2</sub></b>	Control 3 (sin ELC y sin AA) <b>C<sub>3</sub></b>
Buffer tris-HCl 200 mM	85 µL	85 µL	85 µL	85 µL
Aminoácido 15 mM	50 µL	50 µL	-	-
Fosfato de piridoxal 1mM	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Agua	-	50 µL	50 µL	100 µL
α-cetoglutarato 50 mM	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
ELC	50 µL	-	50 µL	-
Volumen total	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL

**Capítulo 1****Tabla 1.4.** Procedimiento para la determinación de la actividad aminotransferasa: segunda reacción.

	<b>M</b>	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub></b>	<b>Estándar</b>
Buffer (solución 1)	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
NAD/Diaforasa (solución 2)	67 µL	67 µL	67 µL	67 µL	67 µL
Cloruro de iononitrotetrazolio (Solución 3)	67 µL	67 µL	67 µL	67 µL	67 µL
Alícuota de la primera reacción para la determinación de la actividad AT	70 µL	70 µL	70 µL	70 µL	-
Agua	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	Estándar 1: 600 µL Estándar 2: 620 µL Estándar 3: 640 µL
Estándar L-glutámico (0,07g/L)					Estándar 1: 70 µL Estándar 2: 50 µL Estándar 3: 30 µL
Medir absorbancia a 492 nm (A <sub>i</sub> )					
Enzima GDH (solución 4)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Volumen total	1014 µL	1014 µL	1014 µL	1014 µL	1014 µL
Incubar 45 min a 37 °C, leer a 492 nm (A <sub>f</sub> ) y calcular A <sub>f</sub> -A <sub>i</sub> para cada una de las muestras, controles o estándares analizados.					

Para la expresión de los resultados se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$AT_{\text{total}} = \frac{(A_f M - A_i M) - (A_f C_1 - A_i C_1) - a}{b} \cdot \frac{V_4}{V_3} \cdot \frac{1}{T} \cdot \frac{V_2}{P \cdot V_1}$$

$$AT_{\text{endógena}} = \frac{(A_f C_2 - A_i C_2) - (A_f C_3 - A_i C_3) - a}{b} \cdot \frac{V_4}{V_3} \cdot \frac{1}{T} \cdot \frac{V_2}{P \cdot V_1}$$

M= muestra del extracto libre de células (ELC).

C<sub>1</sub>=mezcla de reacción sin el agregado del ELC.

C<sub>2</sub>=mezcla de reacción sin el agregado de aminoácidos (AA).

C<sub>3</sub>=mezcla de reacción sin el agregado del ELC y sin AA.

P=concentración de proteínas en el ELC (mg / µL).

T= tiempo de la reacción de transaminación (min).

y = bx+a = ecuación de la curva de calibrado del ácido glutámico.

V<sub>1</sub>=volumen del ELC agregado a la reacción de transaminación (50 µL).

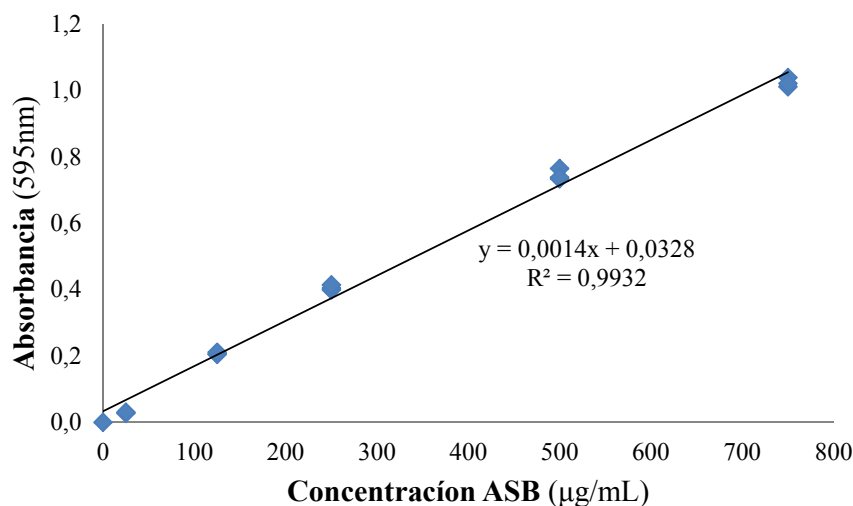
$V_2$ = volumen total de la reacción de transaminación (250  $\mu$ L).

$V_3$ = volumen de la alícuota usado en la determinación del ácido glutámico formado (70  $\mu$ L).

$V_4$ = volumen total de la mezcla de reacción en la determinación del ácido glutámico formado (1014  $\mu$ L).

## 2.6. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas del ELC fue determinada colorimétricamente por reacción con el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el kit comercial Coomassie Plus provisto por Pierce Chemical (Prod. 23236, Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos). Un volumen de 50  $\mu$ L de una dilución adecuada (1/30 - 1/40) de cada ELC fue adicionado a 1,5 mL del reactivo Coomassie Plus. Luego de una suave y correcta homogeneización, la mezcla se incubó 10 min a 25 °C, y finalmente se realizó la lectura a 595 nm (**Figura 1.2**). Para la cuantificación de las proteínas, se realizó una curva de calibrado con un estándar de albúmina sérica bovina (ASB), también provisto en el kit comercial mencionado. Todas las determinaciones de proteínas fueron realizadas por duplicado.



**Figura 1.2.** Curva de calibrado de proteínas por el método de Bradford.

## 2.7. Análisis bioinformático.

La búsqueda de las secuencias de las principales enzimas involucradas en la degradación de los aminoácidos en los genomas completos de algunas cepas de BAL pertenecientes a la misma especie que las NSLAB y cepas comerciales estudiadas (**Tabla 1.5**), se realizó en la

base de datos GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), en la cual se utilizó la herramienta BlastP del NCBI, tomando como criterio un E-valor de  $10^{-4}$  o menor. Este valor es el parámetro más útil de las puntuaciones en las búsquedas de BLAST, donde un valor cercano a 1 indica que la alineación de secuencias probablemente se ha producido por casualidad, mientras que valores menores que 0,05 son lo que típicamente se toman para representar una significancia biológica (Pertsemlidis y Fondon, 2001).

El análisis se llevó a cabo para las principales enzimas que intervienen en la degradación de los aminoácidos: i) glutamato dehidrogenasa; ii) aminotransferasas de aminoácidos ramificados; iii) aminotransferasas de aminoácidos aromáticos; iv) aminotransferasa específica del Asp; v)  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa; vi) aldehído-alcohol dehidrogenasa (enzima bifuncional); vii) complejo  $\alpha$ -ceto-ácido dehidrogenasa; viii) fosfato butiltransferasa; ix) fosfotransferasas con un grupo carboxilo como aceptor, x) D-hidroxiácido dehidrogenasa; xi) L-hidroxiácido dehidrogenasa, xii) esterasa.

La cepa *Lb. casei* BL23 que fue incluida en el análisis bioinformático, también fue analizada en cuanto a sus actividades enzimáticas GDH y ATs.

**Tabla 1.5.** Cepas de bacterias lácticas utilizadas en la búsqueda bioinformática.

Cepa	Código	Cepa	Código
<i>Lb. casei</i> ATCC 334	Lc i	<i>S. thermophilus</i> CNRZ1066	St i
<i>Lb. casei</i> BL23	Lc ii	<i>S. thermophilus</i> MN-ZLW-002	St ii
<i>Lb. casei</i> LC2W	Lc iii	<i>S. thermophilus</i> LMG 18311	St iii
<i>Lb. casei</i> W56	Lc iv	<i>S. thermophilus</i> LMD-9	St iv
<i>Lb. casei</i> Zhang	Lc v	<i>S. thermophilus</i> JIM 8232	St v
<i>Lb. casei</i> BD-II	Lc vi	<i>S. thermophilus</i> ND03	St vi
<i>Lb. plantarum</i> JDM1	Lp i	<i>Lb. fermentum</i> CECT 5716	Lf i
<i>Lb. plantarum</i> WCFS1	Lp ii	<i>Lb. fermentum</i> IFO 3956	Lf ii
<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ST-III	Lp iii	<i>Lb. helveticus</i> H10	Lh i
<i>Lb. plantarum</i> ZJ316	Lp iv	<i>Lb. helveticus</i> DPC 4571	Lh ii
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 8530	Lr i	<i>Lb. helveticus</i> R0052	Lh iii
<i>Lb. rhamnosus</i> Lc 705	Lr ii	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302	Lpc i
<i>Lb. rhamnosus</i> HN001	Lr iii	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 8700:2	Lpc ii
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Lr iv		

## **2.8. Análisis estadístico**

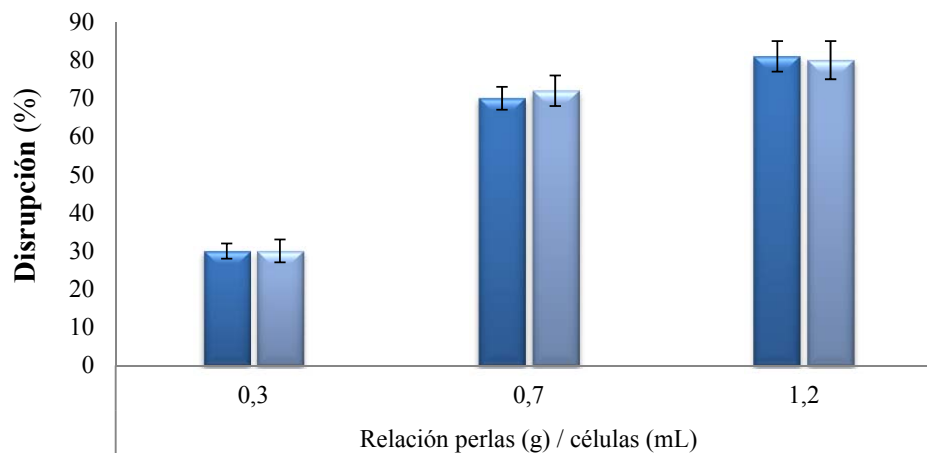
Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM-SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Para cada cepa, las actividades AT específicas para distintos aminoácidos fueron analizadas mediante análisis de la variancia (ANOVA) de una vía ( $P \leq 0,05$ ). Cuando se encontraron diferencias significativas, las medias fueron comparadas por el test de Duncan para detectar grupos de medias homogéneas. Por otro lado, los niveles de actividad AT hacia los ocho aminoácidos de las 21 cepas ensayadas, fueron analizados mediante un análisis de componentes principales (ACP), para detectar agrupamientos de cepas de acuerdo a su perfil de ATs. Asimismo, también se realizó un análisis cluster jerárquico utilizando como variables los scores de las muestras para los dos primeros componentes principales.

## **3. Resultados y Discusión**

### **3.1. Eficiencia de la disrupción celular**

Para el estudio de las actividades enzimáticas intracelulares, fue necesario provocar la lisis de las células para obtener los extractos libres de células (ELC) de cada una de las cepas ensayadas. Para ello, se aplicó una disrupción mecánica utilizando un molino de perlas, en el cual la eficiencia de disrupción depende principalmente de la elección del diámetro de las perlas y la cantidad de las mismas. Para la disrupción de células bacterianas, el diámetro adecuado de perlas a utilizar es entre 100 a 150  $\mu\text{m}$  (Geciova y col., 2002). En el presente trabajo de tesis, se realizaron experiencias preliminares con el objetivo de definir las mejores condiciones para obtener los ELC.

En estas experiencias encontramos que el nivel de disrupción se incrementó significativamente cuando una mayor relación perlas/células fue utilizada, pero no hubo diferencias al aplicar 3 ó 5 ciclos de disrupción (**Figura 1.3**). El mayor grado de disrupción celular al usar una mayor cantidad de perlas es debido a una interacción incrementada entre las perlas (Geciova y col., 2002).



**Figura 1.3.** Porcentaje de lisis celular al utilizar el molino de perlas. Relación perlas (g) / células (mL) (0,3, 0,7 y 1,2). 3 ciclos (■) y 5 ciclos (▨).

### 3.2. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento para todas las BAL estudiadas se presentan en las **Figuras 1.4 a 1.9**. Todos los cultivos alcanzaron el final de la fase de crecimiento exponencial entre las 8 y 12 horas de incubación, con densidades ópticas entre 1,6 a 2,1. Los recuentos celulares promedio al momento de la cosecha de las dos experiencias individuales de obtención de ELC se muestran en la **Tabla 1.6**; los valores medios se encontraron alrededor de  $1,94 \cdot 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Los niveles de disrupción celular fueron variables entre los diferentes cultivos y el valor promedio alcanzó 93 %. Además, el contenido de proteínas en los ELC demostró algunas variaciones entre las experiencias, con un valor medio de  $6,6 \pm 1,7$  mg  $\text{mL}^{-1}$ .

Estos resultados son similares a los obtenidos por Jensen y Ardö (2010) en seis cepas de *Lb. helveticus*, que alcanzaron la fase de crecimiento logarítmica tardía en cultivos en MRS luego de 8 a 12 h de incubación y similares recuentos, también en el orden de 9 log. Pedersen y col. (2013) obtuvieron niveles de recuentos entre 8-9 log en seis cepas de *Leuconostoc* y de 7 log en dos cepas de *Lactobacillus danicus* después de una incubación por 16 h. Además, Kananen y Ardö (2011) reportaron niveles de 9 log en cultivos de 8 cepas de *Lb. helveticus* cuando llegaron a su fase de crecimiento estacionaria. Otros investigadores que han estudiado las actividades AT y GDH en ELC obtenidos a partir de cultivos de lactobacilos mesófilos en fase de crecimiento logarítmico tardío no reportaron los niveles de población celular alcanzada en dicha fase.

## Capítulo 1

**Tabla 1.6.** Densidad óptica y recuentos en el medio de cultivo al momento de la cosecha y en el buffer de resuspensión antes y luego de la disrupción, y porcentaje de disrupción obtenido.

Especie	Cepa	Medio de cultivo (MRS o Elliker)		Buffer de resuspensión		
		Densidad óptica <sup>a</sup>	Recuento (UFC mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Recuento (UFC mL <sup>-1</sup> )		Disrupción (%) <sup>c</sup>
				Inicial <sup>c</sup>	Final <sup>d</sup>	
<i>Lb. plantarum</i>	33	2,010	5,35 10 <sup>8</sup>	1,75 10 <sup>10</sup>	8,50 10 <sup>8</sup>	94,3
	91	2,020	1,77 10 <sup>9</sup>	2,00 10 <sup>9</sup>	1,50 10 <sup>7</sup>	99,2
	89	2,071	8,90 10 <sup>8</sup>	2,90 10 <sup>10</sup>	1,00 10 <sup>7</sup>	99,9
	29	1,971	3,22 10 <sup>8</sup>	3,19 10 <sup>10</sup>	1,05 10 <sup>9</sup>	94,3
	87	1,963	1,90 10 <sup>9</sup>	4,40 10 <sup>10</sup>	5,23 10 <sup>9</sup>	89,2
<i>Lb. casei</i>	81	1,960	1,48 10 <sup>9</sup>	3,67 10 <sup>10</sup>	8,60 10 <sup>9</sup>	74,4
	72	2,007	6,88 10 <sup>9</sup>	2,02 10 <sup>10</sup>	7,45 10 <sup>8</sup>	96,3
	BL23	2,080	4,50 10 <sup>9</sup>	2,80 10 <sup>9</sup>	5,00 10 <sup>7</sup>	99,0
<i>Lb. paracasei</i>	90	1,980	2,50 10 <sup>9</sup>	3,75 10 <sup>10</sup>	1,85 10 <sup>9</sup>	96,1
<i>Lb. rhamnosus</i>	73	1,847	2,90 10 <sup>9</sup>	1,40 10 <sup>10</sup>	1,10 10 <sup>8</sup>	99,2
	77	2,003	3,50 10 <sup>9</sup>	3,80 10 <sup>10</sup>	6,15 10 <sup>9</sup>	89,4
	78	1,958	1,65 10 <sup>9</sup>	5,50 10 <sup>10</sup>	1,20 10 <sup>8</sup>	99,8
	75	2,030	5,60 10 <sup>9</sup>	1,21 10 <sup>10</sup>	1,73 10 <sup>9</sup>	85,5
<i>Lb. fermentum</i>	28	1,985	9,85 10 <sup>8</sup>	3,20 10 <sup>9</sup>	1,00 10 <sup>8</sup>	96,7
	46	2,005	1,13 10 <sup>9</sup>	1,35 10 <sup>10</sup>	1,00 10 <sup>7</sup>	99,9
<i>Lb. helveticus</i>	133	2,056	8,60 10 <sup>8</sup>	2,15 10 <sup>10</sup>	1,75 10 <sup>8</sup>	99,1
	138	1,949	5,65 10 <sup>8</sup>	2,22 10 <sup>10</sup>	1,10 10 <sup>9</sup>	95,5
	209	2,059	6,23 10 <sup>8</sup>	1,42 10 <sup>10</sup>	1,20 10 <sup>8</sup>	99,2
	3	2,112	6,40 10 <sup>8</sup>	1,15 10 <sup>10</sup>	1,15 10 <sup>9</sup>	90,0
<i>S. thermophilus</i>	1	1,604	2,85 10 <sup>8</sup>	1,10 10 <sup>10</sup>	8,70 10 <sup>8</sup>	92,4
	2	1,793	3,72 10 <sup>9</sup>	4,48 10 <sup>10</sup>	7,61 10 <sup>9</sup>	75,6

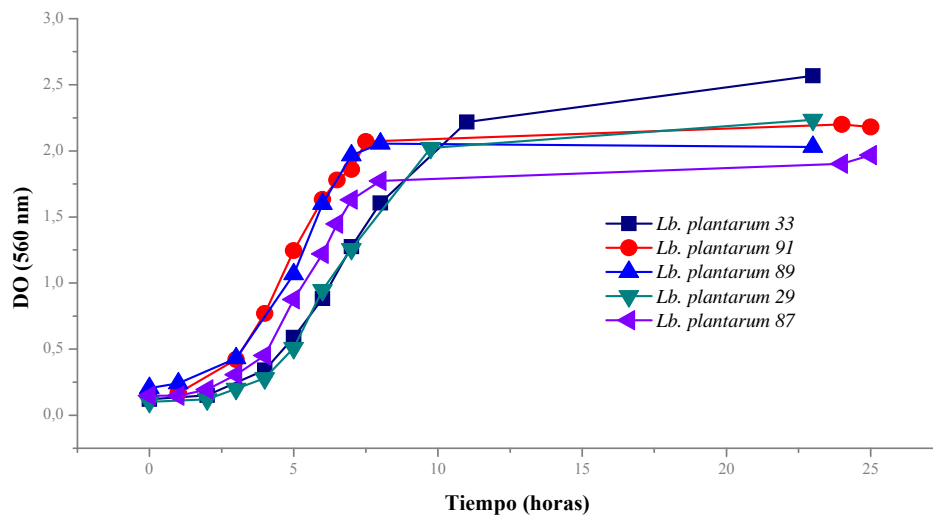
Todos los valores representan el promedio de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas.

<sup>a</sup> Densidad óptica al momento de la cosecha de los cultivos para la preparación del ELC.

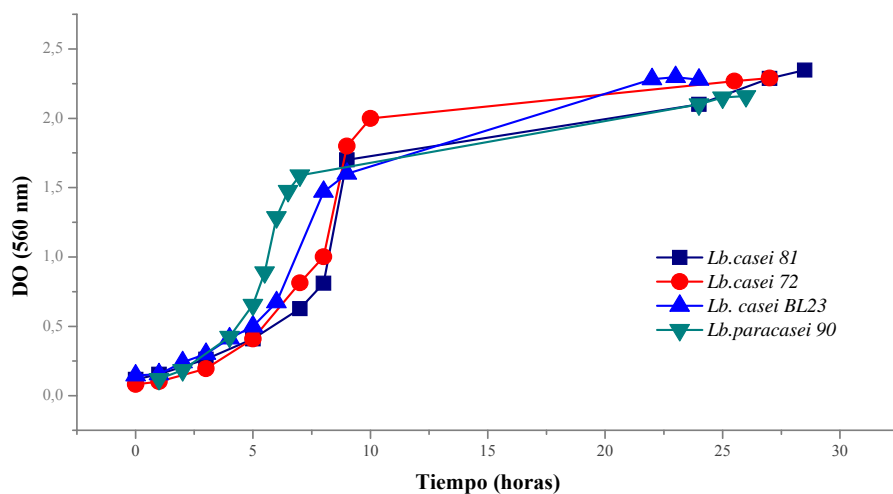
<sup>b</sup> Recuentos al momento de la cosecha de los cultivos para la preparación de los ELC.

<sup>c,d</sup> Recuentos de las suspensiones celulares en el buffer fosfato de potasio antes y después de la disrupción en el molino de perlas.

<sup>e</sup> Porcentaje de disrupción, calculado en base a los recuentos inicial y final.

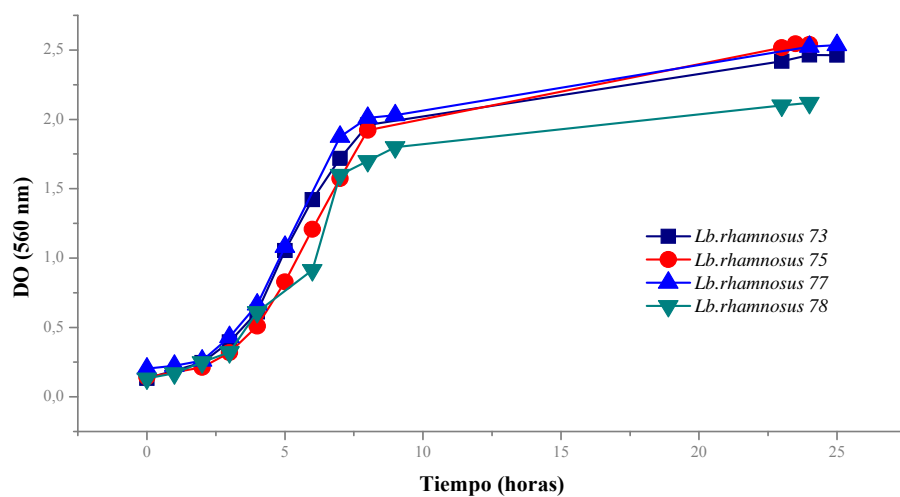


**Figura 1.4.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus plantarum*: 33, 91, 89, 29 y 87. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación.

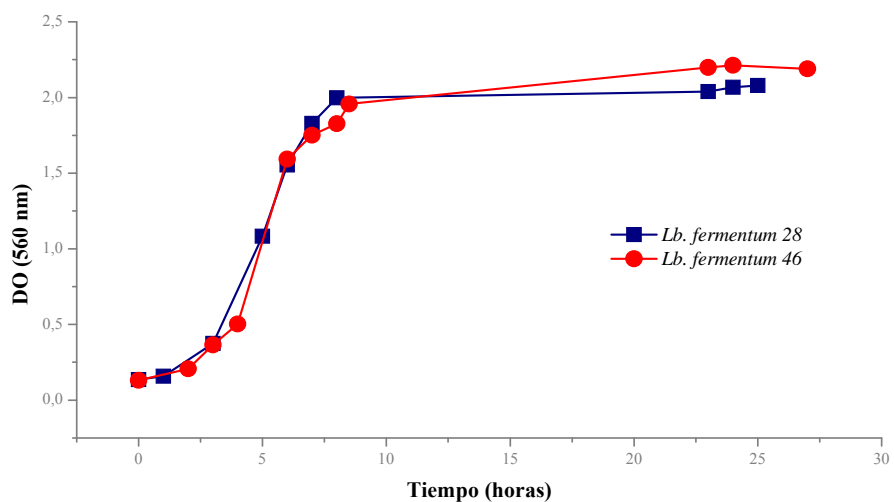


**Figura 1.5.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus casei*: 81, 72 y BL23 y *Lactobacillus paracasei* 90. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación.

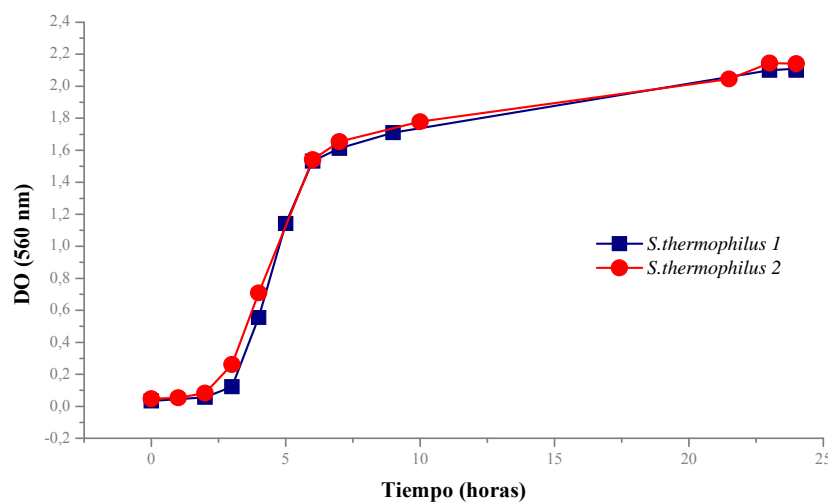




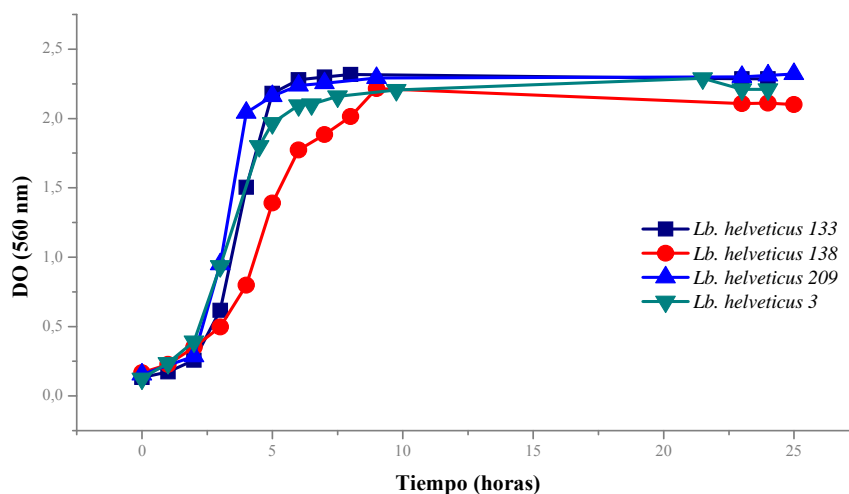
**Figura 1.6.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus rhamnosus*: 73, 77, 78 y 75. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación.



**Figura 1.7.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus fermentum*: 28 y 46. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación.



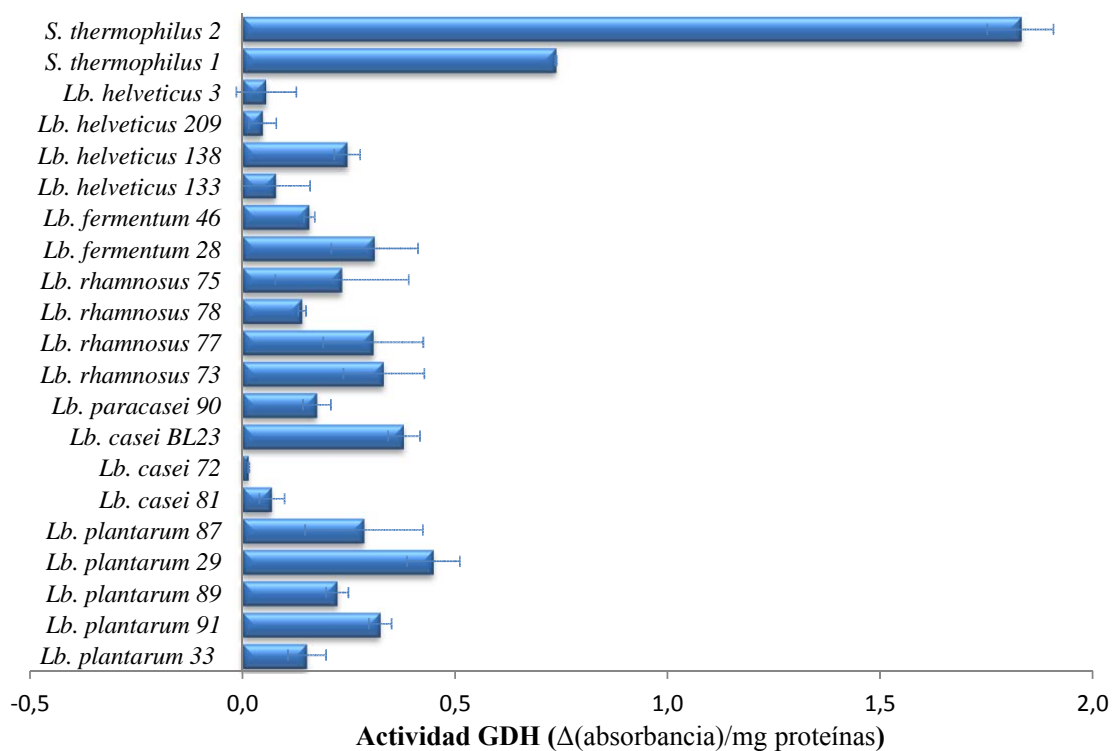
**Figura 1.8.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Streptococcus thermophilus*: 1 y 2. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación.



**Figura 1.9.** Curvas de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus helveticus*: 133, 138, 209 y 3. Los valores representan la densidad óptica medida a 560 nm en función de las horas de incubación.

### 3.3. Actividad Glutamato Dehidrogenasa

Diferentes niveles de actividad GDH NAD-dependiente fueron detectadas en las cepas estudiadas (**Figura 1.10**). Las dos cepas de *S. thermophilus*, sobre todo la St2, tuvieron niveles de actividad mucho mayores que el resto de las cepas. Los niveles de GDH para las otras cepas fueron menores y similares entre ellas, pero los valores más bajos fueron detectados en general en las cepas de las especies de *Lb. helveticus* y *Lb. casei*.



**Figura 1.10.** Actividad GDH en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios  $\pm$  desviación estándar de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas.

La enzima GDH cataliza la interconversión de  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamato, utilizando NAD o NADP como cofactor. En este sentido, ha sido reportado que la enzima anabólica usa la forma reducida del NADP como cofactor durante la formación de glutamato, mientras que el NAD es usado como cofactor por la enzima catabólica implicada en la degradación del glutamato y consecuente producción de  $\alpha$ -cetoglutarato (Williams y col., 2006). En el presente trabajo de tesis, se ha estudiado la actividad GDH NAD-dependiente, que fue encontrada en diferentes niveles en las cepas estudiadas. Los niveles fueron mucho mayores para las dos cepas de *S. thermophilus* en comparación con el resto de cepas. La actividad GDH NADP-dependiente fue detectada por Helinck y col. (2004) para cinco de seis cepas de *S. thermophilus* mientras que sólo una de ellas tuvo actividad GDH NAD-dependiente. Además, no detectaron actividad GDH en dos cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. helveticus*. La ocurrencia de actividad GDH, su nivel y el cofactor utilizado ha demostrado ser cepa dependiente en lactobacilos. En particular, en un grupo de lactobacilos de origen NSLAB, se ha demostrado una mayor frecuencia y actividad GDH para cepas de *Lb. plantarum* (Williams y col., 2006). Asimismo, Tanous y col. (2002) encontraron mayores niveles de actividad GDH NADP-dependiente para cepas de *Lb. plantarum* en comparación con cepas de *Lb. casei* y *Lactococcus* sp., pero ninguna de las cepas de lactobacilos estudiadas

mostró actividad GDH NAD-dependiente. De Angelis y col. (2010b) realizaron un screening de actividad GDH NADP-dependiente en 33 cepas de *Lactobacillus*, y también estudiaron la actividad en distintas condiciones de temperatura (entre 4-30 °C), pH (entre 5,5-7,0) y NaCl (entre 1,875-3,750 %). Estos investigadores observaron que la actividad GDH-NADP fue cepa dependiente y que en condiciones de temperaturas de 7 °C, si bien los niveles eran bajos, la GDH todavía mostraba actividad, en cambio a una menor temperatura: 4 °C, la enzima no fue activa. Entre las cepas de lactobacilos estudiadas en el presente trabajo de tesis se encontró, en general, mayores niveles de actividad GDH para las cepas de *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum*, mientras que los niveles para *Lb. fermentum*, *Lb. casei* y *Lb. helveticus* fueron menores. De Angelis y col. (2010b) también observaron los niveles más altos en *Lb. plantarum*, pero *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus* tenían niveles similares. Por otro lado, Fernández de Palencia y col. (2006) han encontrado que 1 de 7 cepas ensayadas de *Lb. casei* mostró actividad GDH únicamente NAD-dependiente y 3 de 22 cepas de *Lb. plantarum* mostraron actividad GDH únicamente NADP-dependiente. Hanniffy y col. (2009) encontraron principalmente actividad GDH NAD-dependiente en aislados de *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

### **3.4. Actividad Aminotransferasa**

Las actividades AspAT, ArAT, BcAT y la actividad hacia Met con el uso de  $\alpha$ -cetoglutarato como aceptor de grupo amino en las 21 cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* estudiadas se muestran en la **Tabla 1.7**. Asimismo, y para facilitar la visualización de datos se presentan los resultados en forma de gráficos de barras (**Figura 1.12** y **1.13**). La mayoría de las cepas presentó niveles de actividad AT hacia el Asp significativamente ( $P \leq 0,05$ ) mayores (3 a 6 veces) que hacia el resto de los aminoácidos estudiados. Las excepciones a esta situación fueron dos cepas de *Lb. helveticus* (209 y 3), y las cepas de *Lb. rhamnosus* 78 y *Lb. casei* 72, las cuales presentaron similares niveles de actividad AT hacia todos los aminoácidos estudiados. Asimismo, las otras dos cepas de *Lb. helveticus* (138 y 133), si bien mostraron diferencias significativas en los niveles de actividad hacia los distintos aminoácidos, las diferencias numéricas fueron muy bajas.

Se aplicó análisis de componentes principales (ACP) tomando como variables los niveles de actividad AT hacia los ocho aminoácidos ensayados para todas las cepas incluidas en el estudio. Se retuvieron dos componentes principales, que extrajeron 91,1 % de la variancia total. En la **Figura 1.11**, se presentan los gráficos de scores y loading del ACP; en el gráfico de scores, las elipses encierran las muestras agrupadas de acuerdo a un análisis de cluster jerárquico realizado sobre los valores de los scores para los dos primeros CPs. En el gráfico

## Capítulo 1

---

de scores se observa la agrupación de cepas de acuerdo a su perfil de actividad. En efecto, el análisis de cluster agrupó las cepas en tres conjuntos: **1-** tres cepas de *Lb. casei* (72, 81 y BL23), una de *S. thermophilus* (St2) y una de las réplicas de *Lb. rhamnosus* 73 se ubicaron juntas en el hemiplano positivo de CP1; estas cepas fueron caracterizadas por el mayor nivel de actividad para todas las ATs; **2-** tres cepas de *Lb. plantarum* (89, 33 y 91), y una de las dos réplicas de *Lb. rhamnosus* 75, de *Lb. paracasei* 90, de *Lb. plantarum* 87 y de *Lb. rhamnosus* 73, se separaron del resto en el semiplano positivo de CP2; estas cepas se caracterizaban por los niveles más elevados de actividad AspAT, pero valores menores para el resto de ATs; **3-** todas las cepas de *Lb. helveticus* (133, 138, 209 y 3), las dos cepas de *Lb. fermentum* (28 y 46), *Lb. rhamnosus* 78 y 77, *S. thermophilus* St 1, *Lb. plantarum* 29, y una de las réplicas de *Lb. plantarum* 87, de *Lb. paracasei* 90 y de *Lb. rhamnosus* 75 se ubicaron en general en el cuarto CP1 negativo-CP2 negativo; estas cepas mostraron los niveles más bajos de todas las ATs.

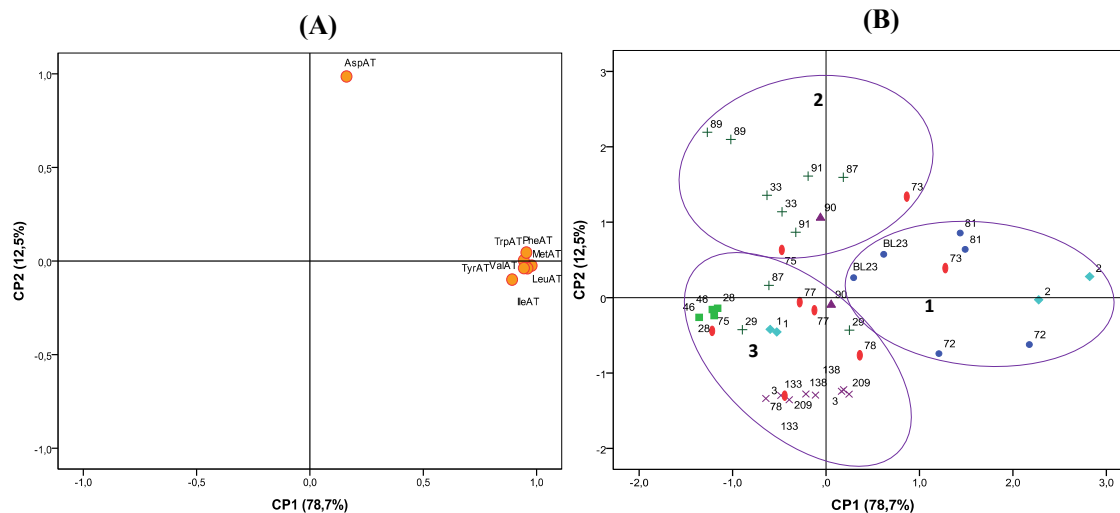
## Capítulo 1

**Tabla 1.7.** Actividad Aminotransferasa en los ELC de las cepas estudiadas hacia ocho aminoácidos. Los valores son los promedios de dos réplicas - duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas. La desviación estándar se presenta entre paréntesis.

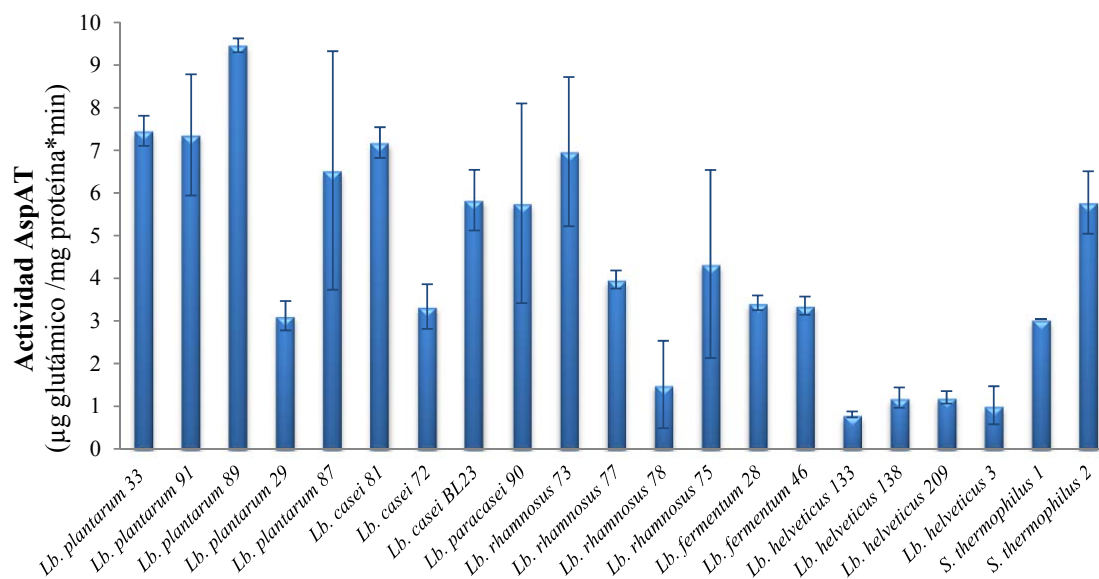
	AA ramificados				AA aromáticos			Met
	Asp	Leu	Val	Ile	Tyr	Trp	Phe	
<i>Lb. plantarum</i> 33*	7,46 <sup>a</sup> 0,35	0,81 <sup>b</sup> 0,11	0,84 <sup>b</sup> 0,11	0,69 <sup>b</sup> 0,06	0,74 <sup>b</sup> 0,05	0,80 <sup>b</sup> 0,05	0,85 <sup>b</sup> 0,11	0,79 <sup>b</sup> 0,17
<i>Lb. plantarum</i> 91*	7,36 <sup>a</sup> 1,42	0,78 <sup>b</sup> 0,04	1,08 <sup>b</sup> 0,07	0,30 <sup>b</sup> 0,07	1,36 <sup>b</sup> 0,07	1,25 <sup>b</sup> 0,07	1,25 <sup>b</sup> 0,07	1,17 <sup>b</sup> 0,07
<i>Lb. plantarum</i> 89*	9,46 <sup>a</sup> 0,16	0,19 <sup>b,c</sup> 0,01	0,08 <sup>c</sup> 0,06	0,02 <sup>c</sup> 0,01	0,69 <sup>b</sup> 0,42	0,49 <sup>b,c</sup> 0,21	0,54 <sup>b,c</sup> 0,36	0,05 <sup>c</sup> 0,01
<i>Lb. plantarum</i> 29	3,12 <sup>a</sup> 0,34	1,00 <sup>b</sup> 0,62	1,02 <sup>b</sup> 0,66	0,84 <sup>b</sup> 0,65	1,12 <sup>b</sup> 0,69	1,13 <sup>b</sup> 0,64	1,06 <sup>b</sup> 0,69	0,93 <sup>b</sup> 0,70
<i>Lb. plantarum</i> 87*	6,53 <sup>a</sup> 2,80	1,06 <sup>b</sup> 0,36	0,83 <sup>b</sup> 0,26	0,83 <sup>b</sup> 0,25	1,16 <sup>b</sup> 0,46	1,35 <sup>b</sup> 0,65	1,28 <sup>b</sup> 0,56	1,02 <sup>b</sup> 0,51
<i>Lb. casei</i> 81*	7,18 <sup>a</sup> 0,36	3,03 <sup>b,c</sup> 0,18	3,31 <sup>b</sup> 0,11	2,74 <sup>c,d</sup> 0,06	2,31 <sup>d,e</sup> 0,20	2,18 <sup>e</sup> 0,07	1,92 <sup>c</sup> 0,03	1,92 <sup>c</sup> 0,35
<i>Lb. casei</i> 72	3,34 0,52	2,61 0,45	2,96 0,67	2,73 0,61	3,02 0,52	2,90 0,56	2,58 0,56	2,07 0,55
<i>Lb. casei</i> BL23*	5,83 <sup>a</sup> 0,71	1,95 <sup>b</sup> 0,18	1,95 <sup>b</sup> 0,23	1,34 <sup>b</sup> 0,15	1,70 <sup>b</sup> 0,36	1,53 <sup>b</sup> 0,08	1,39 <sup>b</sup> 0,05	1,65 <sup>b</sup> 0,19
<i>Lb. paracasei</i> 90*	5,76 <sup>a</sup> 2,34	1,34 <sup>b</sup> 0,07	1,26 <sup>b</sup> 0,26	1,89 <sup>b</sup> 1,07	0,99 <sup>b</sup> 0,49	1,86 <sup>b</sup> 0,07	0,64 <sup>b</sup> 0,37	0,86 <sup>b</sup> 0,51
<i>Lb. rhamnosus</i> 73*	6,97 <sup>a</sup> 1,75	2,50 <sup>b</sup> 0,28	1,80 <sup>b</sup> 0,12	1,65 <sup>b</sup> 0,03	1,84 <sup>b</sup> 0,09	2,43 <sup>b</sup> 0,47	2,39 <sup>b</sup> 0,41	2,25 <sup>b</sup> 0,31
<i>Lb. rhamnosus</i> 77*	3,97 <sup>a</sup> 0,21	1,19 <sup>b,c</sup> 0,20	1,06 <sup>b,c</sup> 0,17	0,89 <sup>c</sup> 0,01	1,21 <sup>b,c</sup> 0,11	1,19 <sup>b,c</sup> 0,14	1,35 <sup>b</sup> 0,25	0,88 <sup>c</sup> 0,01
<i>Lb. rhamnosus</i> 78	1,51 1,03	1,26 0,52	0,96 0,23	0,85 0,10	1,17 0,66	1,62 0,75	1,70 0,98	1,19 0,04
<i>Lb. rhamnosus</i> 75*	4,33 <sup>a</sup> 2,21	0,53 <sup>b</sup> 0,32	0,57 <sup>b</sup> 0,51	0,55 <sup>b</sup> 0,40	0,53 <sup>b</sup> 0,60	0,60 <sup>b</sup> 0,43	0,62 <sup>b</sup> 0,43	0,61 <sup>b</sup> 0,26
<i>Lb. fermentum</i> 28*	3,42 <sup>a</sup> 0,17	0,32 <sup>b</sup> 0,10	0,30 <sup>b</sup> 0,01	0,24 <sup>b</sup> 0,03	0,38 <sup>b</sup> 0,01	0,35 <sup>b</sup> 0,04	0,34 <sup>b</sup> 0,01	0,24 <sup>b</sup> 0,02
<i>Lb. fermentum</i> 46*	3,36 <sup>a</sup> 0,21	0,23 <sup>b</sup> 0,14	0,21 <sup>b</sup> 0,11	0,23 <sup>b</sup> 0,01	0,21 <sup>b</sup> 0,16	0,21 <sup>b</sup> 0,13	0,23 <sup>b</sup> 0,04	0,21 <sup>b</sup> 0,01
<i>Lb. helveticus</i> 133*	0,81 <sup>b,c</sup> 0,07	1,11 <sup>a</sup> 0,03	0,99 <sup>a,b</sup> 0,03	0,97 <sup>b</sup> 0,07	0,89 <sup>b,c</sup> 0,05	0,87 <sup>b,c</sup> 0,04	0,92 <sup>b,c</sup> 0,07	0,86 <sup>b,c</sup> 0,07
<i>Lb. helveticus</i> 138*	1,20 <sup>a,b</sup> 0,24	1,29 <sup>a,b</sup> 0,15	1,12 <sup>a</sup> 0,09	1,29 <sup>a,b</sup> 0,29	1,77 <sup>b</sup> 0,39	1,23 <sup>a,b</sup> 0,24	1,25 <sup>a,b</sup> 0,28	1,16 <sup>a,b</sup> 0,22
<i>Lb. helveticus</i> 209	1,21 0,15	1,71 0,21	1,44 0,32	1,52 0,18	1,45 0,32	1,14 0,09	1,14 0,29	1,18 0,10
<i>Lb. helveticus</i> 3	1,02 0,45	0,99 0,38	1,06 0,41	1,17 0,54	1,37 0,51	1,04 0,48	0,98 0,44	1,14 0,51
<i>S. thermophilus</i> 1*	3,04 <sup>a</sup> 0,01	0,90 <sup>b</sup> 0,07	0,79 <sup>b</sup> 0,10	0,74 <sup>b</sup> 0,14	0,91 <sup>b</sup> 0,06	0,81 <sup>b</sup> 0,02	0,89 <sup>b</sup> 0,06	0,72 <sup>b</sup> 0,10
<i>S. thermophilus</i> 2*	5,78 <sup>a</sup> 0,73	4,37 <sup>b,c</sup> 0,41	2,90 <sup>d</sup> 0,33	2,53 <sup>d</sup> 0,07	4,70 <sup>b</sup> 0,66	3,00 <sup>d</sup> 0,07	3,40 <sup>c,d</sup> 0,50	3,03 <sup>d</sup> 0,48

\* Cepas que presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en los niveles de sus actividades ATs específicas.

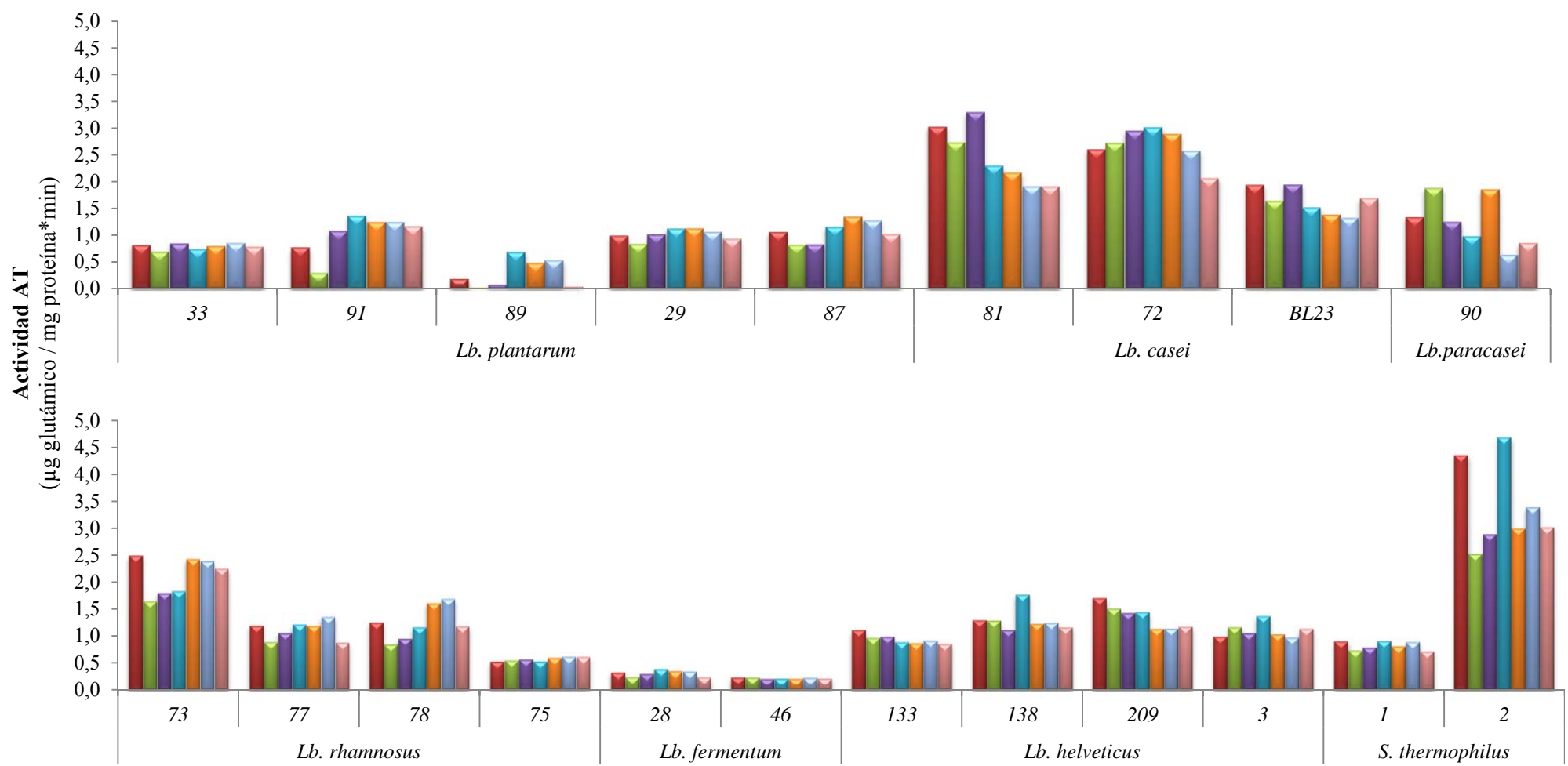
<sup>a,b,c,d,e</sup> Valores con diferente superíndice en una hilera presentan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 1.11.** Análisis de componentes principales de los niveles de actividad AT hacia ocho aminoácidos. A.- Gráfico de loading para CP1 vs. CP2. B- Gráfico de scores para CP1 vs. CP2. Las elipses encierran las muestras agrupadas de acuerdo al análisis de cluster jerárquico. Referencias: (●) *Lb. casei*, (■) *Lb. fermentum*, (×) *Lb. helveticus*, (▲) *Lb. paracasei*, (+) *Lb. plantarum*, (●) *Lb. rhamnosus*, (◆) *S. thermophilus*.



**Figura 1.12.** Actividad Aspartato Aminotransferasa (AspAT) en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios ( $\pm$  desviación estándar) de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas.



**Figura 1.13.** Actividad Aminotransferasa hacia los aminoácidos ramificados (Leu, Ile, Val), aromáticos (Tyr, Trp y Phe) y Met en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas. Referencias: actividad AT hacia Leu (■), Ile (■), Val (■), Tyr (■), Trp (■), Phe (■) y Met (■).



Por otro lado, también se cuantificó la actividad AT endógena en ensayos control en los cuales no se adicionó ningún aminoácido como sustrato en la reacción de determinación de la actividad AT. Todas las cepas mostraron actividad AT endógena, que se presentó en niveles muy bajos de alrededor 0,03 para *Lb. plantarum* 89 hasta niveles mayores a 2,0 para *S. thermophilus* 2 y *Lb. casei* 72 (**Tabla 1.8**).

**Tabla 1.8.** Actividad Aminotransferasa endógena en los ELC de las cepas estudiadas. Los valores son los promedios de los duplicados de ELC preparados en dos ocasiones separadas, y la desviación estándar (en gris).

Actividad Aminotransferasa Endógena ( $\mu\text{g}$ glutámico / mg proteína*min)			
<i>Lb. plantarum</i> 33	0,67 0,07	<i>Lb. rhamnosus</i> 78	0,84 0,17
<i>Lb. plantarum</i> 91	1,23 0,04	<i>Lb. rhamnosus</i> 75	0,45 0,33
<i>Lb. plantarum</i> 89	0,03 0,03	<i>Lb. fermentum</i> 28	0,29 0,01
<i>Lb. plantarum</i> 29	1,20 0,04	<i>Lb. fermentum</i> 46	0,20 0,01
<i>Lb. plantarum</i> 87	0,79 0,38	<i>Lb. helveticus</i> 133	0,83 0,08
<i>Lb. casei</i> 81	1,51 0,03	<i>Lb. helveticus</i> 138	1,27 0,27
<i>Lb. casei</i> 72	2,18 0,55	<i>Lb. helveticus</i> 209	1,11 0,14
<i>Lb. casei</i> BL23	0,93 0,17	<i>Lb. helveticus</i> 3	0,84 0,19
<i>Lb. paracasei</i> 90	1,13 0,04	<i>S. thermophilus</i> 1	0,60 0,09
<i>Lb. rhamnosus</i> 73	1,19 0,15	<i>S. thermophilus</i> 2	2,46 0,32
<i>Lb. rhamnosus</i> 77	0,82 0,05		

Los niveles y especificidad de actividad AT de BAL han demostrado ser altamente cepa y especie dependientes (Williams y col., 2001; Curtin y McSweeney, 2003; Thage y col., 2004b y 2005; Yvon, 2006). En general, altos niveles de actividad AspAT han sido encontrados en cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum*, mientras que altos niveles de actividad ArAT y BcAT han sido verificados en cepas de *Lactococcus lactis* y *Lb. helveticus*, respectivamente (Kieronczyk y col., 2004; Thage y col., 2004b; Jensen y Ardö, 2010). Una variabilidad similar a la observada en el presente trabajo de tesis en los niveles de actividad AT entre las distintas

especies así como entre las distintas cepas fue detectada por Thage y col. (2004b). Estos investigadores estudiaron diez cepas: cinco de *Lb. helveticus*, tres de *Lb. paracasei* y dos de *Lb. danicus*.

Los altos valores de AspAT detectados para la mayoría de las cepas estudiadas indican que las mismas podrían tener una aplicación potencial como fermentos adjuntos para la producción de diacetilo y acetoína en productos lácteos fermentados, ya que estos compuestos pueden provenir de la transaminación del Asp (Le Bars y Yvon, 2008).

Los niveles de ATs hacia Asp, Ile, Leu y Val en la cepa estudiada de *Lb. paracasei* 90 fueron similares a los reportados por Kieronczyk y col. (2004) en dos cepas de *Lb. paracasei* (INF15D y 1244), mientras que los niveles de AT hacia Phe fueron inferiores a los reportados por dichos autores. Por otro lado, Smit y col. (2004b) estudiaron la actividad AT hacia Leu en varias cepas de BAL, y encontraron los mayores valores para las cepas de *Lactococcus*, seguidas de *S. thermophilus* y *Lb. acidophilus*, mientras que menores valores fueron encontrados para otras BAL como *Lb. casei* y *Lb. helveticus* y cepas de *Propionibacterium*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*. En la presente tesis, los mayores valores de AT hacia Leu fueron encontrados para una de las cepas de *S. thermophilus* seguida de las cepas de *Lb. casei*, mientras que los menores niveles fueron detectados en general para las cepas de *Lb. fermentum*.

Por otro lado, Jensen y Ardö (2010) estudiaron los niveles de actividad AT hacia trece AA en seis cepas de *Lb. helveticus*, y detectaron que todas las cepas mostraron los mayores valores hacia los AA aromáticos seguidos por los AA ramificados, mientras que no se detectó actividad o muy bajos valores fueron observados hacia el Asp. Nuestros resultados son diferentes a los obtenidos por estos autores, ya que las cuatro cepas de *Lb. helveticus* que se estudiaron en la presente tesis mostraron en general similares niveles de actividad hacia todos los AA estudiados (aromáticos, ramificados, Asp y Met).

Pedersen y col. (2013), quienes estudiaron la influencia del medio de crecimiento en la actividad aminotransferasa en distintas especies de BAL, también observaron los mayores niveles de AT hacia Asp respecto a los otros aminoácidos en dos cepas de *Leuconostoc cremoris* (T26, T12), y en cuatro cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1159, PS1 PS12 y 2209), independientemente del medio en que se cultivara las células. Sin embargo, estos autores detectaron diferencias en el perfil de AT de dos cepas de *Lb. danicus* (13M1 y 9M3) de acuerdo al medio de crecimiento, ya que cuando fueron crecidas en MRS, los niveles más altos fueron hacia Phe, Tyr y Trp, mientras que cuando se utilizó un medio de cultivo

químicamente definido para su crecimiento, las dos cepas mostraron los mayores niveles de AT hacia el Asp y el Trp.

La actividad AT hacia la Met, importante en la producción de compuestos volátiles tales como dimetil-disulfuro, dimetil-trisulfuro, metanotial y metanotiol (Marilley y Casey, 2004), mostró los valores más altos ( $\geq 1,72$ ) en la cepa *S. thermophilus* 2, en las tres cepas de *Lb. casei* y la cepa *Lb. rhamnosus* 73, y los valores más bajos ( $< 0,25$ ) fueron detectados en las dos cepas de *Lb. fermentum* estudiadas, mientras que para el resto de las cepas los valores de esta actividad fueron intermedios. En un estudio llevado a cabo por Hanniffy y col. (2009) en cuanto a la actividad AT hacia la Met, se informaron altos niveles de esta actividad en todas las cepas de *Lactococcus* estudiadas, mientras que niveles variables y menores fueron encontrados en cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum*, aunque dos cepas de estas especies, y una de *Lb. fermentum* no mostraron actividad. Por otro lado, otros investigadores también detectaron ciertos niveles de actividad AT hacia la Met en *Lb. casei* y *Lb. plantarum* (Amárta y col., 2001), en cepas de *Lactococcus* (Gao y col., 1998), y en otras bacterias como *Brevibacterium linens*, *Micrococcus luteus* y *Corynebacterium* (Bonnarme y col., 2000). Debido a que al día de la fecha no se ha aislado e identificado una enzima AT con actividad específica sobre la Met (Martínez-Cuesta y col., 2013), todos los informes e inclusive nuestros resultados de transaminación sobre la Met probablemente se deban a la actividad no específica de una enzima ArAT o BcAT, las cuales han demostrado solapamientos en su actividad hacia dichos aminoácidos y la Met (Yvon y col., 1997).

En el presente trabajo de tesis, se ha detectado actividad AT endógena para las 21 cepas ensayadas. Para algunas de las cepas, tales como *Lb. plantarum* 29 y 91, *Lb. fermentum* 28 y 46 y *Lb. helveticus* 138, los niveles de actividad AT endógena fueron similares a los niveles de AT específicas, con excepción de la actividad AT hacia Asp para las cepas 29, 91, 28 y 46 y hacia Tyr para la cepa 138, que fueron mayores que la actividad endógena. Una actividad AT endógena elevada ha sido relacionada a una alta disponibilidad de glutamato en el pool intracelular de AA o a la transaminación no específica de AA presentes en los ELC. En particular, Williams y col. (2001) han detectado esta actividad para el 60 % de un total de 29 cepas de lactobacilos mesófilos y lactococos estudiadas. Además, los niveles de esta actividad fueron similares a los encontrados para AT hacia Met y ArAT en aproximadamente el 30 % de las cepas ensayadas (Williams y col., 2001).

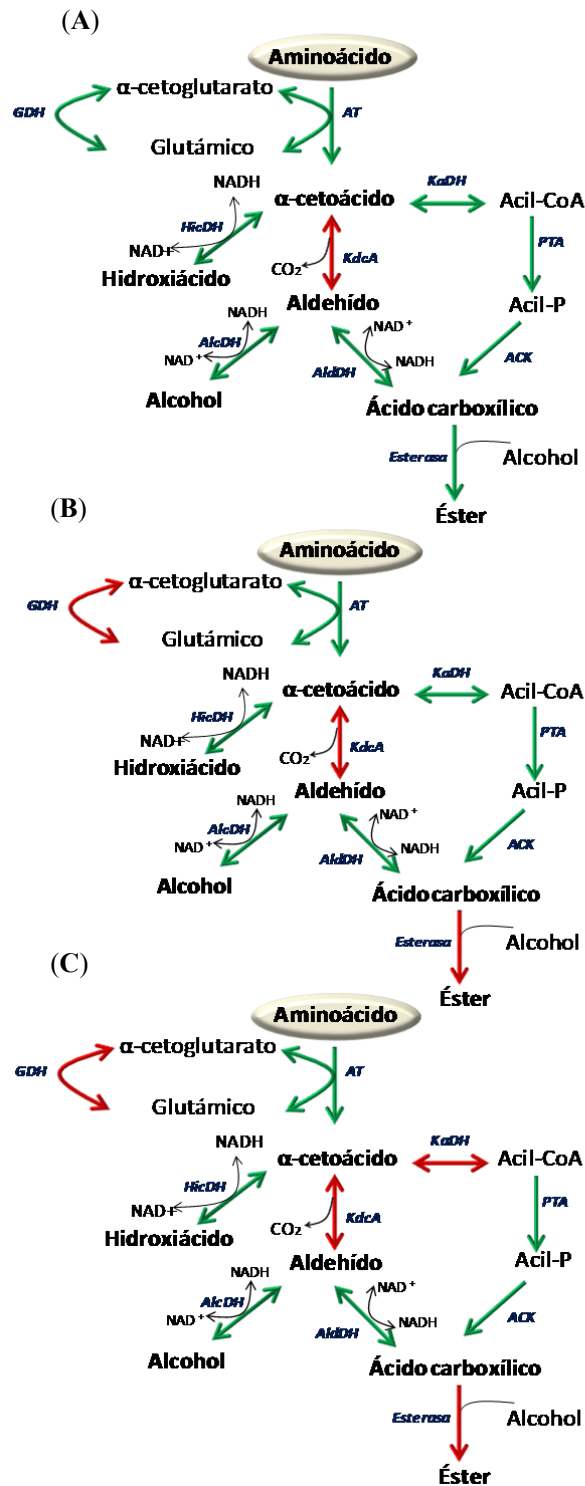
La etapa de transaminación es considerada una de las etapas limitantes más importantes del catabolismo de aminoácidos y la subsiguiente producción de compuestos de aroma en quesos. En particular, la presencia de actividad AT en cultivos primarios y adjuntos, así como

la disponibilidad de un aceptor de grupo amino adecuado, tal como el  $\alpha$ -cetoglutarato, esencial en el primer paso de la transaminación, son muy importantes en la bioformación de flavour en quesos (Tanous y col., 2002; Yvon, 2006). En este sentido, se ha demostrado que la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato a la leche de elaboración de queso Cheddar aumentó el catabolismo de los aminoácidos por parte de cepas de *Lactococcus lactis* (Yvon y col., 1998). Asimismo, se ha detectado que la habilidad de BAL para producir compuestos de aroma está muy correlacionada con su actividad GDH, debido a la producción *in situ* del aceptor de grupo amino necesario para la transaminación (Tanous y col., 2002). Por otro lado, se ha indicado que puede existir una competencia entre las ATs por el  $\alpha$ -cetoglutarato producido por la actividad GDH. En efecto, el perfil de actividades ATs de cultivos adjuntos ha demostrado tener un impacto evidente sobre los compuestos volátiles producidos en quesos (Kieronczyk y col., 2003; Smit y col., 2005). De esta manera, la detección de cepas de cultivos primarios y adjuntos con alta actividad GDH y ATs específicas es de gran importancia con el objetivo de realizar una selección de cepas para su uso como productoras de flavour en quesos. En el presente trabajo, las actividades enzimáticas fueron determinadas luego del crecimiento de cada cepa en condiciones óptimas y también la determinación analítica fue realizada en condiciones favorables para la actividad enzimática. Sin embargo, es importante considerar que la expresión de una enzima específica puede variar en gran extensión de acuerdo a las condiciones de crecimiento (Jensen y Ardö, 2010) y que la actividad enzimática también depende de las condiciones ambientales (De Angelis y col., 2010a,b).

Es importante tener en cuenta que las enzimas AT y GDH son fundamentales para la concreción de la primera etapa de la reacción de transaminación, pero en los pasos subsiguientes hay otras enzimas implicadas, cuya presencia en cultivos primarios y adjuntos también es importante (Smit y col., 2004b; Yvon, 2006). En este sentido, es de destacar el rol negativo de la hidroxilácido dehidrogenasa en la formación de compuestos de flavour, ya que desvía los  $\alpha$ -cetoácidos producidos hacia compuestos de poca relevancia como son los hidroxilácidos (Yvon y Rijnen, 2001; Gómez de Cadiñanos y col., 2013). Por otro lado, la enzima  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa cumple un rol favorable ya que participa en la conversión de los  $\alpha$ -cetoácidos en aldehídos, los cuales tienen un gran impacto en el flavour del producto (Smit y col., 2004b; Yvon, 2006). De esta manera, la caracterización de las actividades enzimáticas mencionadas, entre otras, constituyen acciones necesarias para un mejor conocimiento de los fermentos lácticos y su aplicación en quesería.

**3.5. Análisis bioinformático**

La comparación genómica de las enzimas que intervienen en el catabolismo de los aminoácidos por las BAL incluidas en el presente estudio se resume en la **Figura 1.14**, en la cual se indica la presencia o ausencia de cada gen dentro de una especie. Además en la **Tabla 1.9**, se encuentra detallada la cantidad de genes para cada enzima presentes en cada cepa. Este estudio se basó principalmente en el trabajo de Liu y col. (2008), quienes describieron esta metodología para otras BAL.



**Figura 1.14.** La figura representa los genes hallados mediante búsqueda bioinformática en las especies de: *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *S. thermophilus* (A), *Lb. fermentum* (B) y *Lb. helveticus* (C). Las flechas verdes ( $\rightarrow$ ) indican que se encontró al menos un gen de la enzima correspondiente en alguna de las cepas dentro de la especie. Las flechas rojas ( $\rightarrow$ ) indican que no se halló el gen correspondiente a la enzima en ninguna de las cepas dentro de la especie estudiada.

## Capítulo 1

---

El gen que codifica la enzima GDH fue encontrado en todas las cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* y *S. thermophilus*, y en todas las cepas de *Lb. casei*, excepto en la *Lb. casei* ATCC 334. Diferentes niveles de actividad GDH han sido reportados en algunas de las cepas que se incluyeron en este estudio. En esta tesis se pudo confirmar la actividad GDH-NAD dependiente (EC: 1.4.1.2) en la cepa *Lb. casei* BL23 que confirmaría la posible expresión del gen “gdh”, que se encuentra en la base de datos de GenBank del NCBI, en la proteína (YP\_001986677.1). Helinck y col. (2004) observaron alta actividad GDH-NAD dependiente (EC: 1.4.1.2) y GDH-NADP dependiente (EC: 1.4.1.4) en *S. thermophilus* CNRZ1066, que confirmaría la expresión del gen para la proteína gdh (YP\_140846.1), pero no observaron actividad en *S. thermophilus* LMG 18311, por lo que el gen que se encuentra en la base de datos GenBank no fue expresado en la proteína (YP\_138959) en las condiciones de análisis estudiadas.

Debido a la ausencia del gen que codifica a la enzima GDH en las bases de datos para las cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus helveticus* incluidas en el estudio, no se esperaría encontrar actividad GDH en cepas de estas especies. Sin embargo, como se puede observar en los resultados presentados anteriormente, se detectó actividad para las dos cepas de *Lb. fermentum* (28 y 46) y las cuatro cepas de *Lb. helveticus* (209, 138, 133 y 3) estudiadas, aunque los niveles fueron los más bajos entre todas las cepas analizadas. Asimismo, en otros estudios se ha reportado actividad GDH en cepas de *Lb. fermentum* (Misono y col., 1985; Morishita y Yajima, 1995) y en *Lb. helveticus* (Ruyssen, 2012). Estos resultados podrían ser consecuencia de la variabilidad en la capacidad enzimática entre las cepas. Por otro lado, en diversos trabajos de investigación se ha detectado actividad GDH en cepas de especies de BAL incluidas en el análisis bioinformático realizado: *Lb. casei* y *Lb. plantarum* (Tanous y col., 2002; Kieronczyk y col., 2003; Fernández de Palencia y col., 2006; De Angelis y col., 2010a,b; Ruyssen, 2012), *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* (Kieronczyk y col., 2003; De Angelis y col., 2010a,b; Ruyssen, 2012) y *S. thermophilus* (Helinck y col., 2004).

El gen que codifica a la AT de AA ramificados (EC: 2.6.1.42) fue hallado en todas las cepas de las especies estudiadas, en las cuales se encontró un gen por cepa, con la excepción de las dos cepas de *Lb. fermentum* en las que se verificó la presencia de dos genes para cada una. En el apartado anterior, la actividad enzimática BcAT fue detectada y cuantificada en *Lb. casei* BL23, lo que estaría confirmando la posible expresión del gen encontrado en las bases de datos. En diversos estudios de investigación publicados se ha reportado actividad AT hacia aminoácidos ramificados en cepas del género *Lactobacillus* sp. *Lb. helveticus* (Gummalla y

Broadbent, 2001; Klein y col., 2001), *Lb. plantarum* (Groot y de Bont, 1998; Amárta y col., 2001), *Lb. paracasei* (Hansen y col., 2001; Thage y col., 2004b), *Lb. casei* y *Lb. plantarum* (Gummalla y Broadbent, 2001; Fernández de Palencia y col., 2006).

El gen que codifica las AT del grupo de los AA aromáticos (EC: 2.6.1.57) se halló en todas las cepas estudiadas, detectándose para el mismo mayor cantidad de genes por cepa en comparación a las otras enzimas analizadas en el presente estudio. En *Lb. sakei* k23, no se encontró el gen que codifica a las AT de AA aromáticos (Liu y col., 2008) pero, sin embargo, la actividad y la formación de metabolitos derivados de estos aminoácidos ha sido reportada en otros trabajos (Larroure y col., 2000; Sinz y Schwab, 2012), lo que puede ser debido a otras AT con solapamientos en sus actividades.

La presencia de los genes de las AT de AA aromáticos y ramificados, así como la caracterización de dichas enzimas ha sido reportada por varios grupos de investigación en diferentes BAL (Yvon y col., 1997, 2000; Gao y Steel, 1998; Rijnen y col., 1999; Atilés y col., 2000; Engels y col., 2000).

La presencia del gen que codifica a la proteína con actividad aspartato AT, también fue verificada en todas las cepas, con la excepción de dos cepas de *Lb. rhamnosus*. Las enzimas AspAT y ArAT tienen una similitud muy grande, lo que justificaría una actividad cruzada entre ellas (Yvon, 2006). La actividad de las enzimas AspAT y ArAT fueron cuantificadas en el presente trabajo de tesis en la cepa de *Lb. casei* BL23, lo que confirmaría la expresión del gen encontrado.

El gen que codifica a la  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa (EC: 4.1.1.72) no se encontró en ninguna de las cepas estudiadas en este análisis. Sin embargo, la presencia de este gen ha sido reportada en *L. lactis* (de la Plaza y col., 2004; Smit y col., 2005). Asimismo, actividad  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa fue informada en cepas de esta especie (Amárta y col., 2001; Ayad y col., 2001; Hanniffy y col., 2009), así como en cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* (Hanniffy y col., 2009).

En el análisis bioinformático realizado por Liu y col. (2008) también se informó la ausencia del gen que codifica a la enzima  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa en un gran número de cepas y especies de *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. sakei*, *Lb. salivarius*).

El gen que codifica a las D-hidroxiácido dehidrogenasas (EC: 1.1.1.-) fue encontrado en todas las cepas incluidas en el presente estudio, mientras que el gen que codifica a las L-hidroxiácido dehidrogenasas fue hallado en todas las cepas, excepto en las de *S. thermophilus*.



Genes que codifican a enzimas hidroxiaácido dehidrogenasas fueron encontrados y caracterizados en *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Bernard y col., 1994, 1997) y *Lb. casei* (Lerch y col., 1989). Asimismo, enzimas hidroxiaácido dehidrogenasas han sido caracterizadas en diversas BAL (Garvie, 1980; Schütte y col., 1984; Hummel y col., 1985). La actividad hacia el  $\alpha$ -cetoácido derivado de la fenilalanina (fenilpiruvato), fue detectada en *Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. leichmannii* y *Lb. salivarius* (Hummel y Kula., 1989). Gummalla y Broadbent (2001) reportaron que la actividad hidroxiaácido dehidrogenasa hacia los  $\alpha$ -cetoácidos derivados de la Phe y Tyr fue seis veces menor en *Lb. helveticus* que para *Lb. casei*. Más recientemente, Kananen y Ardö (2011) estudiaron la actividad hidroxiaácido dehidrogenasa de los  $\alpha$ -cetoácidos correspondientes a ocho aminoácidos (Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Asp, Met y Thr) en ocho cepas de *Lb. helveticus*. Dentro de los resultados más relevantes, ellos reportaron que los mayores niveles de actividad fueron hacia el oxaloacetato y el  $\alpha$ -cetobutirato,  $\alpha$ -cetoácidos derivados de Asp y Met, respectivamente. También se detectaron niveles elevados de actividad hacia los  $\alpha$ -cetoácidos derivados de AA aromáticos, sobre todo hacia el fenilpiruvato derivado de la Phe, mientras que la menor actividad fue observada hacia los  $\alpha$ -cetoácidos de los AA ramificados. Debido a que las enzimas hidroxiaácido dehidrogenasa catalizan el metabolismo de  $\alpha$ -cetoácidos a hidroxiaácidos, compuestos que no tienen implicancia en el flavor, los resultados obtenidos sugieren que una mayor producción de compuestos volátiles podría darse en las cepas de *Lb. helveticus* estudiadas a partir de los AA ramificados, hacia los cuales se encontraron los menores niveles de actividad de esta enzima.

El gen que codifica la enzima alcohol dehidrogenasa (EC: 1.1.1.1) fue encontrado en todas las cepas estudiadas con la excepción de las tres cepas de *Lb. helveticus* y una de las cepas de *S. thermophilus*. La actividad de esta enzima ha sido reportada en diversas BAL tales como *S. thermophilus* (Chaves y col., 2002), *Lb. delbrueckii* (Osborne y col., 2000) *Lb. kefir* y *Lb. brevis* (Riebel y Hummel 2001) y *Lb. acidophilus* (Hassan y Frank, 2001).

Los genes del complejo  $\alpha$ -cetoácido dehidrogenasa, se hallaron en todas las cepas estudiadas, con la excepción de las cepas de *Lb. helveticus*. Los genes que codifican a la fosfato butiltransferasa y a las fosfotransferasas con un grupo carboxilo como aceptor, fueron encontrados en todas las cepas sin ninguna excepción.

En este estudio, la presencia del gen que codifica a la esterasa se detectó en todas las cepas de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *S. thermophilus*, *Lb. paracasei* y en una de las tres cepas de *Lb. rhamnosus*, mientras que, en cambio, no fue encontrado en ninguna de las cepas de *Lb. helveticus* y *Lb. fermentum*. Yebra y col. (2004) reportaron un gen de esterasa en el proyecto

## Capítulo 1

---

de genoma de *Lb. casei* BL23 (cepa incluida en el análisis), cabe aclarar que actualmente se encuentra publicado el genoma completo de esta cepa. Asimismo, existen reportes de actividad esterasa en otras cepas no incluidas en este estudio como *S. thermophilus* (Liu y col., 2001; 2004), *Lb. casei* subsp. *casei* IFPL731 (Castillo y col., 1999), *Lb. casei* LILA (Fenster y col., 2003), *Lb. casei* CL96 (Choi y col., 2004), *L. lactis* subsp. *cremoris* B1079 (Liu y col., 2004), e inclusive en las cepas *Lb. helveticus* CNRZ32 y *Lb. fermentum* DT41, cepas pertenecientes a especies en el que no se halló el gen por el análisis bioinformático realizado (Gobbetti y col., 1997; Fenster y col., 2000). En particular, para la cepa de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 se reportó actividad esterasa (Khalid y col., 1990) y se aisló y caracterizó el gen estA (Fenster y col., 2000). Además, El Soda y col. (1986) informaron la presencia de varias estererasas en cepas de lactobacilos termófilos.

**Tabla 1.9.** Número de genes que codifican las enzimas involucradas en la ruta de transaminación del catabolismo de aminoácidos en los genomas de bacterias lácticas disponibles en la base de datos del NCBI

	<i>Lb. casei</i>						<i>Lb. plantarum</i>				<i>Lb. rhamnosus</i>				<i>S. thermophilus</i>						<i>Lb. fermentum</i>		<i>Lb. helveticus</i>			<i>Lb. paracasei</i>	
	Lc i	Lc ii	Lc iii	Lc iv	Lc v	Lc vi	Lp i	Lp ii	Lp iii	Lp iv	Lr i	Lr ii	Lr iii	Lr iv	St i	St ii	St iii	St iv	St v	St vi	Lf i	Lf ii	Lh i	Lh ii	Lh iii	Lpc i	Lpc ii
GDH	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
Bc AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1
Ara AT- (Ara AT/Asp AT)	6	3	6	3	3	6	7	7	5	6	6	6	9	7	5	3	5	5	3	4	6	8	3	2	2	1	4
Asp AT	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	0	1	0	1	2	2	1	1	1	2	3	2	2	1	2	3	1
KdcA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AldDH	2	6	4	2	2	4	3	0	3	7	4	3	1	3	3	2	3	0	1	1	5	8	0	0	0	1	2
AldDH/ Bifunctional AldDH-AldDH	4	2	1	2	3	1	2	2	2	2	1	2	2	2	3	1	3	0	0	0	1	1	2	1	1	2	3
KaDH	E1 alpha sub.	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	2
	E2 beta sub.	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	2
	E2 sub.	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	2
	E3 sub.	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	3	4
PTA	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
Ack	2	2	2	2	3	2	3	3	3	3	2	2	2	4	1	1	1	1	1	1	1	1	5	2	5	2	2
D-HicDH	2	2	2	3	3	4	2	3	2	2	4	5	3	3	0	0	0	0	0	0	3	3	4	1	2	2	2
L-HicDH	3	5	4	3	3	4	6	5	5	4	3	3	3	3	2	2	2	2	1	1	5	5	3	3	3	4	3
EstA	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	0	0	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1

GDH: glutamato dehidrogenasa; Bc AT: aminotransferasas de aminoácidos ramificados; Ara AT- (Ara AT/Asp AT): aminotransferasas de aminoácidos aromáticos; Asp AT: aminotransferasa específica del Asp; KdcA: cetoácido decarboxilasa; AldDH/ Bifunctional AldDH-AldDH: aldehído-alcohol dehidrogenasa (enzima bifuncional); KaDH: complejo cetoácido dehidrogenasa; PTA: fosfato butiltransferasa; Ack: fosfotransferasas con un grupo carboxilo como aceptor, D-HicDH:D-hidroxiácido dehidrogenasa; L-HicDH:D-hidroxiácido dehidrogenasa; EstA: esterasa A

#### **4. Conclusiones**

En el análisis bioinformático realizado, se observó que las cepas cuya información se encuentra disponible y se analizó, tanto del género *Lactobacillus* como de la especie *Streptococcus thermophilus*, tienen en general los genes necesarios para formar compuestos aromáticos a partir del catabolismo de los aminoácidos. Si bien el gen que codifica a la enzima  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa no se encontró en las cepas estudiadas, existen informes previos de esta actividad en otras cepas de *Lactobacillus*. Hay que destacar que en el caso de que una cepa no tenga la actividad  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa, es muy probable que el catabolismo de los aminoácidos no se detenga en el  $\alpha$ -cetoácido formado por la reacción inicial de las aminotransferasas, debido a que las enzimas necesarias para llevar a cabo la decarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos, es decir la formación de Acil-CoA, aparecen como altamente conservadas en los géneros *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp., con la excepción de las cepas de la especie *Lb. helveticus*, en las que no se encontró el gen. El estudio bioinformático es una herramienta interesante para su aplicación en las primeras etapas de un estudio de selección de cepas para uso en quesería destinadas a un fin específico, en este caso evaluar su participación en el catabolismo de aminoácidos, ya que da una visión general de las características genómicas dentro de una especie. Sin embargo, es importante recordar que existe una gran variabilidad entre cepas de la misma especie en cuanto a sus capacidades enzimáticas. Asimismo, hay que tener en cuenta que este estudio debe ir acompañado de las determinaciones analíticas de las actividades enzimáticas de interés, ya que la presencia del gen no asegura su expresión en las condiciones de crecimiento y aplicación de la cepa en particular.

Las cepas de lactobacilos mesófilos estudiadas demostraron capacidades enzimáticas (GDH y ATs) de gran interés para su uso como cultivos adjuntos en queso, que variaron de una cepa a otra. Esta diversidad permitirá seleccionar fermentos adjuntos en vistas al incremento de determinados compuestos de aroma. Asimismo, la detección de actividades enzimáticas clave en cepas de bacterias comúnmente utilizadas como fermentos primarios, tales como *Lb. helveticus* y *S. thermophilus*, permitirá realizar una selección de las mismas para cumplir con otros objetivos más allá de su rol fundamental en la acidificación de la matriz láctea, como lo es su participación en la bioformación de flavour en quesos.

## Capítulo 2

*“Comparación de métodos de lisis y permeabilización sobre dos cepas de *Streptococcus thermophilus*”*

## 1. Introducción

Los métodos de lisis y permeabilización revisten gran importancia en los estudios metabólicos de BAL, ya que permiten poner en evidencia las actividades enzimáticas intracelulares y los metabolitos producidos por los fermentos. Asimismo, los cultivos desafiados mediante estas metodologías a menudo se han propuesto como biocatalizadores viables e incluso no viables.

La variedad de métodos de atenuación disponibles actualmente es muy amplia, y el principio en el que se basan puede ser de distinta índole (físico, químico, enzimático, genético, etc.), pero todos tienen en común el objetivo de generar un daño en la pared y/o membrana celular (Chisti y Moo-Young, 1986; Klein y Lortal, 1999; Geciova y col., 2002).

Las diferentes composiciones de las envolturas celulares (paredes y/o membranas), hacen que la efectividad de un método de atenuación en particular sea mejor para algunos microorganismos que para otros. Las bacterias Gram-negativas (tales como *Prevotella*, *Porphyromona* y *Selenomonas*, entre otros géneros) presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas, como aquellas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Rothia*, *Arachnia*, *Micromonas* y *Pseudoramibacterium*, presentan sólo una membrana lipídica, y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa (Geciova y col., 2002; Mukhopadhyay, 2012). Esta gruesa capa de peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas les confiere una mayor resistencia (Piuri y col., 2005). Estas particularidades de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas sólo pone en relieve una de las mayores diferencias, pero el estudio de la atenuación es mucho más específico ya que se han hallado resultados distintos por especie, género, e incluso entre una cepa y otra.

La utilización de fermentos lácticos autolíticos o que han sido atenuados mediante distintas metodologías constituye una de las principales estrategias empleadas para aumentar el aroma en queso, ya que estos métodos producen la liberación de enzimas intracelulares al medio o incrementan la permeabilidad de la membrana facilitando el contacto de sustratos y enzimas. La mayoría de los estudios de atenuación y sus posibles aplicaciones fueron realizados sobre la especie *Lactococcus lactis* (O'Reilly y col., 2002; Hannon y col., 2003; Martínez-Cuesta y col., 2002; 2003; Bourdat-Deschamps y col., 2004; Sheehan y col., 2005; Upadhyay y col., 2007; Doolan y Wilkinson, 2009; Daryaei y col., 2010; Beebyaanda y col., 2013), debido a que es la bacteria más usada en el mundo como cultivo iniciador en la

elaboración de quesos. En cambio, la información disponible sobre la autólisis y atenuación en *S. thermophilus* es mucho más limitada (Somkuti y Steinberg, 1994; 1995; Husson-Kao y col., 1999; 2000; Smith y col., 2003), e incluso se ha abordado no ya como un medio para aumentar el aroma en queso, sino con otros fines como el de mejorar problemáticas de la salud, como lo es la intolerancia a la lactosa (Somkuti y Steinberg, 1995; Somkuti y col., 1996; 1998), la mejora del sueño (Krueger y col., 2002), o reducir el riesgo de formación de carcinogénicos en bebidas alcohólicas (Zotta y col., 2008b). Dado que *S. thermophilus* es la segunda bacteria láctica más usada en el mundo como cultivo iniciador, y la más usada en Argentina, los estudios dirigidos a conocer i) los métodos efectivos para alterar la permeabilidad o producir la lisis en *S. thermophilus* y ii) la influencia de la integridad celular en la formación de aroma por esta especie, aparecen como de gran importancia y han sido previamente identificados como de interés (Aly, 1994; Coolbear y col., 1994; Somkuti y col., 1996, 1998; Smith y col., 2003; Flint y col., 2002; Zotta y col., 2008a,b; Mena y Aryana, 2012). Al momento de seleccionar un método de atenuación entre la gran variedad de métodos disponibles (acción de lisozima, mutanolisina, ondas de ultrasonido, disruptor de perlas, tolueno, acetona, dodecil sulfato de sodio, alcohol etílico, alcohol isopropílico, alcohol butírico, etc.) con la finalidad de aplicarlo en bacterias que serán usadas en un alimento, hay que tener en cuenta que el mismo no deje residuos tóxicos. De esta manera, entre los métodos preferidos se encuentran tratamientos físicos como el de ondas de ultrasonido o microfluidización, o el uso de agentes químicos como el etanol (Somkuti y col., 1998; Hayes y col., 2011; Gao y col., 2014), debido a que las trazas que puedan llegar a quedar del mismo en el cultivo tratado no constituyen un peligro a la salud como sí lo serían otros solventes como el tolueno y la acetona (Woldringh, 1973; Fenton, 1978; Middelberg, 1995; Geciova y col., 2002; Thage, y col., 2004a).

El impacto de la atenuación puede monitorearse por una gran diversidad de técnicas: disminución de la turbidez (Husson-Kao y col., 2000), recuentos en placa (Somkuti y col., 1998; Beebyaanda y col., 2013), determinación de proteínas liberadas (Guerlava y col., 1998), métodos de fluorescencia (Bunthof y col., 2001), citometría de flujo (Sheehan y col., 2005; Doolan y Wilkinson, 2009) y determinación de actividad de enzimas intracelulares como lactato dehidrogenasa (O'Reilly y col., 2002; Hannon y col., 2003; Kenny y col., 2006) y  $\beta$ -galactosidasa (Somkuti y col., 1998, Bury y col., 2001), entre otros. Es claro que no existe un método ideal, y la selección del o los ensayos destinados a evaluar la atenuación dependerán del tratamiento aplicado y de la matriz en la cual se llevará a cabo el estudio, y a menudo se

requiere más de una determinación para obtener una idea del impacto del tratamiento aplicado.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar el desempeño de diferentes métodos de atenuación - lisis y permeabilización - en dos cepas comerciales de *S. thermophilus*. Se determinó el efecto de dos agentes químicos (etanol y dodecil sulfato de sodio), 4 agentes físicos (ultrasonido, calor, congelado y disrupción mecánica) y una enzima (mutanolisina). Como índice de efectividad del tratamiento, se realizaron recuentos en placa y se cuantificaron dos enzimas intracelulares (lactato dehidrogenasa y  $\beta$ -galactosidasa).

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Diseño experimental**

Se realizaron experiencias preliminares ensayando varios tratamientos y combinaciones de los mismos, dirigidas a seleccionar uno o más métodos efectivos de atenuación. En una primera instancia, con el objetivo de elegir el medio en el cual realizar los tratamientos definitivos a las dos cepas de *S. thermophilus*, fue realizado un primer screening de métodos de atenuación. Esta prueba consistió en evaluar la viabilidad de las células de la cepa *S. thermophilus* 1 suspendidas en leche descremada reconstituida al 10 % (p/v) o en buffer fosfato de potasio 50 mM - pH 7, después de ser sometidas a varios métodos de atenuación: i) calor 63 °C - 20 s, ii) calor 60 °C - 30 min, iii) ultrasonido por 1 h y iv) congelado -80 °C por 48 h. Los resultados preliminares confirmaron la menor resistencia de la cepa cuando es sometida a tratamientos de atenuación en medios simples como lo es un buffer en comparación a la leche; por lo que el medio buffer fue el elegido para la realización de los estudios posteriores. En una segunda instancia se evaluó el efecto de doce tratamientos de atenuación (**Tabla 2.1**), sobre las dos cepas de *S. thermophilus* (*S. thermophilus* 1 y *S. thermophilus* 2) en la que se cuantificaron las actividades lactato dehidrogenasa (LDH),  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL) y recuentos en placa como índices de lisis y/o permeabilización. Las medidas de las enzimas intracelulares se realizaron en la suspensión antes de separar las células por centrifugación y en el sobrenadante después de separar las células por centrifugación, correspondiendo a las actividades total y liberada, respectivamente. Todas las experiencias fueron realizadas por duplicado.



**Tabla 2.1.** Tratamientos de atenuación aplicados e índices de lisis/permeabilización sobre dos cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus* (St1 y St2).

Tratamiento de atenuación	Temperatura-Tiempo	Viabilidad	LDH		β-GAL	
			T <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	T <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>
Mutanolisina 100 U	37 °C – 22 h	✓	✓	✓	✓	✓
Mutanolisina 200 U	37 °C - 22 h	✓	✓	✓	✓	✓
Disruptor de perlas	5 °C - 3 min	✓	X	✓	X	✓
Ultrasonido	10 °C - 1 h	✓	✓	✓	✓	✓
Congelación	-80 °C - 48 h	✓	✓	✓	✓	✓
Choque térmico	63 °C - 20 s	✓	✓	✓	✓	✓
Etanol 40 %	37 °C - 30 min	✓	✓	✓	✓	✓
SDS 0,1 %	37 °C - 30 min	✓	✓	✓	✓	✓
Etanol - congelado	37° C - 30 min y -80 °C - 48 h	✓	✓	✓	✓	✓
Etanol - calor	37 °C - 30 min y 63 °C - 20 s	✓	✓	✓	✓	✓
SDS - congelado	37 °C - 30 min y -80 °C - 48 h	✓	✓	✓	✓	✓
SDS - calor	37 °C - 30 mim y 63 °C - 20 s	✓	✓	✓	✓	✓

✓: Análisis realizado, X: Análisis no realizado.

<sup>1</sup>T: actividad total.

<sup>2</sup>L: actividad liberada.

## 2.2 Cepas y condiciones de crecimiento

Se estudiaron dos cepas de dos cultivos comerciales diferentes de *Streptococcus thermophilus*, comercializadas por empresas líderes y de uso muy difundido en la industria quesera argentina. Los cultivos liofilizados fueron reactivados en caldo Elliker (Biokar Diagnostics, Allonne, Francia) por 24 h a 37 °C. Posteriormente, se aisló una colonia de cada uno de los cultivos a partir de una estría del cultivo en placa de medio Elliker agarizado. Las dos cepas puras, de ambos cultivos comerciales, que para no revelar la identidad las llamaremos St1 y St2, fueron congeladas en caldo Elliker - glicerol (15 %) hasta el momento de la preparación de las células.

Los recuentos se realizaron en medio Elliker agarizado luego de una incubación por 48 h a 37 °C.

## 2.3 Preparación de las células

Las cepas conservadas a -20 °C en caldo Elliker con el agregado de glicerol (15 %) como criopreservante fueron reactivadas en caldo Elliker e incubadas a 37 °C por 24 horas. Luego, se realizaron dos repiques overnight sucesivos al 2 % en las mismas condiciones.

Posteriormente, para cada uno de los tratamientos de atenuación se realizó un repique al 2 % en 50 mL del mismo medio y se incubó a 37 °C hasta una densidad óptica (DO) de 1,8, que correspondía a la fase de crecimiento logarítmica tardía y cuya población estaba en el orden de  $\sim 5 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Luego, se cosecharon las células por centrifugación (12000 g - 10 min - 4 °C) y el pellet resultante fue lavado dos veces con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7 (buffer de lavado). Una última etapa de centrifugación se llevó a cabo para recuperar las células, a las que denominamos células acondicionadas (CA). Estas CA fueron suspendidas en los medios adecuados según el correspondiente tratamiento.

Al finalizar cada uno de los tratamientos, las suspensiones o las células permeabilizadas (etanol y SDS) fueron llevadas al mismo volumen inicial (50 mL), si era necesario. Posteriormente, se separó la suspensión celular en dos partes: i) en una alícuota se realizaron los recuentos en placa y las determinaciones de las enzimas (LDH y  $\beta$ -GAL), considerando esta medida como la actividad enzimática total, ii) mientras que la otra parte fue centrifugada (12000 g - 10 min - 4 °C) para eliminar las células enteras y restos de células, y en el sobrenadante obtenido se determinaron las actividades enzimáticas (LDH y  $\beta$ -GAL), considerando esta medida como actividad liberada. En cada caso las muestras se mantuvieron a 5 °C hasta la determinación de las enzimas y recuentos microbiológicos.

A excepción de la mutanolisina, para todos los tratamientos se utilizó como control las CA resuspendidas en buffer de lavado sin tratamiento alguno, en el cual fueron determinadas las actividades enzimáticas antes y después de separar las células por centrifugación (12000 g - 10 min - 4 °C), correspondiendo a las actividades enzimáticas control total y liberada, respectivamente. Para la mutanolisina, el control utilizado fueron las CA resuspendidas en buffer e incubadas en las mismas condiciones que los células experimentales, con la única diferencia de que no se agregó la mutanolisina, lo que nos permitiría evaluar la capacidad de autólisis en esas condiciones específicas.

En el apartado siguiente se detallan los tratamientos de atenuación en forma individual, pero cabe aclarar que en las experiencias en las cuales estudiamos la combinación de tratamientos, la metodología fue exactamente igual a la detallada para el tratamiento individual.

## **2.4 Métodos de atenuación**

### **2.4.1 Mutanolisina**

Las CA fueron resuspendidas en 2,5 mL de solución de mutanolisina en dos concentraciones diferentes (100 U y 200 U), y se incubaron en un baño térmico a 37 °C por 22

horas. Las soluciones de mutanolisina fueron previamente preparadas a partir de una solución estándar de 5 KU (Sigma, M9901), diluyendo 50  $\mu\text{L}$  de mutanolisina 5 KU en 2450  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 6,2 (100 U) y 100  $\mu\text{L}$  de mutanolisina 5 KU en 2400  $\mu\text{L}$  del mismo buffer (200 U). Al finalizar el tratamiento, la suspensión se llevó a 50 mL con buffer de lavado y se refrigeró hasta el momento de las determinaciones analíticas.

#### **2.4.2 Dodecil sulfato de sodio (SDS)**

Se preparó una solución de SDS al 0,1 % y se la esterilizó por filtración con una membrana HV (Durapore) PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore, San Pablo, Brasil). Posteriormente, en 50 mL de esta solución fueron suspendidas las CA e incubadas a 37 °C durante 30 min. Una vez finalizada la incubación, se procedió a eliminar el SDS, centrifugando (12000 g - 10 min - 4 °C) y lavando el pellet dos veces con el buffer de lavado. Una vez finalizados los lavados, se centrifugó nuevamente en iguales condiciones, resuspendiéndose finalmente el pellet en 50 mL de buffer de lavado que se mantuvo refrigerado hasta el momento de las determinaciones analíticas.

#### **2.4.3 Etanol**

Las CA se suspendieron en 5 mL de una solución de etanol al 40 % (2,1 mL etanol 96° + 2,9 mL de agua estéril), y se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez finalizada la incubación, se procedió a eliminar el alcohol, centrifugando (12000 g - 10 min - 4 °C) y lavando el pellet dos veces con el buffer de lavado. Una vez finalizados los lavados, se centrifugó nuevamente en iguales condiciones, y las células atenuadas se resuspendieron en 50 mL de buffer de lavado y se conservaron a 5 °C hasta las determinaciones analíticas.

#### **2.4.4 Disruptor celular de perlas**

Para los ensayos con el disruptor de perlas, las CA fueron concentradas 30 veces, a los fines de contar con la biomasa suficiente en el volumen correspondiente a los tubos usados en el dispositivo. Para ello, las CA fueron resuspendidas en 1666  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado, que fue distribuido en dos tubos estériles con perlas de vidrio de un diámetro de 106  $\mu\text{m}$  (Sigma) y sometido tres veces a 1 min de agitación en un disruptor celular Mini-Beadbeater 8TM. Para evitar el calentamiento de las células, después de cada minuto de tratamiento, los tubos se mantuvieron durante 2 minutos en un baño con hielo. Al finalizar el tratamiento se realizó el recuento microbiológico, y luego se separaron las perlas, células y detritos celulares por

centrifugación (16000 g - 15 min - 10 °C). El extracto libre de células se llevó a 50 mL con buffer de lavado y se mantuvo a 5 °C hasta el análisis.

#### **2.4.5 Ultrasonido**

En este caso, las CA fueron suspendidas en 50 mL del buffer de lavado e introducidas en un baño de ultrasonido (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, Estados Unidos), en presencia de hielo, para evitar el aumento de la temperatura. El tratamiento se llevó a cabo durante 1 h a 47 kHz y una potencia de 80 W; y una vez finalizado se mantuvo a temperatura de refrigeración hasta los análisis.

#### **2.4.6 Congelado**

Para el ensayo de congelado las CA se suspendieron en 50 mL del buffer de lavado y luego fueron congeladas a una temperatura de -80 °C, a la que se mantuvieron por 48 h. Finalizado el período de congelamiento, la muestra se descongeló lentamente y se conservó a 5 °C hasta las determinaciones de los recuentos y las enzimas.

#### **2.4.7 Calor**

Las CA de ambas cepas de *S. thermophilus* fueron resuspendidas en 50 mL del buffer de lavado y se calentaron a 63 °C durante 20 s. Al finalizar el calentamiento, todas las muestras se enfriaron rápidamente en un baño de hielo. Tanto la etapa de calentamiento como la de enfriamiento se realizaron bajo agitación continua. También en este caso las suspensiones se mantuvieron a 5 °C hasta su análisis.

### **2.5 Determinación de la viabilidad**

Como índice del impacto generado por los tratamientos de atenuación se realizaron recuentos en placas de los extractos celulares de ambas cepas de *S. thermophilus* antes y después de dichos procedimientos. Se realizaron las diluciones necesarias y se incubaron en medio Elliker por 48 h a una temperatura de 37 °C. Los recuentos se expresaron como logaritmo decimal de las unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de suspensión o sobrenadante.

**2.6 Observación microscópica**

El efecto de dos de los tratamientos ensayados (ultrasonido y disrupción celular) sobre la morfología, fue evaluado por observación microscópica. La misma consistió en la observación directa al microscopio (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) de las suspensiones celulares antes y después de someter a ambos tratamientos. La observación fue realizada con gota fresca de inmersión a un aumento total de 1000x.

**2.7 Determinación de la actividad lactato dehidrogenasa (LDH)**

La actividad LDH en los extractos fue analizada usando el método de Wittenberger y Angelo (1970) por determinación del cambio de absorbancia a 340 nm (25 °C), resultado de la oxidación de NADH dependiente del piruvato. El fundamento del método se basa en la siguiente reacción:



La mezcla de reacción contenía 200  $\mu\text{L}$  de piruvato de sodio 62,5 mM (Sigma P2256), 200  $\mu\text{L}$  fructosa 1-6-difosfato 12,5 mM (Sigma F6803), 600  $\mu\text{L}$  de NADH 0,625 mM (Sigma N8129), 400  $\mu\text{L}$  de muestra y 1100  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de sodio (0,1 M - pH 6,5) (Daryaei y col., 2010). Se determinó la absorbancia inicial a 340 nm inmediatamente antes de agregado del piruvato, y la absorbancia final después de un minuto de agregado del piruvato. El coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ( $6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) fue usado para el cálculo de la actividad LDH, que se expresó como la cantidad de nmoles de NADH oxidados, en un minuto de reacción por microlitro de extracto. La actividad LDH se determinó antes y después del tratamiento en los extractos celulares sin centrifugar (actividad LDH total), y en el sobrenadante después de la centrifugación del extracto (actividad LDH liberada).

**2.8 Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL)**

La actividad  $\beta$ -GAL se determinó con el sustrato orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) a una concentración de 4 mg / mL según el método propuesto por Miller (1972) con algunas modificaciones. El método se basa en la siguiente reacción:



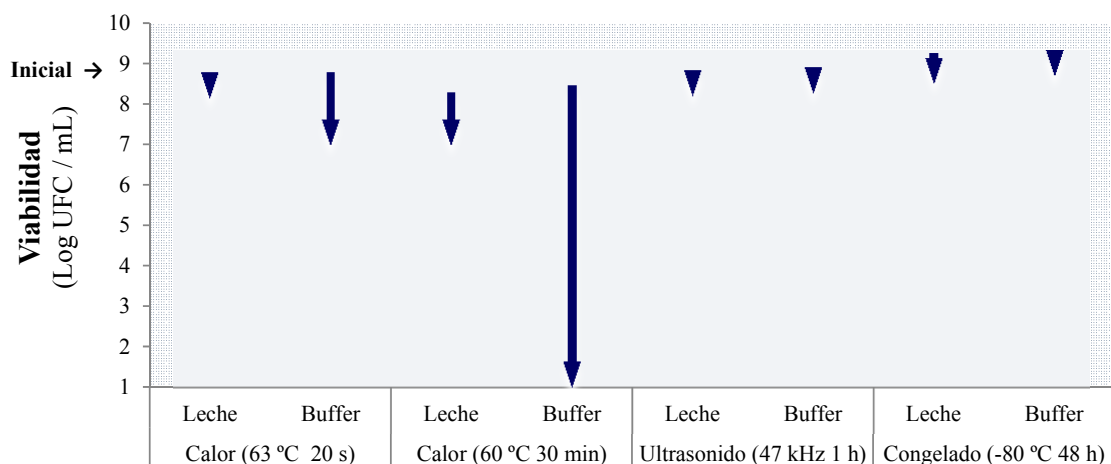
La mezcla de reacción (900  $\mu\text{L}$  buffer fosfato de sodio 100 mM - pH 7 + 200  $\mu\text{L}$  ONPG + 100  $\mu\text{L}$  de la muestra) se incubó 15 min a 37 °C (Vinderola y Reinheimer, 2003). Luego de detener la reacción con 500  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 0,5 M, se midió la absorbancia a 420 nm. La actividad  $\beta$ -GAL se expresó como la cantidad de nmoles de orto-nitrofenol (ONP) liberados durante un minuto de reacción por microlitro de extracto, utilizando el coeficiente de extinción molar del ONP a 420 nm ( $4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Daryaei y col., 2010). La actividad se determinó antes y después del tratamiento en los extractos celulares sin centrifugar (actividad  $\beta$ -GAL total), y en el sobrenadante después de la centrifugación del extracto (actividad  $\beta$ -GAL liberada).

### **3. Resultados**

#### **3.1 Estudios preliminares**

El efecto de la composición de la matriz en la cual se hallaban las células durante el tratamiento de atenuación fue estudiado mediante la aplicación de cuatro tratamientos diferentes sobre *S. thermophilus* St1. Como puede observarse en la **Figura 2.1**, para los tratamientos en los que se aplicó calor, la disminución de la viabilidad fue mayor cuando se realizó en buffer fosfato de potasio. Este resultado no resulta sorprendente, ya que medios complejos como la leche contienen sustancias - grasa, proteína, carbohidratos - que pueden ejercer un efecto de protección sobre los microorganismos dispersos, a diferencia del buffer fosfato de potasio que es un medio mucho más simple, en donde la transferencia de calor probablemente sea más homogénea. El efecto protector de las proteínas de la leche sobre *S. thermophilus*, también fue sugerido por Flint y col. (2002), entre otros.

El efecto del tratamiento con ondas ultrasónicas y el efecto de la congelación no afectaron la viabilidad de la cepa, independientemente de la matriz en que se llevaron a cabo.



**Figura 2.1.** Disminución de la viabilidad de una cepa comercial de *S. thermophilus* (St1) después de someterla a cuatro tratamientos de atenuación. Los resultados se expresan en log UFC mL<sup>-1</sup>. El recuento inicial fue alrededor de 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y el recuento después del tratamiento se indica por la punta de la flecha.

Las actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL no fueron determinadas para estos primeros ensayos previos, ya que ambas enzimas se determinan por técnicas espectrofotométricas y se comprobó que las muestras tratadas en leche, a pesar de la dilución correspondiente, provocaban una turbidez en las muestras de ensayo que interfería al intentar medir la absorbancia. Debido a la importancia que tienen las medidas de enzimas intracelulares para monitorear el impacto ocasionado por los tratamientos de atenuación y sumando la dificultad de su medida en muestras de leche, para los posteriores tratamientos se decidió continuar sólo con las pruebas en buffer fosfato de potasio, que es utilizado además por la mayoría de los autores cuyo trabajo se consultó para la presente tesis (Bunthof y col., 2001; Bourdat-Deschamps y col., 2004; Martínez-Cuesta y col., 2006). Además, a partir de los presentes resultados se descartó el tratamiento térmico de 30 minutos debido a la elevada disminución de viabilidad que causó, y a la probable inactivación de las enzimas.

### 3.2 Efecto del tratamiento en la viabilidad

En la **Figura 2.2** se muestra la disminución de la viabilidad provocada por los doce tratamientos aplicados sobre las dos cepas de *S. thermophilus*. Como puede observarse en la figura, los tratamientos con etanol y con SDS, provocaron una reducción de más de 8 órdenes logarítmicos de la población celular de ambas cepas de *S. thermophilus*. Esto indica que la concentración y el tiempo de exposición en los tratamientos de SDS y etanol constituyeron un tratamiento demasiado energético.

## Capítulo 2

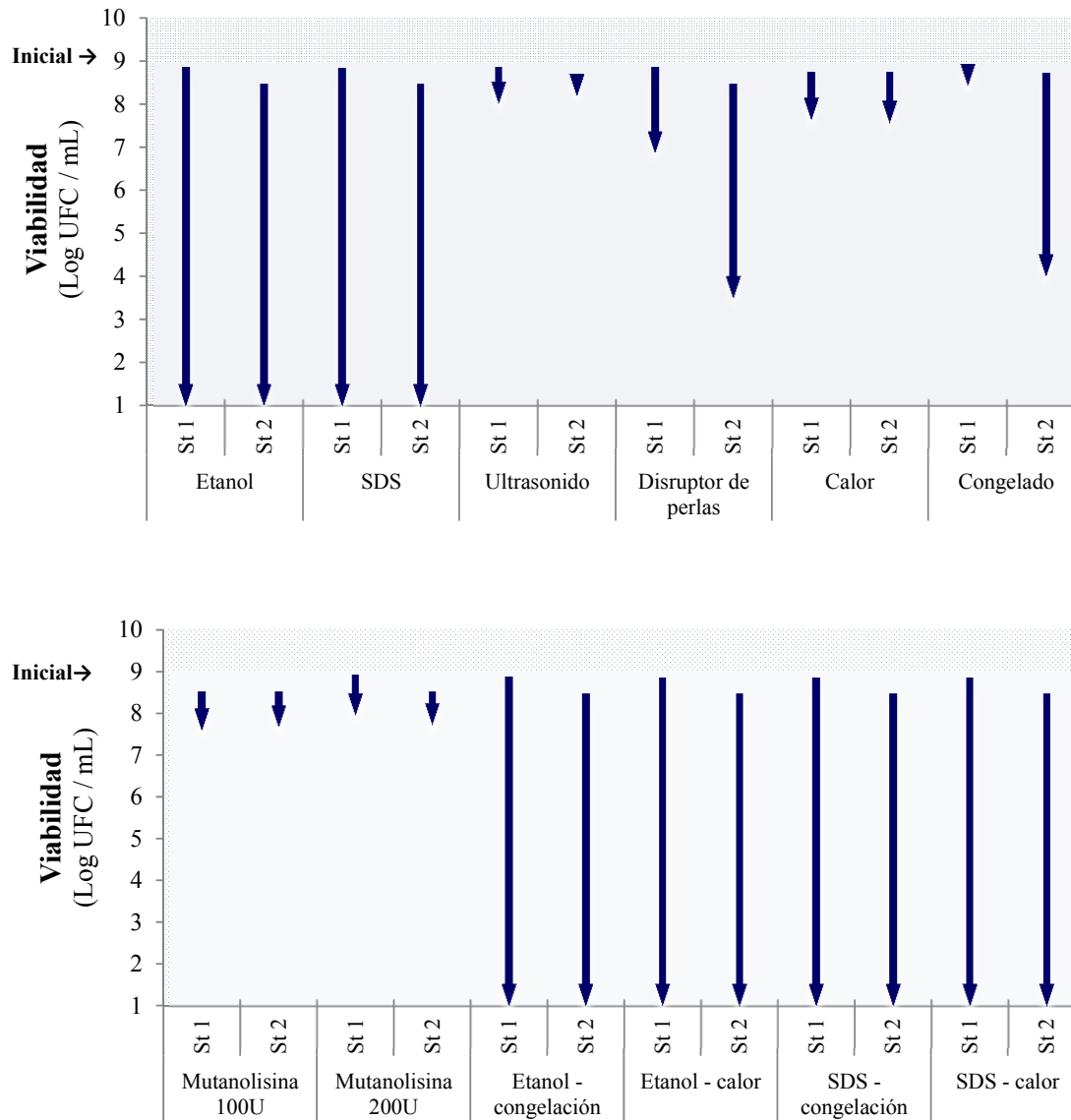
---

Por otro lado, las disminuciones de los recuentos celulares en los extractos sometidos a los tratamientos de ultrasonido, disruptor de perlas, calor y congelado fue más variable, y en general, se observaron descensos de uno a dos órdenes logarítmicos para la cepa *S. thermophilus* 1. Por su parte, para *S. thermophilus* 2 se observaron descensos de uno a dos órdenes logarítmicos sólo para los tratamientos ultrasonido y calor mientras que mostró una mayor sensibilidad que *S. thermophilus* 1, a los tratamientos de disruptor de perlas y congelado.

En los tratamientos en que contemplaban la aplicación de mutanolisina, se verificó una disminución de un orden logarítmico. Además, para ambas cepas estudiadas, el incremento de la concentración de mutanolisina de 100 U a 200 U no mostró diferencias en la disminución de la viabilidad obtenida

Por último, los tratamientos combinados, redujeron notablemente la viabilidad. Esto era de esperarse ya que los tratamientos individuales de SDS y etanol mostraron un elevado daño sobre la viabilidad.

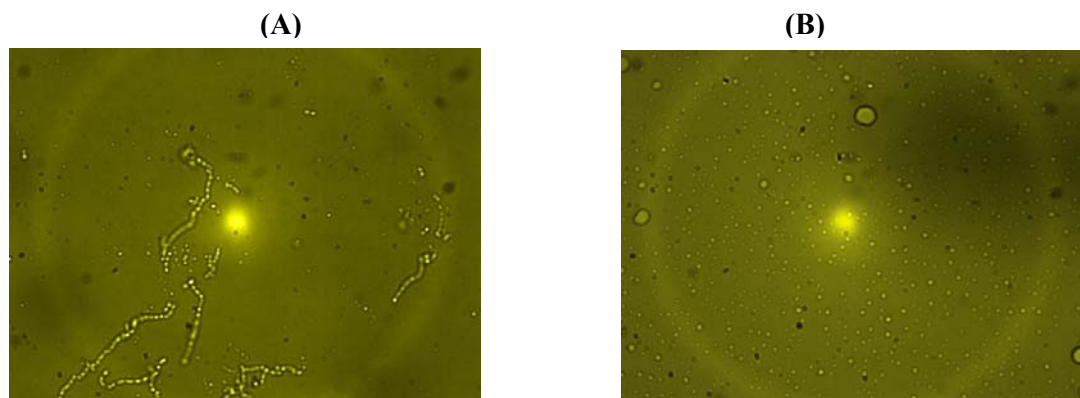




**Figura 2.2.** Disminución de la viabilidad de dos cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus*: St1 y St2, sometidas a distintos tratamientos de atenuación. El recuento inicial fue alrededor de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> y el recuento después del tratamiento se indica por la punta de la flecha.

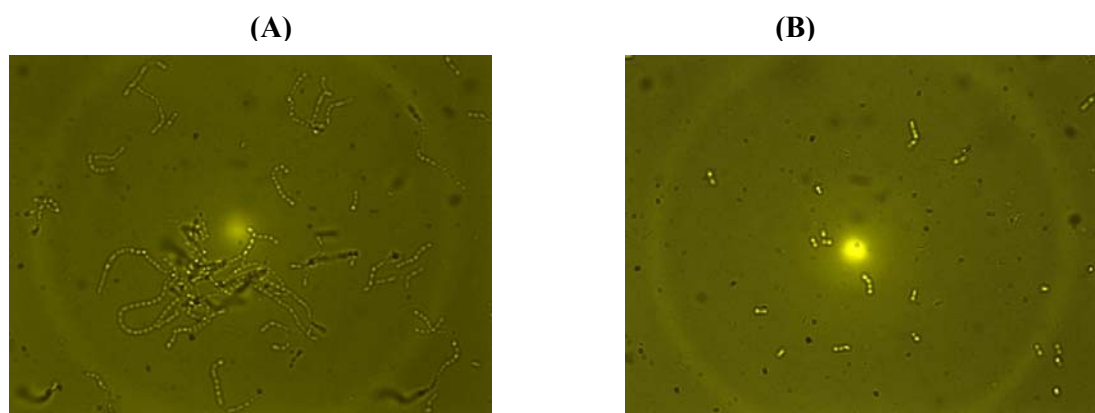
### 3.3 Observación microscópica

En la **Figura 2.3** y **2.4** se representan las imágenes tomadas en un microscopio óptico de las células de *S. thermophilus* 2 antes y después de someter a los tratamientos de ruptura celular y ultrasonido respectivamente. En estas imágenes se observa que el tratamiento de ruptura celular fue mucho más agresivo que el del ultrasonido. En la **Figura 2.3** se puede observar que las cadenas de cocos y células fueron desintegradas totalmente por la ruptura mecánica con las perlas de vidrio.



**Figura 2.3.** Las imágenes son fotos tomadas en un microscopio óptico antes (A) y después (B) del tratamiento de disrupción celular.

Para el caso del ultrasonido, se observó un efecto más leve, detectándose la ruptura parcial de las cadenas de cocos.

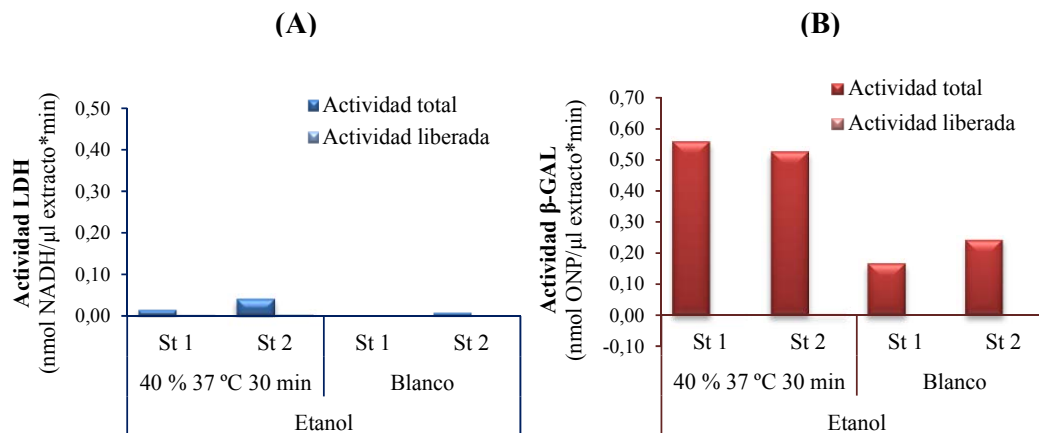


**Figura 2.4.** Las imágenes son fotos tomadas en un microscopio óptico antes (A) y después (B) del tratamiento de ultrasonido.

### 3.4 Efecto del tratamiento de atenuación en las actividades LDH y $\beta$ -GAL

#### 3.4.1 Etanol

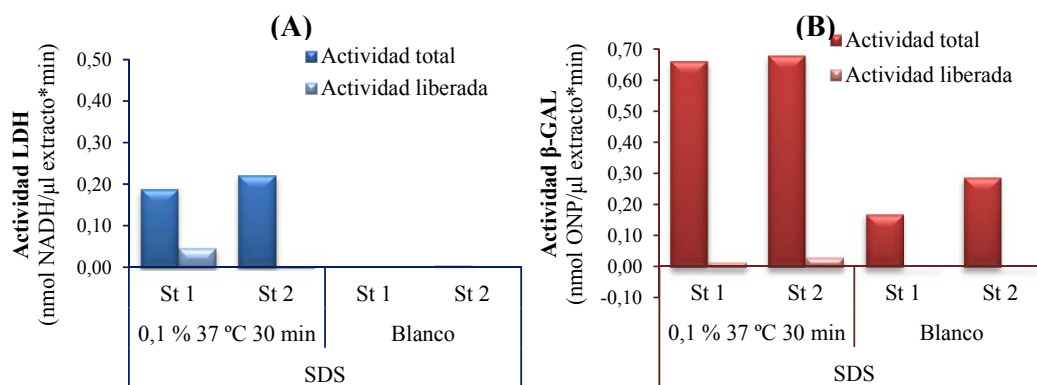
El tratamiento con etanol aumentó notablemente la actividad  $\beta$ -GAL total, como se puede observar en la **Figura 2.5**, mientras que produjo un mínimo incremento en la actividad  $\beta$ -GAL liberada. Por el contrario, el incremento de la actividad LDH total y liberada, prácticamente fue despreciable comparado con los niveles que provocaron otros tratamientos. Por esta razón, y para visualizar de forma más clara la comparación, además del gráfico individual para cada tratamiento, se realizó un gráfico comparativo del incremento en las actividades enzimáticas respecto a su control para todos los tratamientos estudiados (**Figura 2.14**).



**Figura 2.5.** Actividades enzimáticas LDH (A) y β-GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación de etanol 40 % a 37 °C durante 30 min. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.2 SDS

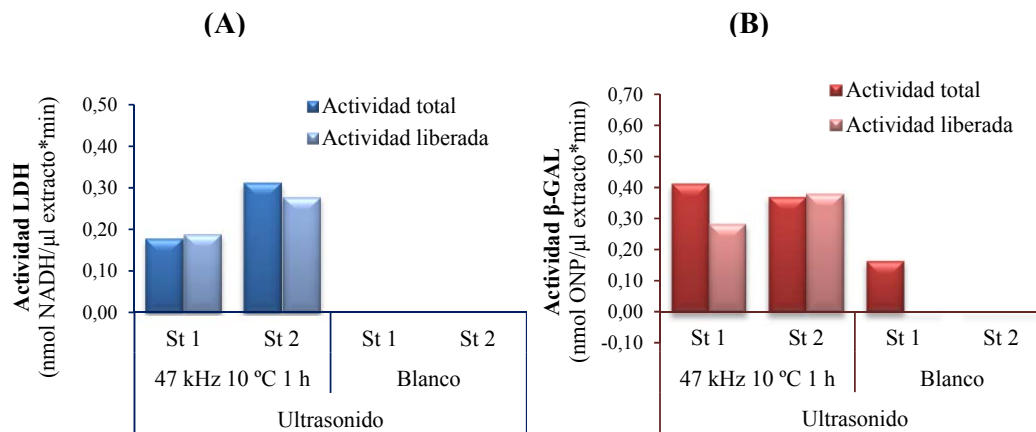
El tratamiento con SDS provocó el mismo efecto en la actividad β-GAL que el tratamiento con etanol. En efecto, la actividad β-GAL total después del tratamiento aumentó en niveles similares, mientras que la actividad liberada fue prácticamente despreciable (**Figura 2.6**). Por otro lado, el tratamiento con SDS sí produjo un efecto positivo en la actividad LDH total.



**Figura 2.6.** Actividades enzimáticas LDH (A) y β-GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación en SDS 0,1 % a 37 °C durante 30 min. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.3 Ultrasonido

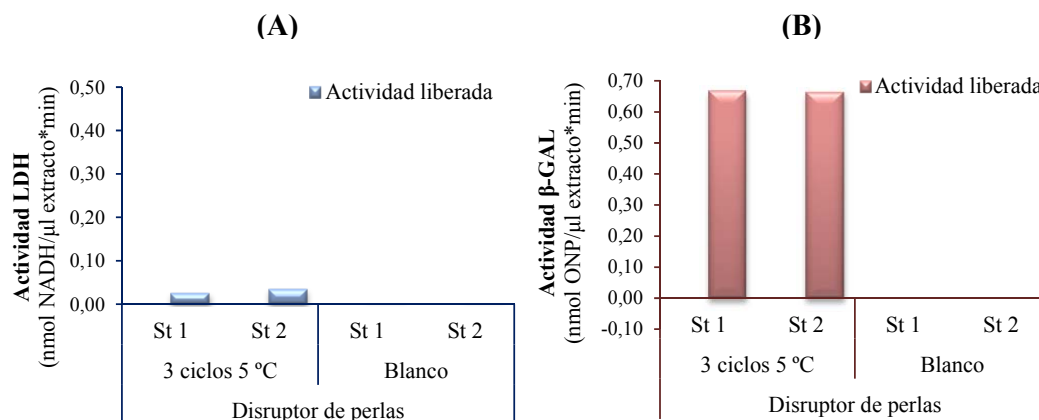
Las actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL, como se puede ver en la **Figura 2.7**, aumentaron en las dos cepas de *S. thermophilus* después de someterlas al tratamiento de ultrasonido, presentando similares niveles de actividad total y liberada. Aunque en menor medida que en los extractos experimentales, se observó actividad  $\beta$ -GAL en el blanco de la cepa St1 solamente, a diferencia de la actividad LDH que, para ambas cepas, sólo fue hallada después del tratamiento de ultrasonido.



**Figura 2.7.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación con ondas de ultrasonido a 10 °C durante 1 hora. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.4 Disruptor de perlas

En el tratamiento con el disruptor celular de perlas se estudió únicamente la actividad liberada (**Figura 2.8**), debido a que después de finalizado el tratamiento de disruptión, las células junto con las perlas de vidrio fueron separadas por centrifugación. Este tratamiento mostró la mayor liberación de actividad  $\beta$ -GAL entre todos los tratamientos ensayados, mientras que produjo un leve incremento de la actividad LDH, comparable al obtenido para el ensayo con etanol. Estos resultados podrían sugerir un efecto negativo de la disruptión mecánica sobre esta última enzima, que alcanzó niveles mayores con otros tratamientos, tanto en actividad total como liberada (SDS y ultrasonido).

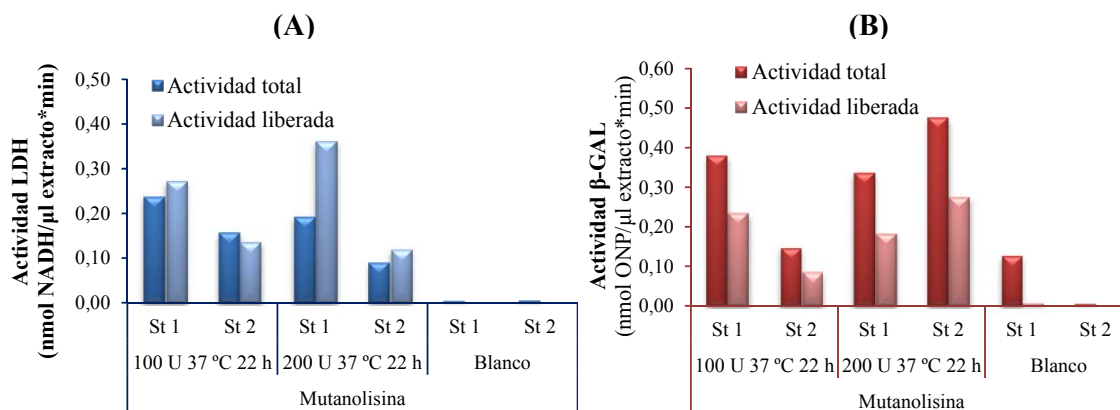


**Figura 2.8.** Actividades enzimáticas LDH (A) y β-GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de disruptión en un disruptor celular de perlas a 5 °C durante 3 minutos. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.5 Mutanolisina

Los niveles de las dos enzimas intracelulares estudiadas aumentaron en los extractos tratados con Mutanolisina 100 y 200 U, presentando similares niveles la actividad total y liberada (Figura 2.9). En general, como sucedió en la medida de recuentos en placa, no hubo una correlación entre la concentración utilizada de mutanolisina y el incremento de las actividades enzimáticas.

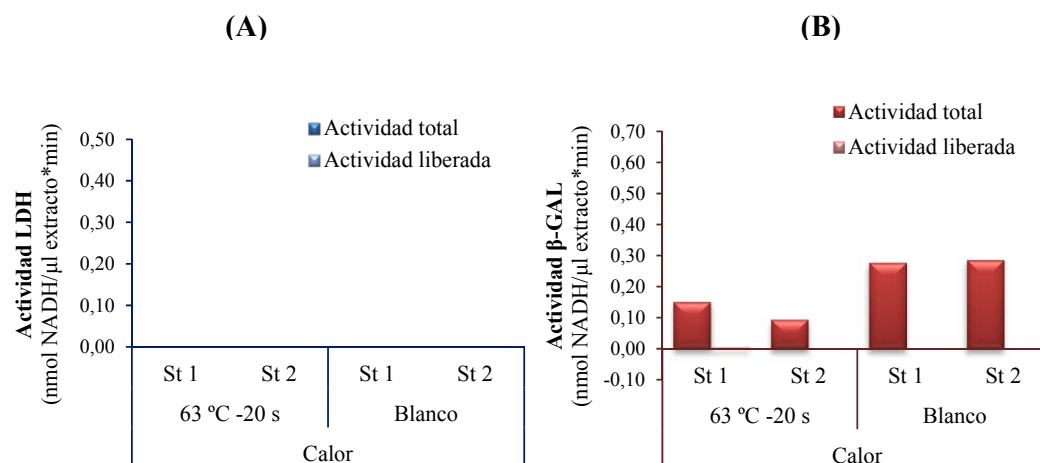
En este tratamiento, la actividad total de la β-GAL fue mayor que la actividad liberada, mientras que por el contrario la actividad LDH total y liberada fue similar en todos los casos.



**Figura 2.9.** Actividades enzimáticas LDH (A) y β-GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación con mutanolisina 100 y 200 U a 37 °C durante 22 h. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.6 Calor

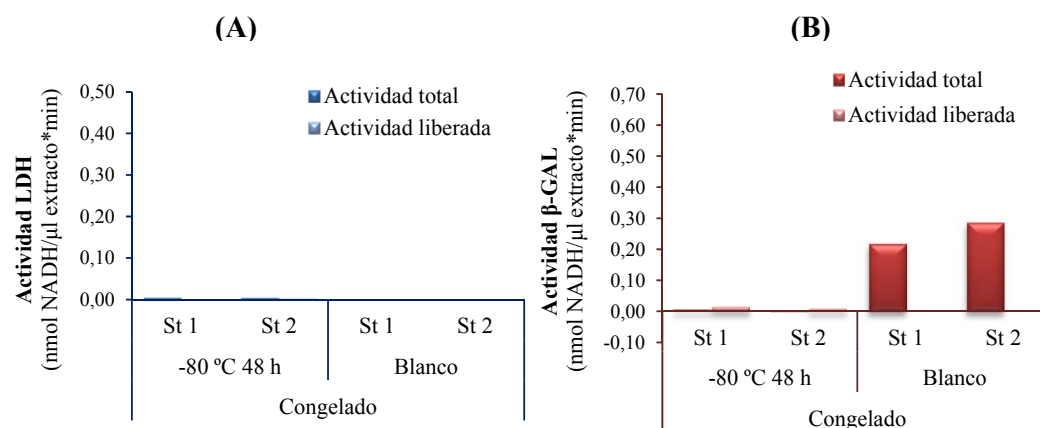
El tratamiento de calor no afectó en forma significativa la liberación o accesibilidad de la actividad LDH. Por otro lado, la actividad  $\beta$ -GAL disminuyó después del tratamiento, indicando una posible inactivación de la misma.



**Figura 2.10.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación de calentamiento a 63 °C durante 20 s. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.7 Congelado

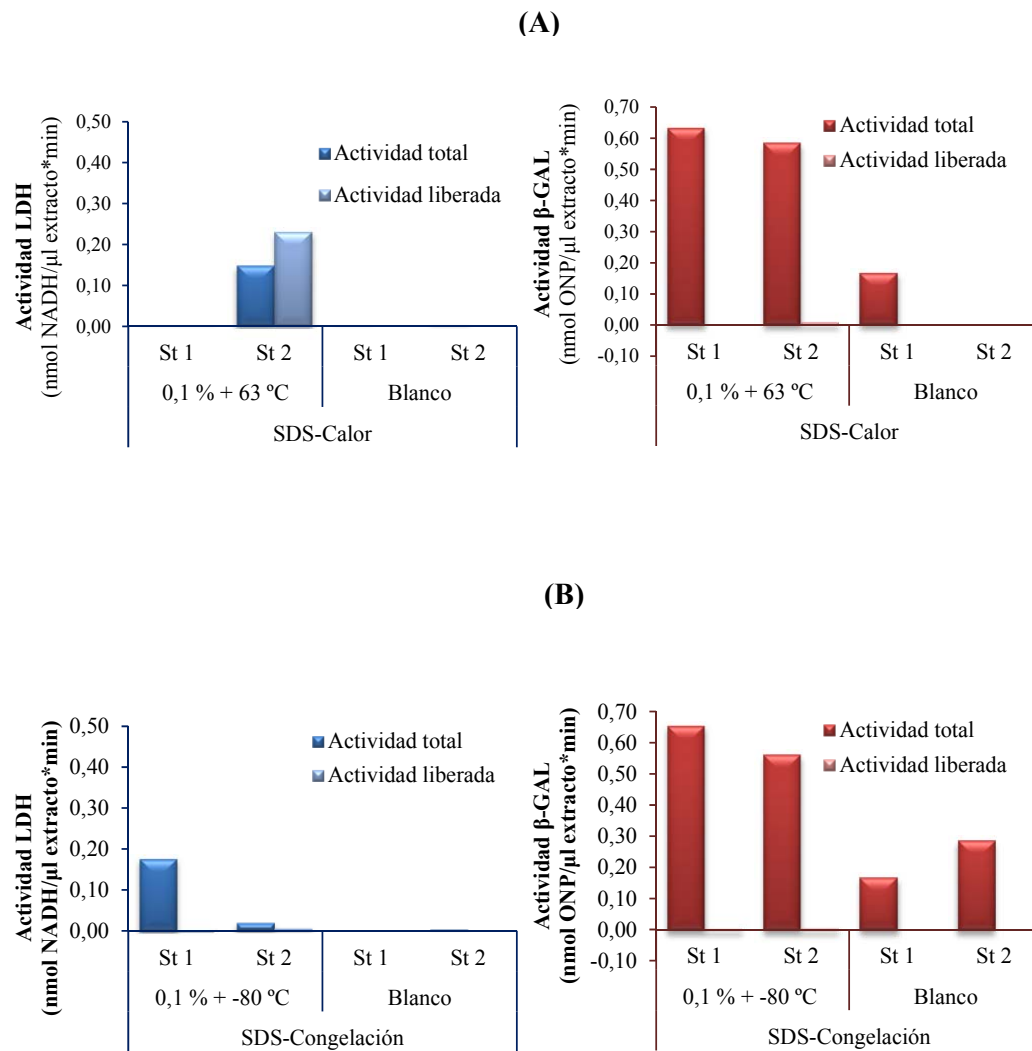
El método de congelado, al igual que el tratamiento térmico, no afectó significativamente la accesibilidad de la LDH, mientras que sí produjo una disminución de la actividad de la  $\beta$ -GAL.



**Figura 2.11.** Actividades enzimáticas LDH (A) y  $\beta$ -GAL (B) en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación por congelamiento a -80 °C durante 48 horas. Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.8 SDS + congelación y SDS + calor

En general, la combinación de tratamientos: i) SDS + congelación y ii) SDS + calor, no aumentó significativamente las actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL respecto a los tratamientos de SDS por separado.



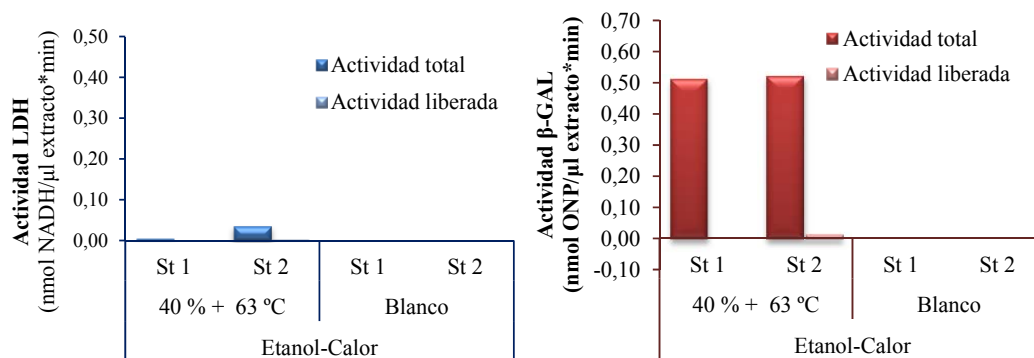
**Figura 2.12.** Actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación en SDS 0,1 % a 37 °C durante 30 min sumado a un tratamiento posterior de calor (A) o congelado (B). Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.

### 3.4.9 Etanol + congelación y etanol + calor

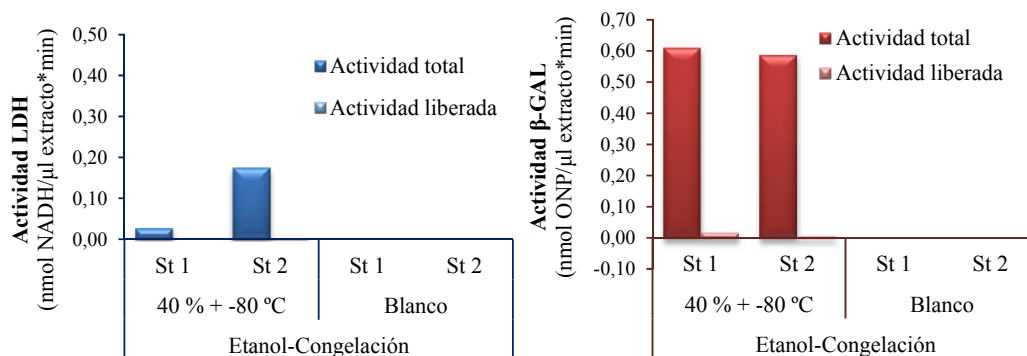
La combinación de tratamientos: i) etanol + congelación y ii) etanol + calor, al igual que la combinación de tratamientos con SDS, tampoco aumentaron las actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL respecto a los tratamientos por separado.

Además, también hay que destacar las diferencias en la permeabilidad de los controles durante todas las experiencias, principalmente de la  $\beta$ -GAL. Las pruebas se realizaron en diferentes experiencias, y las células acondicionadas se preparaban el día del tratamiento, por lo cual cada cultivo atenuado se compara con su propio control. Las diferencias minimizan de esta manera la variabilidad en la permeabilidad del cultivo de partida.

(A)

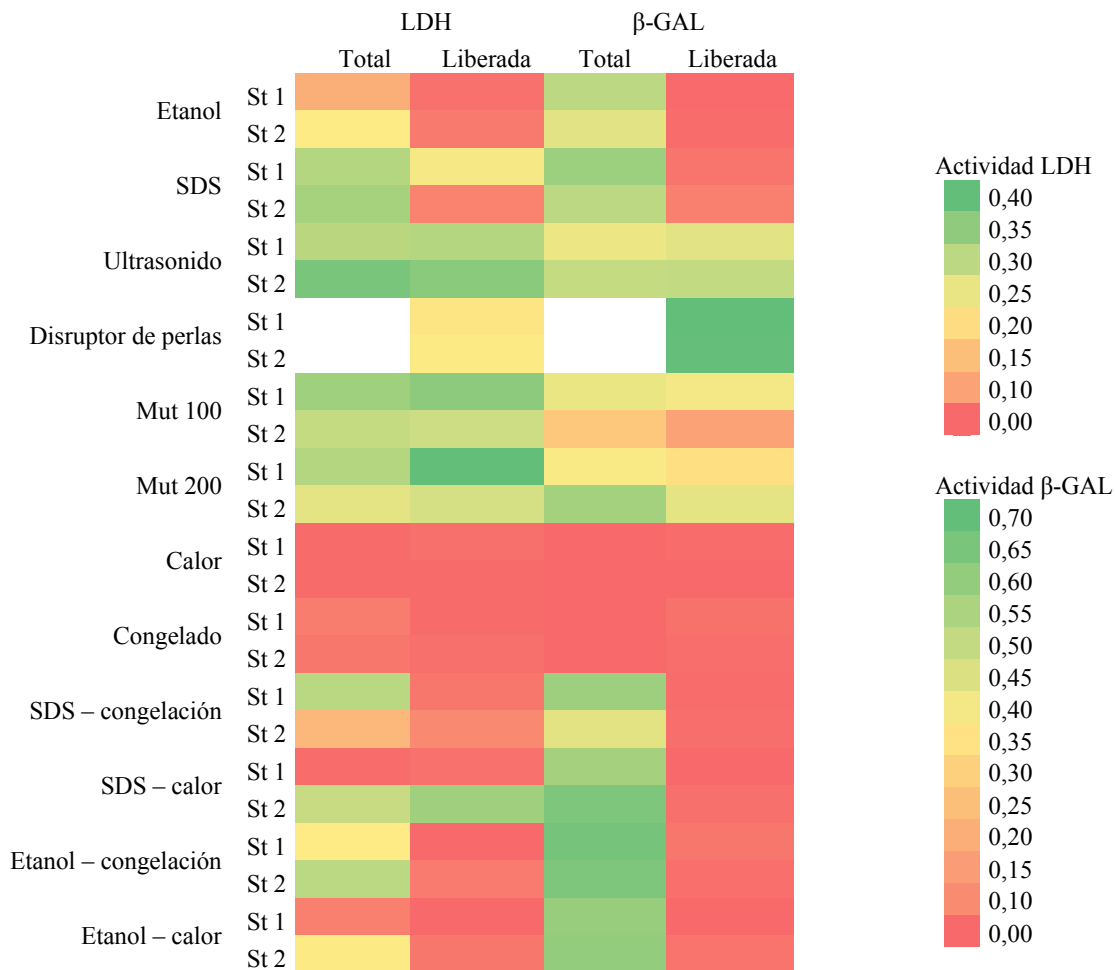


(B)



**Figura 2.13.** Actividades enzimáticas LDH y  $\beta$ -GAL en extractos de dos cepas comerciales de *S. thermophilus* (St1 y St2) después de un tratamiento de atenuación con etanol 40 % a 37 °C durante 30 min sumado a un tratamiento posterior de calor (A) o congelado (B). Se incluyen los blancos respectivos. Los valores corresponden al promedio de las actividades total (■ y ■) y actividades liberadas (■ y ■) de las dos réplicas realizadas.





**Figura 2.14.** Gráfico comparativo del efecto producido por los tratamientos estudiados en las actividades LDH y  $\beta$ -GAL. Los valores corresponden a las diferencias entre las muestras tratadas y sus respectivos controles. En el caso en el que la diferencia de las actividades respecto del control haya sido menor que cero, se le asignó el mínimo valor de la tabla (cero).

#### 4. Discusión

El conjunto de los resultados que surgen de los índices de daño a las envolturas celulares, esto es, recuentos, actividad  $\beta$ -GAL y LDH, constituyen un mapa bastante complejo de analizar, pero imprescindible para conocer en qué medida los tratamientos contribuyeron a la permeabilización de las células. En efecto, se conoce que un sólo indicador de lisis, tal como los recuentos, no es suficiente para interpretar la influencia de este tipo de desafío sobre la pared y la membrana celular.

El impacto de los tratamientos de disruptor celular de perlas y ultrasonido observado al MO es consistente con lo informado previamente en la literatura, y con los resultados de

viabilidad (Champagne y col., 2011). En efecto, el hecho de que no se haya modificado prácticamente la viabilidad luego de la aplicación del tratamiento de ultrasonido es coherente con la presencia de células intactas observadas al MO después del tratamiento. Asimismo, el efecto más agresivo observado por el tratamiento de disrupción mecánica se relaciona con la mayor disminución de la viabilidad verificada para este tratamiento. Por otro lado la aplicación de ultrasonido también se ha utilizado con objetivos analíticos (recuentos) como una estrategia para dispersar las cadenas o cluster que pueden formar las BAL probióticas particularmente cuando son crecidas en caldo MRS (Ding y Shah, 2009). En este sentido la incorporación de perlas de vidrio de 4 mm de diámetro al medio de dilución para los recuentos microbiológicos y la agitación manual se ha informado como una práctica para la desintegración de las largas cadenas que forma *Lactococcus* (St-Gelais y col., 2006; 2009).

En nuestro estudio, en términos generales observamos que las suspensiones celulares, antes de ser sometidas a los diferentes tratamientos de atenuación, mostraron baja o nula actividad de las enzimas intracelulares de interés, aunque  $\beta$ -GAL resultó más fácilmente permeabilizada hacia el medio que LDH en los controles. Estos resultados no son ajenos a los encontrados en la literatura sobre el tema. Somkuti y Steinberg (1994) informaron actividad  $\beta$ -GAL en *S. thermophilus* ST128 antes de someter al tratamiento con diversos detergentes. La permeabilización de la  $\beta$ -GAL en suspensiones celulares controles también ha sido informada en otras especies (Bury y col., 2001; Daryaei y col., 2010). Daryaei y col. (2010), además de la actividad  $\beta$ -GAL, informaron LDH y F- $\beta$ -GAL (actividad fosfo- $\beta$ -galactosidasa) en el sobrenadante obtenido por separación de las células, antes de someter al tratamiento de atenuación. Por otro lado, Wilkinson y col. (1994) estudiaron el efecto de la aplicación de ondas de ultrasonido en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Gll, y utilizaron como marcador de autólisis las actividades enzimáticas LDH, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-FDH) y postprolina dipeptidil aminopeptidasa (PPDA). En este trabajo, las actividades LDH y la G-6-FDH sólo fueron detectadas después del tratamiento de atenuación con ultrasonido, a diferencia de la actividad PPDA que sí fue detectada en el sobrenadante pero en niveles muy bajos.

En el presente trabajo, se encontró que los tratamientos más efectivos para disminuir la carga celular de los cultivos de las dos cepas en estudio, causando la permeabilización y/o la liberación de las enzimas de interés, y que a su vez no provocaron la inactivación de las enzimas fueron: mutanolisina, SDS, etanol, ultrasonido y disruptor.

El efecto hidrolítico de la mutanolisina sobre el peptidoglicano de la envoltura celular de las bacterias ha sido informado en diversas especies de bacterias (Hamada y col., 1978;

Calandra y Cole, 1980; Kämpfer, 1995; Raddadi y col., 2004) entre ellas algunas BAL tales como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus thermophilus* (Crow y col., 1993b; Coolbear y col., 1994; Fernández de Palencia y col., 1995; Bunthof y col., 2001; Piuri y col., 2005; Palomino, 2011). En el presente estudio, la aplicación de mutanolisina disminuyó el recuento en aproximadamente un orden logarítmico, lo que aparece como una disminución moderada por comparación con los otros métodos estudiados, pero además fue capaz de permeabilizar las células, y las enzimas de interés mostraron incrementos importantes tanto en la fase asociada a las células como en el sobrenadante. Una disminución similar en la viabilidad fue informada por Bunthof y col. (2001) en *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 después de someter a un tratamiento con 100 U de mutanolisina. En nuestro estudio, observamos que una concentración similar es suficiente y no merece ser incrementada ya que no provoca mayor permeabilización. La severa desventaja que presenta este tratamiento es, además de su costo elevado, el hecho de que la enzima no puede agregarse a alimentos por razones de seguridad.

Por otro lado, en el caso del tratamiento con SDS, se produjo una abrupta caída en la viabilidad de los cultivos *S. thermophilus* 1 y 2. Otros autores han informado del efecto negativo del SDS en el crecimiento y la viabilidad de *S. thermophilus*. Somkuti y Steinberg (1994) no detectaron crecimiento para ninguna de las seis cepas de *S. thermophilus* que estudiaron, después de someterlas a un tratamiento con SDS 0,05 %. Además de la inhibición del crecimiento, informaron una disminución de la población de más de seis órdenes logarítmicos después del tratamiento. Una reducción de la viabilidad e inhibición del crecimiento por el tratamiento con SDS similar fue reportado para la cepa *S. thermophilus* ST128 (Somkuti y Steinberg, 1995; Somkuti y col., 1996), quienes por otra parte también observaron una permeabilización de las células similar a la del presente estudio. Nuestras observaciones permiten verificar que en cuanto a los índices de liberación de enzimas, el SDS fue más efectivo en permeabilizar las células que en liberar ambas enzimas ensayadas al sobrenadante. La permeabilización de  $\beta$ -GAL fue más eficiente que la de LDH. El efecto de agentes surfactantes sobre las células bacterianas ha sido estudiado desde hace mucho tiempo, por ejemplo el SDS sobre las membranas de *Escherichia coli* (Woldringh 1970; Woldringh y van Itersen, 1972). Las desventajas de la aplicación de SDS pueden resumirse en una disminución de la viabilidad demasiado elevada y en el hecho de que no es una sustancia permitida para agregado a alimentos.

Al igual que el SDS, el etanol provocó la completa pérdida de la viabilidad del cultivo, tanto para St1 como para St2. Este resultado no es sorprendente; es bien conocido el efecto

antimicrobiano de los alcoholes (por ejemplo: etanol, isopropanol, n-propanol) (McDonnell y Russell, 1999). La viabilidad de una cepa de *S. thermophilus* luego del tratamiento con etanol también fue estudiada por Somkuti y col. (1998), quienes lo hicieron a diferentes concentraciones de etanol, y hallaron que a concentraciones iguales o mayores a 30 % el cultivo resultaba totalmente inactivado. Doolan y Wilkinson (2009) informaron resultados similares para lactococos, ya que después de someter a tres cepas de *Lactococcus lactis* a un tratamiento con isopropanol en tres concentraciones (50, 70 y 100 %), tampoco observaron viabilidad. La disminución de la viabilidad provocada por un tratamiento con alcohol ha sido informada también para levaduras, tales como *Kluyveromyces fragilis* (Fenton, 1982). En nuestro trabajo, el etanol fue efectivo para permeabilizar las células de *S. thermophilus* de las dos cepas estudiadas, lo que se evidenció fundamentalmente por un incremento importante de la actividad  $\beta$ -GAL total; sin embargo no fue eficiente para liberar la enzima al sobrenadante. En cuando a la LDH, la actividad muy baja en ambas fracciones (células y sobrenadante) por un lado indica que la enzima es menos fácilmente permeada hacia el medio pero por otra parte puede sugerir que se inactivó como consecuencia de la presencia del alcohol. El efecto de la concentración de los alcoholes como agentes de permeabilización y su efecto sobre algunas enzimas intracelulares han sido estudiado por diversos grupos de investigación (Fenton, 1982; Somkuti y Steinberg, 1995; Exterkate y col., 2001; Exterkate, 2006; Doolan y Wilkinson, 2009). Somkuti y col. (1998) reportaron que la actividad  $\beta$ -galactosidasa aumentaba después del tratamiento con etanol hasta un 40-50 %, concentración límite ya que por encima de ese nivel de alcohol comenzaba a disminuir. El incremento en los niveles de  $\beta$ -GAL también ha sido observado como consecuencia de tratamientos con metanol, etanol, isopropanol, butanol y t-butanol utilizados como agentes permeabilizantes, en células de *Kluyveromyces fragilis* (Fenton, 1982). Es importante destacar que la concentración óptima del alcohol para aumentar la accesibilidad de las enzimas varía según la enzima: se ha informado, por ejemplo, un aumento de la accesibilidad de la actividad máxima de PepN utilizando butanol al 5 %, mientras que sobre esa concentración la actividad disminuía de forma significativa; sin embargo la actividad PepX continuó aumentando hasta una concentración de 8 % (Exterkate, 2001; Exterkate y col., 2006). Doolan y Wilkinson (2009), quienes estudiaron la influencia de diferentes concentraciones de isopropanol (50, 70 y 100) en dos cepas de *Lactococcus lactis*, observaron un incremento de la actividad PepX para una de las cepas (*L. lactis* AM2) pero no para la otra (*L. lactis* HP).

Todos estos resultados previos que indican diferencias en la liberación de diversas enzimas son consistentes con lo observado en el presente trabajo para LDH y  $\beta$ -GAL e

indican que la permeabilización no puede ser generalizada para todas las cepas, ni para aumentar todas las enzimas. La ventaja de la aplicación de etanol es que el cultivo así tratado podría ser utilizado como un biocatalizador no viable en la industria alimentaria, con una ventaja superior respecto a otros solventes utilizados para permeabilizar que son nocivos para la salud (acetona, tolueno).

Cuando se pasa a los métodos físicos para provocar daño a las membranas celulares, los resultados arrojados por la aplicación de una etapa de disrupción mecánica en un disruptor celular de perlas demostraron ser los esperados para la técnica empleada. En efecto, el disruptor celular ha sido especialmente diseñado para obtener extractos libres de células en el laboratorio, para, entre otros propósitos, determinar las actividades enzimáticas (Husson-Kao y col., 2000; Nardi y col., 2002; Malone y col., 2002, 2003; Kieronczyk y col., 2003; Helinck y col., 2004; Lee y col., 2007; Thomas y col., 2010). En nuestra experiencia, el disruptor se aplicó para obtener cultivos lisados, lográndose niveles de ruptura celular similares a otros que se informaron previamente (Woodrow y Quirk, 1982; Carlson y col., 1995; Shah y Lankaputhra, 1997; Jem, 2002; Geciova y col, 2002). La disminución de los recuentos, que estuvo entre 2 y 4 log, no alcanzó, sin embargo, valores tan elevados como los de etanol y SDS. La liberación de  $\beta$ -GAL fue elevada, como se esperaba de la aplicación de este método. Sin embargo, se verificó una baja actividad de LDH, lo que plantea interrogantes sobre el efecto del tratamiento mecánico sobre la actividad de esta enzima. Hummel y Kula (1989) propusieron este método de disrupción para la medida de LDH en varias especies de lactobacilos (*Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, entre otras) como así también en levaduras. Bury y col. (2001) utilizaron esta metodología para liberar la  $\beta$ -GAL de la cepa *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 y Agerkvist y Enfors (1990) lo aplicaron con la misma finalidad en *E. coli*. Mayerhoff y col. (2008) utilizaron el disruptor de perlas para liberar xylosa reductasa de *Candida mogii*. Esta tecnología también ha sido aplicada en *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual se midió la actividad G-6-FDH (Ricci-Silva y col., 2000).

El ultrasonido mostró una eficacia comparativamente menor para reducir la viabilidad de St1 y St2, que no superó el orden logarítmico. La poca influencia del tratamiento con ondas ultrasónicas sobre la viabilidad de *S. thermophilus* fue similar a la hallada en otros estudios realizados sobre *Lactococcus lactis* (Doolan y Wilkinson 2009), *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* y *Lb. acidophilus* (Wang y Sakakibara, 1997), que en general no observaron variaciones importantes en la viabilidad. Además, a través de ensayos de microscopía electrónica de transmisión, se informó que las células de *Lb. delbrueckii* sometidas a ondas ultrasónicas

presentaban de interrupciones y poros en las envolturas celulares, sin embargo el contenido citoplasmático permanecía intacto (Bury y col., 2001), la que puede relacionarse con las observaciones de MO de la presente tesis. Moncada y Aryana (2012) estudiaron el efecto de las ondas de ultrasonido en las características de la cepa comercial *S. thermophilus* STM5, en donde la viabilidad disminuyó menos que un orden logarítmico. Resultados similares fueron obtenidos para *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12 (Moncada y col., 2012). Por otro lado, Sakakibara y col. (1994) informaron que durante la fermentación de leche con *Lactobacillus delbrueckii* bajo irradiación con ultrasonido, se produjo una disminución de la viabilidad; sin embargo, al detener el tratamiento se observó una recuperación debido a que el ultrasonido no destruyó la habilidad de propagación de la cepa. Un estudio más actual informa sobre el efecto de la fase de crecimiento y la cápsula de bacterias sobre la resistencia de las BAL al ultrasonido, habiéndose observado que los microorganismos con una pared más gruesa son altamente resistentes a este tratamiento (Gao y col., 2014). A diferencia de la baja influencia en la viabilidad, el tratamiento de ultrasonido fue eficaz para aumentar la accesibilidad de ambas enzimas estudiadas, cuyas actividades total y liberada se incrementaron. Debido a la importancia que tiene la actividad  $\beta$ -GAL en la elaboración de alimentos con bajo contenido de lactosa, existen numerosos trabajos que proponen la aplicación de ultrasonido para liberar la enzima  $\beta$ -GAL o facilitar el acceso del sustrato (Wang y Sakakibara, 1997; Kreft y Jelen, 2000; Bury y col., 2001; Kreft y col., 2001; Choonia y Lele, 2011; Sulaiman y col., 2011; Kiani y col., 2013, entre otros), varios de ellos con resultados positivos como el caso de la presente tesis.

Por otra parte, los tratamientos térmicos incluyendo congelamiento y aplicación de calor, en general mostraron menor efecto en el conjunto de los índices de permeabilización/lisis estudiados. St2 experimentó una disminución importante de la viabilidad al aplicar congelación, pero este efecto no se verificó para St1, y el tratamiento térmico seleccionado (63 °C 20 s) tuvo una influencia menor en ambas cepas. La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento y la supervivencia de los microorganismos y el efecto que produce sobre la viabilidad depende del tipo de microorganismo y de la relación tiempo/temperatura, entre otros factores, como la matriz en la que se lleva a cabo el cambio de temperatura. En cuanto al congelamiento, el hecho de que los resultados fueran dispares entre las cepas, pone énfasis en que este tipo de propiedades puede mostrar diferencias incluso dentro de la misma especie. Doolan y Wilkinson (2009) no observaron diferencias importantes después de someter a -196 °C por 30 s a las células de *L. lactis*. Por otro lado, El Soda y col. (2000) reportaron una disminución de 1 a 2 órdenes logarítmicos en una cepa de

*Lb. helveticus* y en dos cepas de *Lb. casei* después de un tratamiento de congelación de -24 °C, por 40 horas. En lo que concierne a la aplicación de calor, existen numerosos estudios que observaron la pérdida total de viabilidad después de un tratamiento térmico como Doolan y Wilkinson (2009) o, en algunos casos, tuvieron importantes reducciones, tal es el caso de Lee y col. (2007) en *Lb. helveticus* DPC 4571, que observaron reducciones de 9,3 a 4,3 log, con tratamientos más enérgicos (69 °C por 25 s). El Soda y col. (2000) observaron una reducción de 3 órdenes logarítmicos en cepas de lactobacilos, después de un tratamiento térmico (65 °C - 15 s), tratamiento que fue muy similar al aplicado en el presente trabajo.

Los bajos niveles de actividades LDH y  $\beta$ -GAL total y liberada, tanto por congelamiento como por aplicación de calor, que fueron inclusive menores que en las suspensiones celulares control, indicarían que las células no sufrieron cambios importantes en las membranas que hicieran que aumente la accesibilidad. Si bien existen algunos estudios recientes que indican un aumento de aroma de los quesos con células tratadas por congelación, poco se conoce sobre las actividades enzimáticas después de congelar. Doolan y Wilkinson (2009) estudiaron la actividad de dos peptidasas en tres cultivos de *Lactococcus lactis* después de someter a un tratamiento de congelado. Los niveles de la actividad Pep X liberados fueron bajos, a diferencia de la actividad PepN, que fueron más altos respecto a las células sin tratar. Además de las variaciones según la enzima, también observaron diferencias entre las tres cepas estudiadas. Para la aplicación de calor, los niveles de LDH y  $\beta$ -GAL resultaron muy bajos, lo que es consistente con lo informado en otros trabajos en los que aplicaron tratamientos térmicos de intensidad similar. Doolan y Wilkinson (2009) informaron que no hubo un aumento de actividad enzimática por el tratamiento térmico, probablemente por la baja permeabilización de las células y consecuente liberación de las enzimas al medio circundante, a lo que probablemente se suma la desnaturalización de las enzimas. El Abboudi y col. (1991) también reportaron pérdida de actividad proteolítica después de diferentes tratamientos térmicos. Bunthof y col. (1999) observaron pérdida de actividad glicolítica y capacidad acidificante después de someter a tratamientos térmicos de 70 °C y 60 °C durante 10 min y 90 s, respectivamente.

Cuando se aplicaron tratamientos de más de un factor, como en los casos de SDS-Congelación, o SDS-Calor, se observó que el efecto del conjunto fue similar al del factor individual SDS, lo que sugiere que fue este tratamiento el que predominó en el daño a las envolturas celulares verificado. Lo mismo sucedió con etanol-calor y etanol-congelación, que mostraron perfiles similares a la aplicación de etanol solamente.

## **5. Conclusiones**

De los estudios realizados sobre dos cepas comerciales de *S. thermophilus* se puede concluir que los tratamientos de atenuación propuestos tuvieron diferentes efectos en la viabilidad celular y en las enzimas ensayadas, hallándose varios entre ellos capaces de influir sobre las envolturas celulares y contribuir a la permeabilización de las células. Los tratamientos de SDS y etanol fueron los que más afectaron la viabilidad, y por lo tanto los fermentos sometidos a estos tratamientos deberían ser utilizados junto a fermentos de células vivas no tratadas, si así lo requiriera la tecnología del producto, por ejemplo la elaboración de queso, a los fines de mantener la curva de descenso de pH, o bien la legislación, como en el caso de yogurt. El resto de los tratamientos no afectó la viabilidad y en principio los cultivos tratados podrían ser utilizados solos, aunque debería controlarse si sus propiedades tecnológicas, por ejemplo de descenso de pH continúan verificándose.

En cuanto al aumento de actividad LDH y  $\beta$ -GAL, los tratamientos con SDS y Etanol resultaron ser eficientes como agentes permeabilizantes, mientras que la Mutanolisina, Ultrasonido y Disruptor mecánico resultaron buenos métodos de lisis celular.

Aunque se haya obtenido un aumento importante de actividad enzimática en las células de *S. thermophilus* atenuadas, y se puede inferir que junto con la LDH y  $\beta$ -GAL se podrían liberar otras enzimas intracelulares, cada estudio de atenuación debería complementarse con ensayos tendientes a develar la actividad de las enzimas de interés, dado que los tratamientos afectan de manera distinta a cada enzima.



## Capítulo 3

*“Influencia de cultivos atenuados de  
Streptococcus thermophilus en la  
producción de compuestos de aroma en  
queso”*

## **1. Introducción**

La formación de compuestos de aroma durante la maduración del queso es un proceso complejo que puede considerarse que se inicia con las primeras reacciones de degradación de los principales componentes de la leche: proteínas, lípidos, lactosa y citrato. En el caso de los dos primeros grupos, los compuestos de menor tamaño derivados de la hidrólisis, por un lado péptidos y aminoácidos, y por otro los ácidos grasos libres, se constituyen en los principales precursores de compuestos volátiles de aroma y sabor. Además, los ácidos grasos de cadena corta poseen de por sí un impacto significativo en el aroma, en tanto que los aminoácidos y pequeños péptidos contribuyen al sabor de fondo y a la nota conocida como “umami”. Por su parte, el catabolismo de la lactosa y el citrato puede contribuir en forma directa a la biogeneración de flavour en el queso. Todas estas transformaciones, en los quesos madurados internamente con bacterias, es decir sin hongos ni flora superficial, son principalmente derivadas de la acción de las bacterias lácticas (BAL), tanto pertenecientes al fermento como no fermento o NSLAB. La generación de aroma, específicamente, está fuertemente relacionada al catabolismo de los aminoácidos, que puede producir alrededor del 50 % de los compuestos más importantes (Yvon, 2006).

Numerosos estudios correlacionan en forma positiva la autólisis del cultivo iniciador y el aumento de la proteólisis en diversos tipos de queso (Crow y col., 1993, 1995; Chapot-Chartier y col., 1994; Wilkinson y Kilcawley, 2005., 1994; O’Donovan y col., 1996; El-Kholy y col. 1998; Valence y col., 2000; Deutch y col., 2002; Hannon y col., 2003). Esta relación se explica por el hecho de que al producirse la lisis celular, las endopeptidasas se liberan en la masa del queso y tienen mayor accesibilidad a sus sustratos. La información disponible de la relación de autólisis con la lipólisis de los quesos es un poco más limitada, pero hay algunos trabajos que abordan este tema con resultados positivos (Dupuis y col., 1993; Lemee y col., 1994; Collins y col., 2003a).

Debido a la influencia que tiene la autólisis de los fermentos lácticos en la maduración del queso, y sumado a que la capacidad de los microorganismos de permanecer viables, morir y/o lizar en determinadas condiciones ambientales es una característica propia de cada cepa (Langsrud y col., 1987; Chapot-Chartier y col., 1994; Wilkinson y Kilcawley, 2005., 1994; Lortal y col., 1997; Boutrou y col., 1998; Valence y col., 2000), en las últimas décadas se han realizado numerosos estudios de atenuación de BAL. Muchos de estos trabajos están enfocados a favorecer el uso de cepas de interés como paquetes enzimáticos, independientemente de si se trata originalmente de una cepa autolítica. Los métodos de atenuación estudiados incluyen: i) ondas ultrasónicas (Bury y col., 2001; Tabatabaie y

### Capítulo 3

Mortazavi, 2010; Moncada y col., 2012); ii) bacteriocinas (Morgan y col., 1997; 2002; O'Sullivan y col., 2003; Martínez-Cuesta y col., 2006); iii) enzimas líticas (Coolbear y col., 1994; Bunthof y col., 2001); iv) choque térmico (Aly, 1994; El Shafei, 1994; Farkye y col., 1995; Flint y col., 2002; Prasad y col., 2003; Lee y col., 2007); v) congelación (Pettersen y col., 1975; Chapman, 1978; Aly, 1990; El Soda y col., 1992; El Shafei, 1994; Doolan y Wilkinson, 2009); vi) inducción de profagos (Chapot-Chartier y col., 1994; Stokes y col., 2001); vi) agentes químicos (Somkuti y col., 1996, 1998; Sheehan y col., 2005; Faijes y col., 2007; Doolan y Wilkinson, 2009); vii) altas presiones (O'Reilly y col., 2002; Upadhyay y col., 2007) y viii) microfluidización (Hayes y col., 2011).

En quesería, la permeabilización de las envolturas celulares de las BAL es una estrategia generalmente aplicada para acelerar la maduración del queso e intensificar el aroma. Debe contemplarse en la aplicación de la misma el hecho de que se considera que un adecuado balance de células vivas, muertas y lisadas es necesario para conseguir los cambios bioquímicos y organolépticos deseables. En efecto, algunas reacciones enzimáticas necesitan que la célula se encuentre metabólicamente activa, aunque no necesariamente en estado cultivable, para tener lugar. Otras se verificarán en células que no son viables, pero que conservan los contenidos celulares en sus envolturas, más o menos permeabilizadas, y por último otras reacciones -como la peptidólisis- son claramente favorecidas por la lisis y la liberación de las enzimas al medio del alimento (Chapot-Chartier y col., 1994; Wilkinson y col., 1994; Wilkinson y Kilcawley, 2005; Crow y col., 1995; El-Din y col., 2002; Morgan y col., 2002; Hynes y col., 2003; Bergamini y col., 2006).

Además de su aplicación en quesería para acelerar la maduración o formar compuestos de aroma, los métodos de atenuación de BAL se han propuesto para una diversidad de usos: i) Somkuti y col. (1998) ensayaron atenuación mediante alcohol etílico en *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, con la finalidad de aumentar la actividad de hidrólisis de la lactosa; ii) Krishnan y col. (2000) estudiaron la influencia de células de *Lb. plantarum* atenuadas en la biosíntesis de ácido láctico; iv) Zotta y col. (2008b) indujeron la permeabilización para favorecer la producción de ureasa en *S. thermophilus*; v) Geckil y col. (2005) aplicaron atenuación a *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, con la finalidad de aumentar la liberación de L-asparaginasa, enzima utilizada con fines terapéuticos y vi) Krueger y col. (2002) publicaron una patente en donde utilizan mutanolisina con la finalidad de liberar y obtener fragmentos de las paredes celulares de BAL, llamados muramilpéptidos, para usos terapéuticos, ya que tienen la función de mejorar la calidad del sueño.

Claramente, la permeabilización de las células no sólo aumenta la accesibilidad de las enzimas involucradas específicamente en la formación de aroma sino que modifica el contacto de todas las enzimas intracelulares con sus potenciales sustratos. La actividad bioquímica de la enzima dependerá de la necesidad de cofactores y de las condiciones ambientales, entre otras variables.

Los fermentos primarios de *S. thermophilus* son de uso mayoritario en nuestro país, donde se aplican a la elaboración de quesos blandos y semiduros. Si bien numerosas cepas de esta especie poseen enzimas clave para la bioformación de compuestos de aroma, como aminotransferasa y glutamato dehidrogenasa, así como diversas peptidasas, en general los cultivos de *S. thermophilus* acidifican correctamente pero producen poco aroma. La adición de cultivos atenuados se ha planteado como una estrategia para mejorar este aspecto, a través de un incremento de la accesibilidad de los sustratos a las enzimas intracelulares. El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la atenuación de *S. thermophilus* sobre la bioformación de compuestos de aroma en dos modelos de quesos Cremoso.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Diseño experimental**

La influencia de células atenuadas de *S. thermophilus* en la producción de compuestos de aroma por el metabolismo de aminoácidos se estudió en dos modelos experimentales: i) quesos Cremosos miniatura y ii) extractos estériles de queso Cremoso.

Las pruebas de los quesos miniatura se dividieron en dos experiencias: en la primera se aplicaron tratamientos de atenuación con etanol y mutanolisina sobre el fermento *S. thermophilus*, mientras que en la segunda, las células fueron atenuadas con ultrasonido, disruptor de perlas y dodecil sulfato de sodio (SDS).

En el modelo de extracto de queso estéril, se ensayaron tratamientos de atenuación con etanol y ultrasonido. En la **Tabla 3.1** se presenta el resumen del diseño experimental, con el código de cada una de las muestras.

**Tabla 3.1.** Diseño experimental

Modelo	Experiencia	Control	Experimental
Quesos Miniatura	1	fermento sin atenuar	fermento sin atenuar + atenuado/mutanolisina <b>EM</b>
		<b>C</b>	fermento sin atenuar + atenuado/alcohol <b>EA</b>
	2	fermento sin atenuar	fermento sin atenuar + atenuado/ultrasonido <b>EU</b>
		<b>C</b>	fermento sin atenuar + atenuado/disruptor <b>ED</b> fermento sin atenuar + atenuado/SDS <b>ES</b>
Extracto de Queso		sin células	células atenuadas/ultrasonido <b>Stu</b>
		<b>C</b>	
		células sin atenuar	células atenuadas /alcohol <b>Sta</b>
		<b>St</b>	

## 2.2 Cepas y condiciones de crecimiento

Para este estudio se seleccionó la cepa comercial *S. thermophilus* 2, debido a que fue la cepa que presentó los niveles de actividad GDH más altos. La cepa congelada, fue reactivada y repicada dos veces en caldo Elliker (Biokar Diagnostics, Allonne, Francia) incubando cada repique por 16-18 h a 37 °C.

La misma cepa de *S. thermophilus* se utilizó como fermento en la elaboración de los quesos miniatura y en la preparación de los quesos Cremosos elaborados a escala piloto, a partir de los cuales se obtuvieron los extractos. De esta manera el fermento láctico iniciador, que se utilizó en los distintos experimentos, y el cultivo atenuado, siempre consistió en la misma cepa.

Para cada experiencia de elaboración de quesos miniatura, la cepa *S. thermophilus* 2 se inoculó al 2 % en 30 mL de caldo Elliker, y se incubó a 37 °C hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 1,8, correspondiendo a una concentración de  $\sim 5 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Luego, se procedió a centrifugar el cultivo (12000 g - 10 min - 4 °C) para separar las células del medio. Posteriormente para eliminar los restos del medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7 (buffer de lavado). Al finalizar el segundo lavado, el pellet se resuspendió en 30 mL de leche estéril, se enfrió y se conservó a 4 °C hasta el momento de elaboración de quesos, tiempo que en ningún caso fue mayor de 4 horas. En cada

tina de elaboración que contenía 2 L de leche pasteurizada se inoculó 5 mL ( $\sim 2 \cdot 10^9$  UFC) de este fermento preparado, lo que nos permitiría tener una concentración de células en la leche de elaboración de  $\sim 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### **2.3 Atenuación de las células de *Streptococcus thermophilus***

Las células de *S. thermophilus* para los tratamientos de atenuación fueron obtenidas de la misma manera que el fermento sin atenuar descrito en el apartado anterior, pero con la diferencia de que la inoculación al 2 % fue realizada en un volumen de 50 mL de caldo Elliker, y al finalizar los lavados, en vez de resuspender las células en leche estéril, las mismas se resuspendieron: i) en 20 mL y 1666  $\mu$ L de buffer de lavado para los tratamientos físicos de ultrasonido y disruptor de perlas, respectivamente, ii) en 5 mL de etanol 40 % y 50 mL de SDS 0,1 % para los tratamientos químicos; o iii) en 2,5 mL de una solución de mutanolisina de 100 U, para el tratamiento enzimático. Además, todos los tratamientos se llevaron a cabo con las mismas temperaturas y tiempos descritos en el capítulo 2: ultrasonido 47 kHz 80 w (1 h - 10 °C), disruptor de perlas (3 ciclos de 1 min - 5 °C), etanol 40 % (30 min - 37 °C), SDS 0,1 % (30 min - 37 °C) y mutanolisina 100 U (22 h - 37 °C).

En los tratamientos con etanol y SDS, ambos agentes químicos fueron eliminados después de la atenuación por sucesivos lavados con el buffer y, por último, las células se resuspendieron en 20 mL de buffer de lavado y fueron conservadas a 4 °C hasta la elaboración. Para el caso del tratamiento de ultrasonido, luego de finalizar el mismo, las suspensiones celulares tratadas se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la elaboración. En el disruptor celular de perlas, después del tratamiento se procedió a separar las células, detritos celulares y perlas de vidrio por centrifugación (16000 g - 15 min - 10 °C), para obtener el extracto libre de células (sobrenadante), que fue diluido en buffer de lavado a un volumen igual que el resto de los tratamientos y conservado a 4 °C hasta el momento de agregarlo a la leche de quesería.

### **2.4 Modelo de queso miniatura**

La evaluación del cultivo atenuado de *S. thermophilus* en la formación de compuestos de aroma se realizó en un modelo de queso miniatura, en dos experiencias. En la primera se elaboraron tres tipos de quesos: 1 queso control con el fermento sin atenuar (**C**), un queso experimental con el cultivo atenuado con mutanolisina + el fermento sin atenuar (**EM**) y un queso experimental con el cultivo atenuado con alcohol + el fermento sin atenuar (**EA**). En la segunda experiencia, se elaboraron cuatro tipos de quesos: 1 queso control con el fermento sin

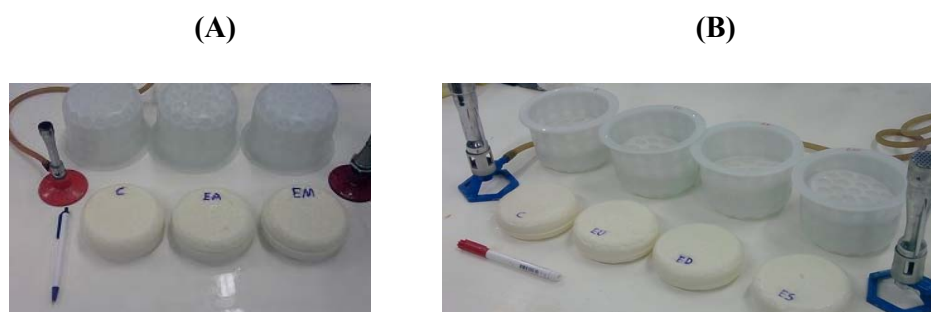
atenuar (**C**), 1 queso experimental con cultivo atenuado mediante ultrasonido + el fermento sin atenuar (**EU**), 1 queso experimental con cultivo tratado mediante disruptor de perlas + el fermento sin atenuar (**ED**), 1 queso experimental con cultivo atenuado con dodecil sulfato de sodio + el fermento sin atenuar (**ES**).

En todos los casos, el único cultivo utilizado fue *S. thermophilus* 2, ya sea sometido a tratamientos o no, según se buscara un rol de cultivo atenuado o fermento láctico. En los quesos experimentales se agregaron tanto los fermentos atenuados como el cultivo sin tratar, para garantizar la función tecnológica principal del fermento iniciador, esto es, la acidificación. Los cultivos atenuados funcionaron como proveedores de enzimas y se compararon con los controles - que sólo contenían el fermento no atenuado - a los efectos de detectar diferencias en la bioformación de volátiles.

Las experiencias se realizaron por triplicado, en diferentes días de elaboración y con leche diferente, lo que vale decir que por cada tipo de queso se obtuvieron tres réplicas de elaboración. Se utilizó leche de silo de gran mezcla, cruda, que se transportó bajo refrigeración desde una planta láctea cercana (Milkaut S.A., Franck, Santa Fe, Argentina). Al llegar al laboratorio se pasteurizó por método discontinuo a 65 °C durante 30 min.

Los quesos Cremosos miniatura fueron elaborados en condiciones microbiológicas controladas con 2 L de leche cada uno. Las tinas de elaboración consistieron en vasos de precipitado de 3 L de capacidad con tapa, que fueron modificados por Milesi (2008) para que el cierre sea esmerilado, y así mantener las condiciones de asepsia durante la elaboración. Todo el material de vidrio (tinas mini, pipetas, probetas) y material metálico (instrumentos de corte, mezclador, caja metálica para almacenar los miniquesos) fue esterilizado en estufa durante 4 h a 180 °C. Los medios de cultivo, buffer de lavado, tubos falcon y el resto del material necesario para la elaboración se esterilizó en autoclave. Luego de pasteurizar la leche, se trasvasaron 2 L a cada tina y se dejó enfriar a 37 °C. Las tinas se mantuvieron durante la elaboración dentro de un baño termostatzado a 37 °C. Luego se adicionó a la leche de cada tina 0,4 g de CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania), pesado en esterilidad y disuelto en agua estéril. Posteriormente, se adicionó el fermento: i) *S. thermophilus* sin atenuar o ii) *S. thermophilus* sin atenuar + *S. thermophilus* atenuado, según correspondiera a cada queso control o experimental, respectivamente. Transcurridos 15 minutos, se adicionó 0,0225 g/L del coagulante Maxiren®, (9 g quimosina activa/1000 g, Gist-Brocades, Seclin, Francia) a la leche de elaboración. El tiempo de coagulación fue aproximadamente de 18-20 min, luego de lo cual se esperó un período similar para que el coágulo obtenga la consistencia necesaria para el corte o lirado. El lirado se realizó con instrumentos miniatura, de manera de obtener cubos

de un volumen de aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$ . El coágulo se dejó 3 min en reposo, y luego se realizó en tres oportunidades una agitación suave durante 2 min. Posteriormente se procedió a realizar el drenado del suero y moldeo de la cuajada en moldes estériles miniatura. Los moldes con los miniquesos fueron introducidos en una caja metálica (estéril) provista de un fondo de rejilla para permitir el drenado del suero remanente, y mantenidos en estufa a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta que el pH de los quesos alcanzó un valor de 5,20 - 5,30. Durante el período de descenso de pH, los quesos se invirtieron cada 30 min y se fue verificando la evolución del pH. Alcanzado el pH fueron desmoldados e introducidos en salmuera estéril (20 % p/v, pH: 5,40 y T:  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por separado en las mismas tinas donde se realizó la elaboración. Luego de 10 min, los quesos se retiraron de la salmuera y se colocaron nuevamente en la caja de acero inoxidable dentro de los moldes y se los almacenó durante toda la noche a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pasadas las 24 h, se secaron con papel de filtro estéril, en condiciones de esterilidad, y se envasaron al vacío. Finalmente los quesos elaborados de aproximadamente 250 g se envasaron al vacío y se almacenaron a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 60 días para la maduración.



**Figura 3.1.** Quesos Cremoso miniatura elaborados en condiciones microbiológicas controladas, inmediatamente después de la elaboración. Los gráficos **A** y **B** corresponden a una de las tres réplicas de la primera y segunda experiencia, respectivamente.

## 2.5 Modelo de extracto estéril

Para obtener un extracto estéril de queso en el cual ensayar la bioformación de compuestos de aroma, en primer lugar se partió de una elaboración ad hoc de quesos a escala piloto, según la tecnología estándar. Al igual que en el caso de los quesos miniatura se obtuvo leche cruda de gran mezcla de una planta láctea cercana. Luego de la pasteurización de 150 L ( $65 \text{ }^\circ\text{C}$  - 30 min), la leche se enfrió a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y se le adicionó cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta lograr una concentración final de 0,02 % (p/v). La cepa comercial *S. thermophilus* 2, que fue la misma que se utilizó para el modelo de queso miniatura, se dispersó en leche pasteurizada y se adicionó a las tinas en una concentración lo suficientemente alta para alcanzar recuentos de  $10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Pasados 15 min desde la



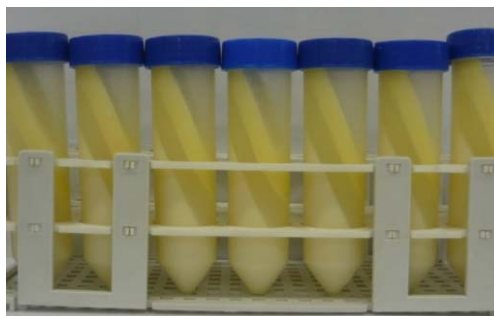
### Capítulo 3

adición del cultivo, se adicionó 67,5 mL de coagulante (Chymax, Chr. Hansen) a los 150 L de leche de elaboración. Para asegurar la correcta homogenización del mismo, los 67 mL se mezclaron con 200 mL de agua estéril antes de ser adicionados a la leche. La coagulación se llevó a cabo a 37 °C. Cuando el coágulo alcanzó una consistencia adecuada, se cortó en cubos grandes, de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>. La mezcla de suero y granos de cuajada se agitó suavemente durante 10 a 15 min, de manera de producir sólo una liberación limitada del suero retenido. Luego, la mezcla se dejó en reposo durante unos minutos para permitir que las partículas de cuajada se depositen en el fondo de la tina. El suero se drenó y la cuajada se colocó en los moldes, los que fueron incubados en cámara caliente (45 °C) hasta que la cuajada alcanzase un valor de pH comprendido entre 5,2 - 5,3. Finalmente, los quesos se salaron por inmersión en salmuera 20 % (p/v) pH 5,4, durante 4 h a 5 °C. Se obtuvieron 5 hormas de quesos de ~ 4 Kg, que se envasaron al vacío y se maduraron a 5 °C ( $\pm 0,5$  °C) durante 20 días (Hynes y col., 2001).



**Figura 3.2.** Hormas de quesos Cremoso elaborados en la planta piloto del INLAIN, inmediatamente después de la elaboración.

Los extractos de queso se prepararon a partir de los quesos Cremosos elaborados en la planta piloto, una vez que alcanzaron 20 días de maduración. El extracto se preparó homogenizando con una procesadora “minipimer”, partes iguales de queso y agua (1+1). La intensidad de la homogenización se seleccionó de manera de que fuera suficiente para dispersar todos los constituyentes del queso en el agua, pero no tan intensa como para que se forme una emulsión muy estable de la grasa en agua, ya que dificultaría las etapas posteriores de filtración. Para elegir las condiciones de homogeneización fueron necesarias algunas experiencias preliminares. El homogeneizado de queso obtenido se centrifugó a 17000 g - 15 min - 10 °C. De las tres fases obtenidas (grasa, fase acuosa, y proteínas) (**Figura 3.3**), fueron descartadas las fases sólidas superior e inferior, y se retuvo sólo la fase acuosa



**Figura 3.3.** Mezcla de queso y agua (1+1) después de ser sometida a un proceso de homogeneización y posterior centrifugación. Fase superior, inferior, e intermedia corresponden a la grasa, proteínas y fase acuosa, respectivamente.

El proceso de extracción se repitió las veces necesarias hasta obtener un volumen de 3 L. La fase acuosa fue sometida a distintos pasos de filtración para eliminar material emulsionado, en suspensión y microorganismos. En primer lugar se realizó un prefiltrado con un pre-filtro AP 25 EM de microfibras de vidrio (Millipore, San Pablo, Brasil), luego se filtró al vacío a través de papel de filtro Whatman N° 42 y finalmente por una membrana HV (Durapore) EM PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore, San Pablo, Brasil). Se cuantificó la concentración de cloruro por el método de Mohr (Kolthoff y col., 1988), y se ajustó a 1,5 % NaCl con el agregado de 55 mL de una solución estéril de NaCl al 30 %.

Por último, para asegurar la esterilidad de la matriz utilizada para estas experiencias, se calentó el extracto a 70 °C durante 30 min, y luego se enfrió rápidamente, bajo corriente de agua fría. El extracto fue fraccionado en botellas estériles, e inoculado con las células de *S. thermophilus* cuando correspondía. El diseño experimental incluyó los siguientes tratamientos: i) extracto sin inocular (**C**), ii) extracto inoculado con *S. thermophilus* sin atenuar (**St**), iii) extracto inoculado con el cultivo de *S. thermophilus* atenuado mediante ultrasonido (**Stu**) y iv) extracto inoculado con el cultivo de *S. thermophilus* atenuado con etanol (**Sta**). La experiencia se llevó a cabo por duplicado.

Luego de la inoculación, se dividieron los extractos en galerías de tubos estériles: tubos de ensayo con tapa (10 mL) destinados a los análisis de recuentos, pH, ácidos orgánicos y azúcares; y tubos con tapa negra a rosca (15 mL), provistos de cierre hermético, destinados a la determinación de compuestos volátiles. Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 14 días y durante ese período de incubación se fueron extrayendo los tubos correspondientes a cada día de muestreo.

## **2.6 Ensayos**

### **2.6.1 Composición global y pH**

El pH de los quesos miniatura se determinó por duplicado en las muestras de 3 y 60 días de maduración mediante el método de la American Public Health Association (APHA) (Bradley y col., 1993). Para tal fin, se utilizó un peachímetro Orion (Orion Research Incorporated, Estados Unidos), provisto de un electrodo combinado (vidrio y calomel), que se calibró con soluciones tamponadas de pH 4 y 7. La determinación se realizó directamente por inmersión del electrodo en una mezcla de queso en agua destilada (1+1), y el valor se registró cuando la lectura se estabilizó en un valor constante.

La medición del pH en los extractos de queso se determinó a los 0, 3, 7 y 14 días de incubación, aplicando la misma metodología de análisis sobre los extractos sin diluir.

La determinación del contenido de humedad en los quesos se realizó por secado de la muestra a  $102 \pm 1$  °C hasta pesada constante (FIL-IDF, 1982:4A). Para ello, se utilizó cristalizador y varilla de vidrio, al cual se agregaron aproximadamente 30 g de arena, previamente lavada y tratada con ácido clorhídrico concentrado. Este conjunto se llevó a sequedad en estufa a 102 °C durante 12 h, y luego se colocó en desecador durante ~ 1 h para que alcance temperatura ambiente. Una vez seco y enfriado en desecador, se determinó exactamente el peso del sistema de cristalizador, arena y varilla, antes y después de la adición de aproximadamente 1,5 g de la muestra de queso. El queso se dispersó en la arena utilizando la varilla de vidrio, para aumentar la superficie de evaporación de la muestra, y se llevó a estufa a 102 °C hasta pesada constante (aproximadamente 5 h). Las masas de la muestra húmeda y desecada se obtuvieron por diferencia y se utilizaron para calcular el contenido de humedad.

El contenido de materia grasa en los quesos se determinó mediante el método butirométrico de Gerber (FIL-IDF, 1997:152A), empleando un butirómetro específico para queso. Para ello, se pesaron aproximadamente 1,5 g de queso y se adicionaron lentamente, en orden decreciente de densidad, las siguientes soluciones: 10 mL de solución de ácido sulfúrico 90 % (v/v) (densidad 1,84), 8 mL de agua destilada y 1 mL de alcohol isoamílico. Se cerró el butirómetro y se agitó suavemente hasta disgregación total de las partículas de queso. Para facilitar la disgregación y lograr una separación óptima de la materia grasa durante la centrifugación, los butirómetros se colocaron en un baño de agua a 65 °C durante 10 min. Alcanzada dicha temperatura, las muestras se centrifugaron en una centrífuga específica para

butirómetros durante 10 min. Finalmente, los butirómetros se colocaron nuevamente en el baño de agua y se realizó la lectura a una temperatura de 65 °C.

El contenido de proteínas totales en los quesos se determinó mediante el método de Kjeldahl (FIL-IDF, 1993:20B). Se pesaron 0,3 g de queso en un vaso de precipitado, que luego se trasvasaron a un tubo de digestión mediante enjuagues con un volumen pequeño de agua destilada. Luego, se adicionaron los catalizadores (aproximadamente 3,5 g de sulfato de potasio y 100 mg de dióxido de titanio) y posteriormente, bajo campana, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado utilizando un dosificador. La mineralización de la muestra se llevó a cabo en una unidad digestora con capacidad para seis tubos y con un sistema de aspiración de vapores (Digestion System 6, 1007 Digester, Tekator, Suecia). Durante la digestión, la temperatura se incrementó gradualmente hasta alcanzar el punto máximo (420 °C). Se dio por finalizado el proceso de digestión cuando la muestra se tornó translúcida y límpida. El análisis del contenido de proteínas totales se realizó sobre el digerido mediante una destilación y posterior titulación. Cada tubo conteniendo la muestra digerida se conectó a una unidad destiladora automática. En primer lugar, se adicionó automáticamente hidróxido de sodio para transformar el amonio proveniente de las proteínas, péptidos y aminoácidos presentes en la muestra en amoníaco, y luego se inició la destilación por arrastre con vapor de agua. El destilado se colectó en un erlenmeyer conteniendo ácido bórico y 4 gotas de solución indicadora de punto final, compuesta por azul de metileno 0,1 % (p/v) y rojo de metilo 0,15 % (p/v) en etanol 96 % (v/v). El amoníaco destilado fue de esta manera capturado en forma de ión amonio en la solución recolectora. La destilación se realizó en un equipo BÜCHI Distillation Unit B-324 (Suiza), programado con los siguientes parámetros: 70 mL de hidróxido de sodio 32 % (p/v), 60 mL de ácido bórico 2 % (p/v), 3 minutos de destilación, 100 % de vapor, con aspiración de la muestra. Finalmente, las muestras destiladas y recogidas como borato de amonio se titularon con una solución valorada de ácido sulfúrico 0,1 N hasta el viraje del indicador de verde a fucsia, empleando una microbureta de 5 mL de capacidad. Para expresar el resultado en g % p/p de proteínas totales, al valor obtenido de nitrógeno total se le aplicó el factor de 6,38, que corresponde a proteínas lácteas.

### **2.6.2 Análisis microbiológicos**

Se pesaron en condiciones de asepsia 10 g de queso en un erlenmeyer estéril, y luego se adicionaron 90 mL de solución de citrato de sodio 2 % (p/v) estéril (autoclave, 121 °C - 15 min) (Microquim, Santa Fe, Argentina). La mezcla se homogenizó durante aproximadamente 2 min en un recipiente mezclador estéril, a fin de obtener la suspensión de queso que

representó la dilución  $10^{-1}$ . A partir de esta suspensión se realizaron diluciones decimales en agua de peptona de caseína 0,1 % (p/v) estéril (autoclave, 121 °C - 15 min) y se sembraron en superficie 0,1 mL de las diluciones apropiadas en medio Elliker agarizado y se incubaron a 37 °C para el *S. thermophilus* y en medio MRS agarizado 30 °C para controlar la ausencia de contaminaciones (NSLAB). Los recuentos fueron expresados en log UFC g<sup>-1</sup> de queso.

Los recuentos en los extractos de queso se hicieron en APC-Leche directamente sobre las diluciones en agua de peptona de caseína 0,1 %. Los recuentos fueron expresados en log UFC mL<sup>-1</sup> de extracto de queso.

### **2.6.3 Proteólisis: determinación de nitrógeno en fracciones solubles del queso**

El contenido de nitrógeno en distintas fracciones solubles del queso es un ensayo inespecífico muy usual para describir las características de la proteólisis en la muestra (Ardö, 1999). Las fracciones más comunes para determinar este avance en la hidrólisis de las caseínas son: nitrógeno soluble a pH 4,6, en ácido tricloroacético al 12 %, y en ácido fosfotúngstico; todas ellas se expresan como proporción del nitrógeno total (NS-pH 4,6/NT, NS-TCA/NT, NS-PTA/NT). El contenido de la fracción de NS pH 4,6 incluye proteínas (excluyendo las caseínas), todos los péptidos de hasta 30-35 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores, tales como aminas, urea y amoníaco. La fracción de NS-TCA está constituida por péptidos medios y pequeños conteniendo entre 2 a 22 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores, como aminas, urea y amoníaco. Por último, la fracción de NS-PTA contiene compuestos con un peso molecular hasta 600 daltons, que incluyen péptidos muy pequeños, aminoácidos y compuestos nitrogenados menores, excepto aminoácidos dibásicos (Lis, Arg y Orn) y amoníaco (Grappin y Beuvier, 1997; Ardö, 1999).

Para obtener las fracciones solubles, en primer lugar se preparó una suspensión de queso en citrato de sodio. Para tal fin, se homogenizaron 10 g de queso con 20 mL de solución de citrato de sodio 0,5 M y la suspensión homogénea se trasvasó a un vaso de precipitado adicionando agua destilada hasta completar un volumen de aproximadamente 90 mL. El pH de la suspensión se ajustó a 4,6 mediante la adición de HCl 20 % (v/v), bajo agitación mecánica. La muestra se trasvasó a un tubo falcon y se centrifugó a 3000 g durante 15 min, obteniéndose dos fracciones, una soluble y otra insoluble.

La fracción soluble se enrasó a un volumen de 100 mL por adición de agua destilada, se homogeneizó y se verificó su pH; en el caso de variaciones se ajustó nuevamente al valor indicado mediante adición de HCl 20 % (v/v) o NaOH 30 % (p/v) según correspondiera. Se

tomaron 10 mL con pipeta volumétrica para la determinación del contenido de nitrógeno que se realizó por digestión, destilación y posterior titulación como se indicó anteriormente. El contenido de nitrógeno de esta fracción representa el nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) (Gripon y col, 1975).

Las fracciones solubles en TCA y en PTA se obtuvieron a partir de la fracción soluble a pH 4,6 de acuerdo a la metodología descrita por Gripon y col. (1975). Para obtener la fracción soluble en TCA, a 15 mL de la fracción soluble a pH 4,6 se le adicionaron, lentamente y bajo agitación mecánica, 15 mL de solución de ácido tricloroacético al 24 %. La solución resultante se dejó reposar durante 30 min, luego de lo cual se agitó y se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 42. La solución obtenida representa la fracción soluble en TCA al 1 % (NS-TCA).

La fracción soluble en PTA se obtuvo mediante el agregado de 12,5 mL de ácido sulfúrico 25 %, e igual volumen de ácido fosfotúngstico 10 %, a 25 mL de la fracción soluble a pH 4,6. Luego de la agitación y reposo durante 24 h a 5 °C, la solución se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 42. El filtrado constituye la fracción soluble en PTA al 2,5 % (NS-PTA).

Los niveles de NS-TCA y NS-PTA en las muestras de queso se determinaron por el método de Kjeldahl, utilizando para el análisis 20 mL y 30 mL de dichas fracciones, respectivamente.

La determinación de las distintas fracciones nitrogenadas solubles del queso fue realizada sólo para la primera experiencia de quesos miniatura (C, EM, EA) a 30 y 60 días de maduración.

#### **2.6.4 Azúcares y ácidos orgánicos.**

El análisis de ácidos orgánicos y azúcares se llevó a cabo mediante HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, y un guardacolumna Aminex Cation-H (30 x 4,6 mm) (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos) para la separación cromatográfica. El cromatógrafo HPLC utilizado, marca Perkin Elmer Series 200 y Flexar (Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos), consta de una bomba cuaternaria, desgasificador en línea, inyector manual, horno para el control de la temperatura de la columna y dos detectores en línea: detector UV-visible y detector de índice de refracción (IR), interfase analógica y computadora provista de la aplicación Chromera® para el control del equipo y recolección/procesamiento de los resultados cromatográficos. El detector UV-Vis a una longitud de onda de 210 nm permitió cuantificar los ácidos orgánicos, mientras que el detector de IR fue utilizado para cuantificar los azúcares (lactosa y galactosa). La separación se realizó en forma isocrática a

0,6 mL / min con una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,016 M, a 32 °C. Para determinar la concentración de la fase móvil y la temperatura de trabajo más adecuada se realizó un estudio preliminar con soluciones patrones y una vez definidas las condiciones adecuadas de separación se realizaron las curvas de calibrado correspondientes de los azúcares y ácidos orgánicos a analizar.

La extracción de los ácidos orgánicos de las muestras de queso se realizó mediante el uso de un homogeneizador Ultraturax Ika T25 Digital (IKA Works, Staufen, Alemania), utilizando agua como solvente de extracción. De esta manera, 5 g de muestra fueron extraídos con 20 mL de agua, luego de lo cual se incubó a 40 °C durante 1 h y la fase soluble fue separada de las caseínas precipitadas y de la materia grasa por centrifugación (5000 g - 30 min - 20 °C). Finalmente, la fase acuosa se filtró y se llevó a un volumen final de 25 mL. En el caso de los extractos de queso, una alícuota de éstos fue centrifugada (5000 g - 10 min - 20 °C) con la finalidad de separar las células y las proteínas precipitadas durante la incubación. El sobrenadante obtenido fue diluido en la misma fase móvil (1/3). Un volumen de 60 µL de los extractos preparados fue inyectado en el HPLC.

### **2.6.5 Aminoácidos libres (AA)**

El perfil de aminoácidos libres fue determinado mediante HPLC utilizando un método de derivatización con 6-aminoquinolil-N hidroxisuccinimidil carbamato (ACQ). El equipo HPLC utilizado fue el mismo que el empleado en la determinación de ácidos orgánicos y azúcares.

Para la separación y cuantificación de los aminoácidos, se utilizó la metodología AccQ·Tag® (Waters Corp., Mildford MA, Estados Unidos), que consta de insumos (columna, tubos), y reactivos para la derivatización de los aminoácidos, así como los solventes utilizados como fase móvil. Se utilizó una columna Nova-Pak TM C18 de 3,9 mm x 150 mm con un tamaño de partícula de 4 µm, especialmente certificada para el uso con el método AccQ·Tag, y un guardacolumna C18 de 15 x 3,2 mm, 7 µm (Perkin Elmer). La temperatura utilizada durante las corridas cromatográficas fue 37 °C, la longitud de onda de detección 248 nm (UV), y el flujo 1 mL/min. Los solventes utilizados fueron los siguientes:

Fase móvil A<sub>AAL</sub>: solvente A concentrado AccQ·Tag®: Agua Bidestilada 2:20. El valor de pH del solvente diluido debe ser 5,02 ± 0,05. El solvente concentrado comercial se compone de: acetato de sodio trihidrato 19 %, ácido fosfórico 6-7 %, trietilamina 1-2 %, agua 72-73 %.

Fase móvil B<sub>AAL</sub>: Acetonitrilo: Agua Bidestilada 60:40.

El gradiente de elución utilizado (**Tabla 3.2**) fue el propuesto en el manual del método AccQ.Tag, con algunas modificaciones de acuerdo a Bergamini (2007).

**Tabla 3.2.** Gradiente de elución para la separación de los aminoácidos derivatizados.

	Tiempo total (min)									
	1	0,5	15	19	32	33	34	37	38	50
% A <sub>AAAL</sub>	100	98	93	87	66	66	0	0	100	100
% B <sub>AAAL</sub>	0	2	7	13	34	34	100	100	0	0

La muestra empleada para la determinación de AA fue la misma que para el análisis de ácidos orgánicos y azúcares: extracto soluble en agua de las muestras de queso y sobrenadante de los extractos obtenido luego de la centrifugación de los mismos. A 980  $\mu$ L de cada muestra (tal cual o luego de una dilución adecuada), se le adicionó 20  $\mu$ L de ácido  $\alpha$ -aminobutírico (Aaba) como estándar interno. Luego, se homogeneizó y se filtró a través de membranas de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore, San Pablo, Brasil). Posteriormente, se realizó la reacción de derivatización empleando el reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (ACQ) y buffer borato pH 8,8, ambos provistos en el kit del método AccQ.Tag®, de acuerdo a la metodología especificada en el protocolo correspondiente. Finalmente, se inyectaron 20  $\mu$ L de las muestras derivatizadas en el HPLC.

### 2.6.6 Compuestos volátiles

El análisis de los compuestos volátiles se realizó por microextracción en fase sólida (SPME) acoplado a un cromatógrafo gaseoso con detector de ionización de llama (FID).

En el caso de los quesos Cremosos miniatura, 5 g de muestra se pesaron en viales de 30 mL, mientras que para los extractos de queso, un volumen de 15 mL se colocó en cada vial. Para ambos casos, inmediatamente después de agregar la muestra al vial, se procedió a sellarlos herméticamente y se dispusieron en un baño de agua a 40 °C por 10 min. Luego, una fibra DVB / Car / PDMS 50 / 30 mm (Supelco, Inc. Bellefonte, Estados Unidos) se expuso en el espacio de cabeza de los viales durante 30 min a la misma temperatura.

Los analitos retenidos en la fibra fueron desorbidos térmicamente durante 5 min a 250 °C en el puerto de inyección de un GC (Perkin Elmer, modelo 9000), el cual estaba provisto de un *holder* (Supelco, Inc. Bellefonte, Estados Unidos) específico para la fibra.

El programa de temperatura de la columna PE-Wax (60 m x 0,25 mm x 0,25 mm) fue el siguiente: 45 °C (4 min), 8 °C / min hasta 150 °C (3 min), 10 °C / min hasta 250 °C (5 min).



Como gas carrier se empleó H<sub>2</sub> (2 mL / min). La temperatura del detector se mantuvo a 290 °C.

La mayoría de los compuestos se identificaron por comparación de los tiempos de retención con sus respectivos estándares (Sigma Aldrich, Italia) en un cromatógrafo de gases provisto de un detector FID y fueron confirmados por un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS); mientras que algunos pocos, solo se identificaron por GC-MS (Shimadzu).

Los picos identificados fueron integrados utilizando el software TotalChrom® (Perkin Elmer, Estados Unidos) y las áreas obtenidas fueron expresadas en unidades arbitrarias (Wolf, 2009). Los compuestos que presentaron valores de áreas menores a 5000 unidades arbitrarias fueron indicados como no detectados (nd).

### **2.6.7 Determinación de las actividades enzimáticas lactato dehidrogenasa (LDH) y β-galactosidasa (β-GAL)**

Para la determinación de LDH en los miniquesos, cada muestra de queso fue diluida (1/5) en agua destilada (Deutsch y col., 2002; Hannon y col., 2006a;b) y sometida a una extracción en un homogenizador Ultraturrax Ika T25 Digital (IKA Works, Staufen, Alemania). La mezcla se dejó 15 min a temperatura ambiente, luego de lo cual fue centrifugada (15000 g - 15 min - 4 °C). El sobrenadante se filtró a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore, San Pablo, Brasil) e inmediatamente se midió la actividad LDH con la misma metodología descrita en el capítulo 2. La actividad LDH se expresó como la cantidad de µmoles de NADH oxidados en un minuto de reacción por gramo de queso. Para el ensayo de β-GAL, el extracto se preparó de la misma manera que para la LDH, pero utilizando buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7 como diluyente (Martínez-Cuesta, 1998). La actividad fue expresada como la cantidad de µmol de ONP liberados en un minuto de reacción por gramo de queso.

### **2.6.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el software IBM-SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas. Para todos los resultados se tomó como criterio una probabilidad de  $P \leq 0,05$  como diferencia significativa, salvo en algunos casos particulares, en que también se informaron las diferencias con una probabilidad de  $P \leq 0,10$ . Por otro lado, cuando se creyó conveniente para una mejor interpretación de los resultados, se

realizó un análisis de componentes principales para estudiar los perfiles de ácidos orgánicos, aminoácidos libres y compuestos volátiles derivados de aminoácidos para todos los quesos o extractos en su conjunto.

### 3. Resultados

#### 3.1 Quesos cremosos miniatura

##### 3.1.1 Composición global

Los quesos Cremoso miniatura confirmaron ser un modelo representativo de la matriz del queso estándar y a su vez repetitivo y reproducible, como comprobaron previamente Milesi y col. (2007), y puede verse en la **Tabla 3.3**. En lo que hace específicamente a la aplicación de los cultivos puestos en juego en este trabajo, tanto atenuados como sin atenuar, ellos no provocaron diferencias significativas en la composición global (contenido de humedad, materia grasa y proteínas) ni en los valores de pH entre quesos controles y experimentales.

**Tabla 3.3.** Composición global de los quesos Cremoso miniatura

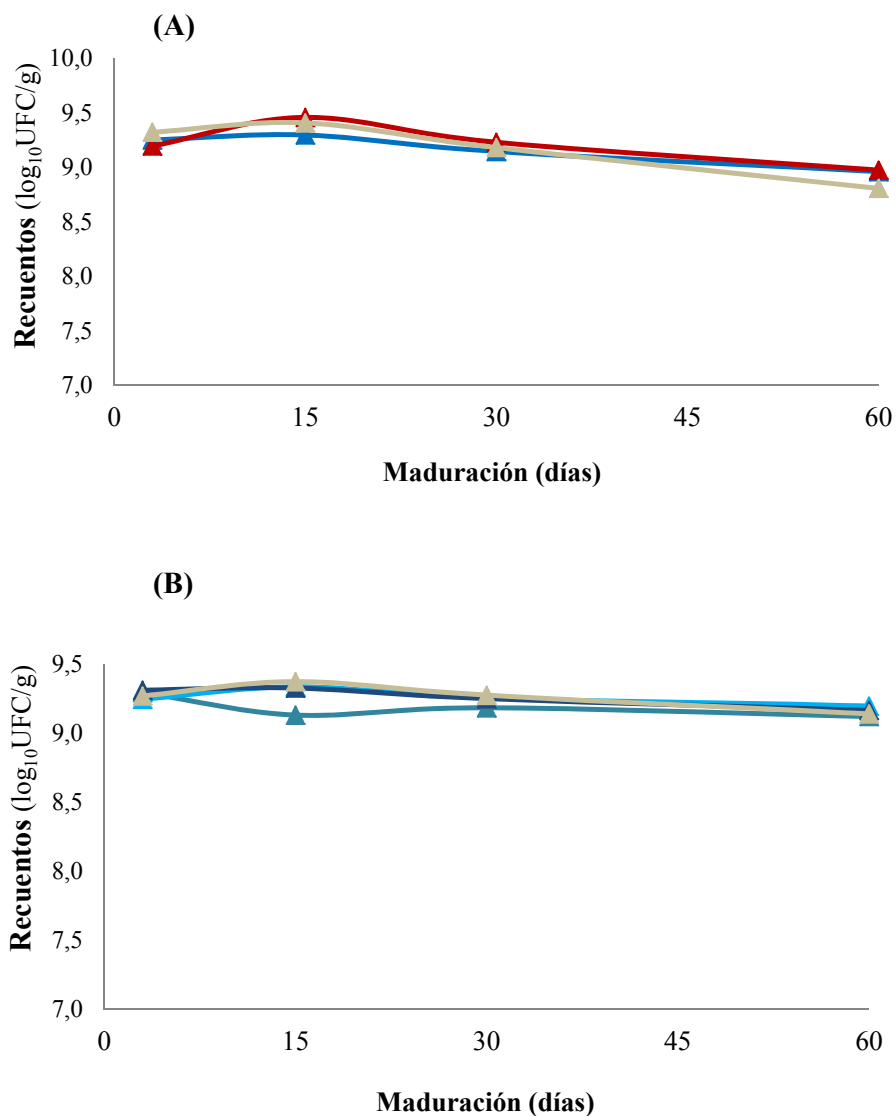
		pH	Humedad (%)	Grasa (%)	Proteínas (%)
Primera experiencia	C	5,30	51,20	26,40	18,30
		0,01	1,27	0,17	0,51
	EM	5,53	50,10	25,90	17,50
		0,01	1,38	0,46	1,50
	EA	5,35	49,40	25,90	18,80
		0,01	1,63	0,15	1,31
Segunda experiencia	C	5,30	52,20	26,00	18,90
		0,10	0,61	0,23	0,98
	EU	5,20	49,90	25,10	18,60
		0,05	0,57	1,07	1,51
	ED	5,30	51,50	25,40	17,80
		0,09	2,07	1,19	0,45
ES	5,30	51,20	27,50	18,60	
	0,04	1,57	0,45	1,01	

Los valores de pH, humedad, grasa y proteínas fueron determinados en los quesos miniatura a los 3 días de maduración.

##### 3.1.2 Recuentos microbiológicos

Como se describió anteriormente (sección 2.2 de este capítulo), todos los quesos tanto controles como experimentales, contenían el fermento iniciador sin atenuar, para garantizar la disminución adecuada del pH durante la elaboración del queso. El agregado de células

atenuadas de *S. thermophilus* 2, no generó diferencias significativas (**Figura 3.4**) en la viabilidad del fermento iniciador - de la misma cepa-, con respecto a los controles sin adicionar el cultivo atenuado. En efecto, *S. thermophilus* 2 se mantuvo durante todo el período de maduración, prácticamente al mismo nivel inicial en los controles y experimentales.

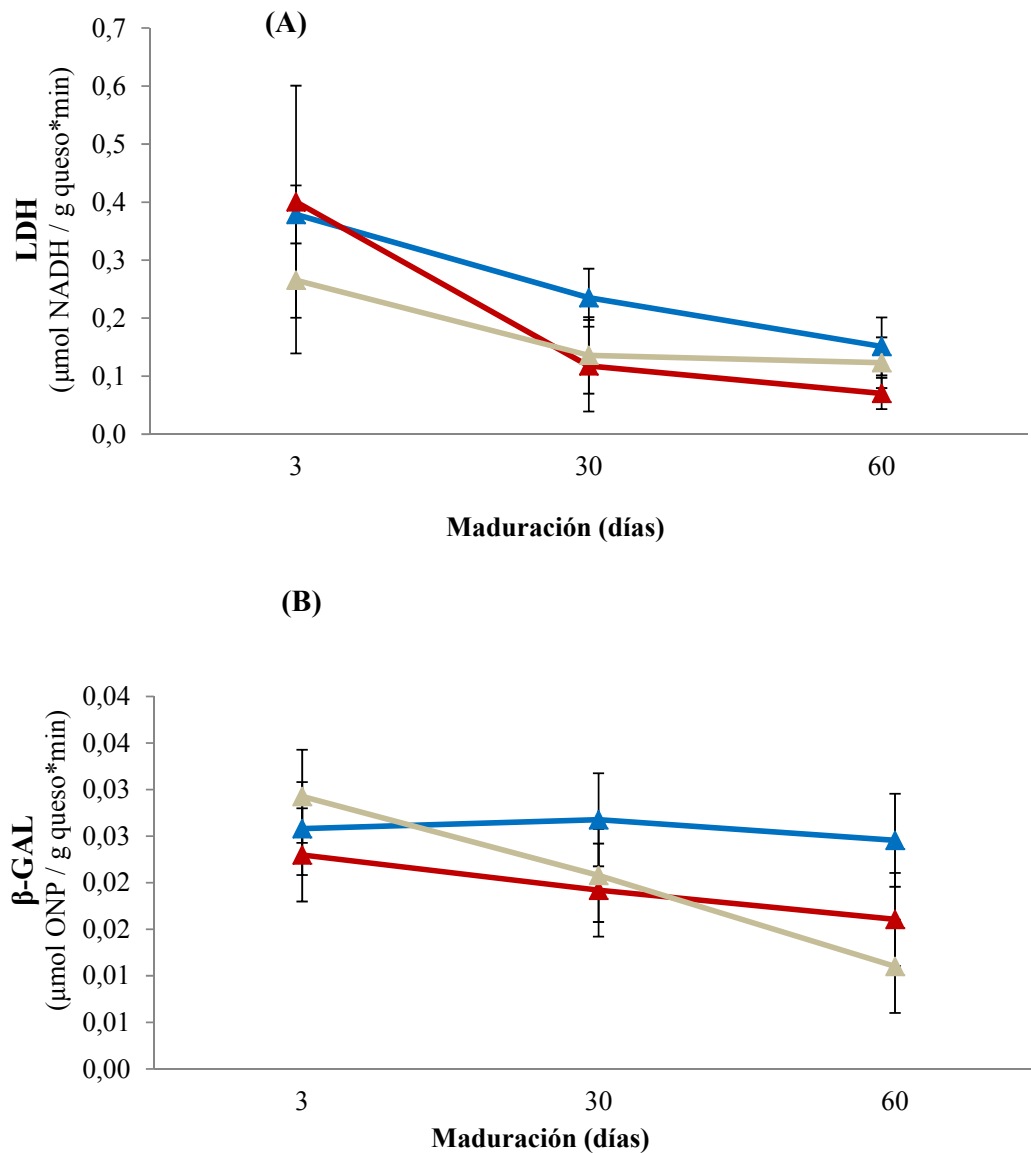


**Figura 3.4.** Recuentos de *S. thermophilus* 2 en queso Cremoso miniatura a 3, 15, 30 y 60 días de maduración. **A-** Primera experiencia: C (—▲—), EM (—▲—), y EA (—▲—). **B-** Segunda experiencia: C (—▲—), EU (—▲—), ED (—▲—) y ES (—▲—).

### 3.1.3 Actividades enzimáticas (LDH y $\beta$ -GAL).

La actividad LDH determinada en el extracto de queso fue disminuyendo durante la maduración en la primera experiencia en todas las muestras. Como se puede observar en la

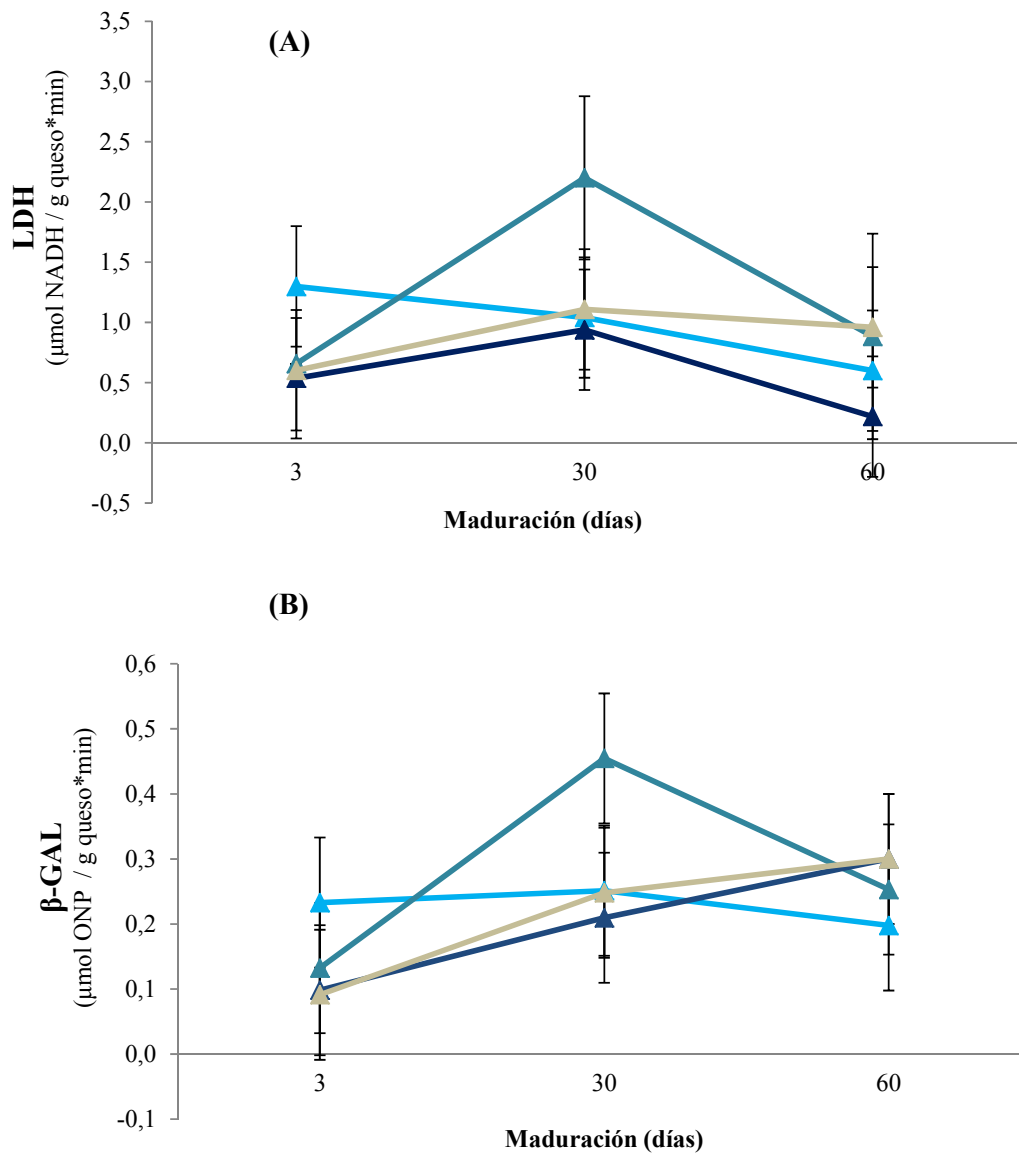
**Figura 3.5**, ambas actividades enzimáticas (LDH y  $\beta$ -GAL) presentaron una variabilidad importante, lo que ocasionó que no se detectaran diferencias significativas entre controles y experimentales. Sin embargo, en el queso EM se observaron niveles de enzima ligeramente más altos que en los controles, principalmente a 30 días para LDH y a 60 días de maduración para  $\beta$ -GAL.



**Figura 3.5.** Actividades enzimáticas indicadoras en los quesos miniatura de la primera experiencia a los 3, 30 y 60 días de maduración. A- Actividad LDH; B- Actividad  $\beta$ -GAL. Referencias: C (—▲—), EM (—▲—), y EA (—▲—).

En relación a las actividades enzimáticas de la segunda experiencia, a los 3 días de maduración se observó un aumento de la LDH en el queso inoculado con las células tratadas con ultrasonido (EU), mientras que a 30 días se observó un aumento de LDH en el queso

inoculado con las células atenuadas con SDS (ES). Para la actividad  $\beta$ -GAL, en general, el comportamiento fue similar (**Figura 3.6**).

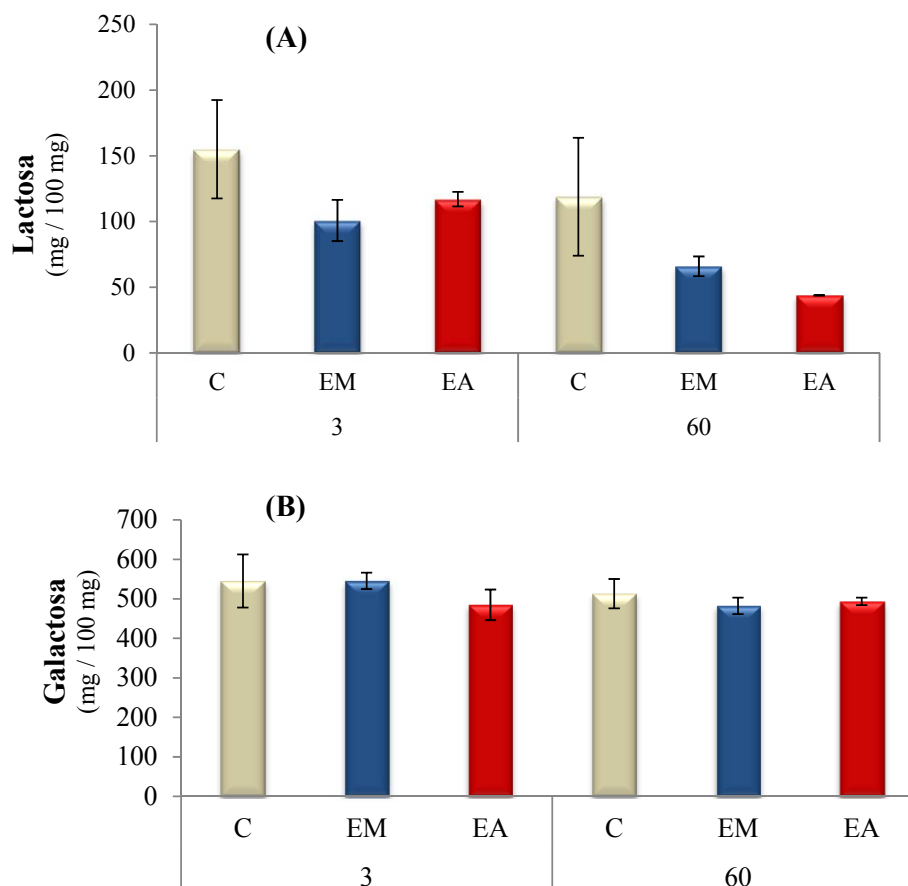


**Figura 3.6.** Actividades enzimáticas indicadoras en los quesos miniatura de la segunda experiencia a 3, 30 y 60 días de maduración. **A-** Actividad LDH, **B-** Actividad  $\beta$ -GAL. Referencias: C (—▲—), EU (—▲—), ED (—▲—) y ES (—▲—).

### 3.1.4 Lactosa y galactosa

La concentración de lactosa en los quesos miniatura experimentales disminuyó a los 3 días de maduración con respecto al control. A los 60 días, el contenido de lactosa fue aún menor, y se mantuvo la relación entre muestras experimentales y controles, observada a los 3 días. Para los dos tiempos de muestreo, la diferencia de la concentración de lactosa entre experimentales

y controles sólo fue significativa ( $P \leq 0,05$ ) para el queso EM a los 3 días. Sin embargo, para el resto de los experimentales, la lactosa mostró una tendencia muy marcada a disminuir. Estos resultados van en el mismo sentido que los hallados para la actividad enzimática  $\beta$ -GAL, debido a que los tratamientos de atenuación puestos en juego en la experiencia 1, aumentaron la actividad  $\beta$ -GAL (ver sección 3.3 del capítulo 2).



**Figura 3.7.** Concentración de lactosa (A) y galactosa (B) en los quesos miniatura de la primera experiencia a 3 y 60 días de maduración. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (■), EM (■), EA (■).

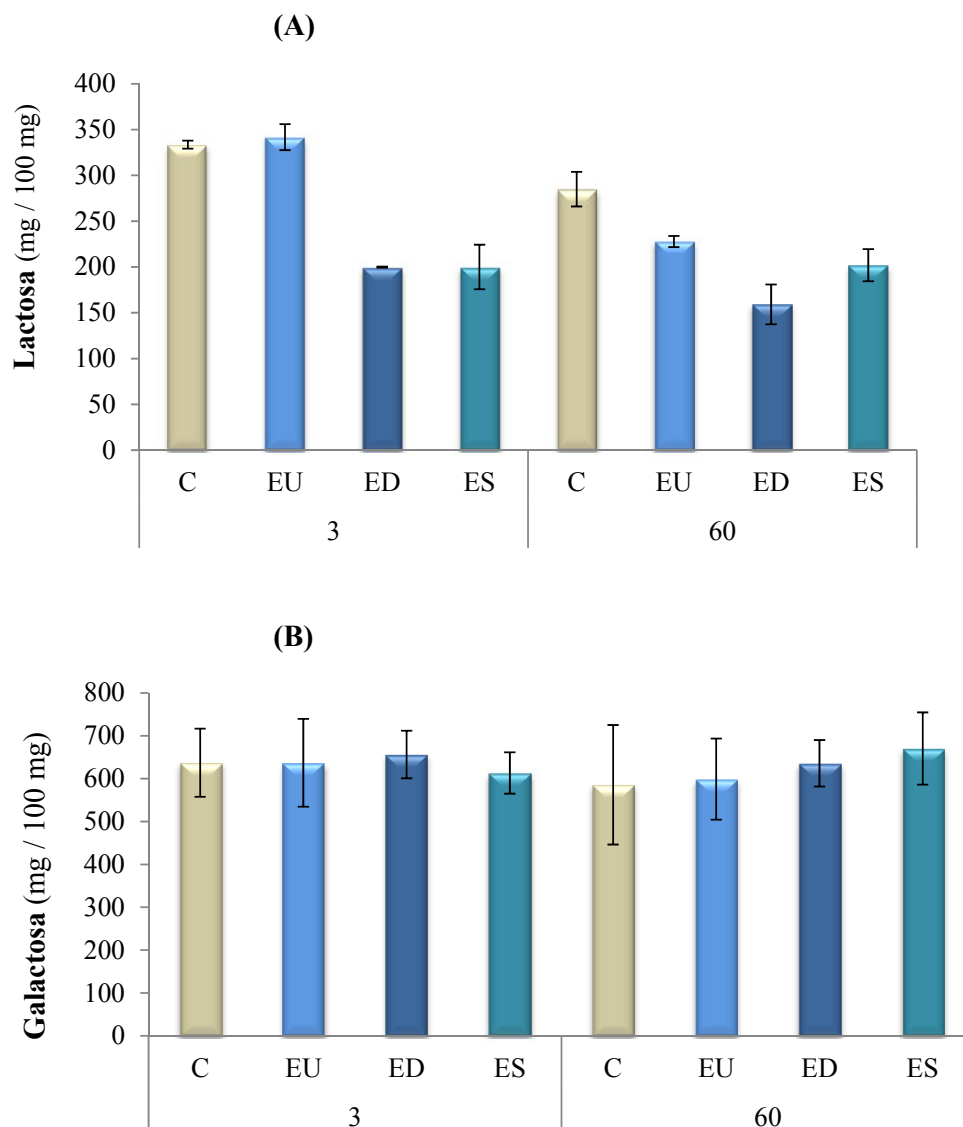
Este aumento de actividad de la  $\beta$ -GAL en el queso, logrado por la adición de cultivos atenuados, se observó también en la segunda experiencia (Figura 3.8). En este caso, se detectó una disminución ( $P \leq 0,05$ ) de la concentración de lactosa en los quesos adicionados de células tratadas con SDS (ES) y en el queso adicionado de extracto libre de células obtenido por disrupción celular (ED).

Comparando los controles de la primera experiencia con los de la segunda experiencia, también se encontraron diferencias importantes en la concentración inicial de lactosa,

mientras que la concentración inicial de galactosa tuvo niveles similares en ambas experiencias.

Las variaciones en la concentración de azúcares en quesos derivan del proceso de fermentación durante la elaboración y, aún para curvas de descenso de pH correctos desde el punto de vista tecnológico, y de similar evolución en el tiempo, han mostrado ser más importantes de lo que habitualmente se consideraba. De esta manera, quesos similares, obtenidos por iguales procesos, y aún luego de cierto tiempo de maduración, muestran contenidos de lactosa y galactosa muy diferentes (Portnoi y MacDonald, 2009). La leche de elaboración también puede introducir aquí alguna variabilidad; sin embargo, la lactosa es el componente de la leche cuya concentración permanece más estable a lo largo de la lactación, sumado al hecho de que los factores por individuo se minimizan al ser la leche de silo de gran mezcla, por lo que no es esperable un aporte importante a la variabilidad de esta fuente.

Como la mayoría de las cepas de *S. thermophilus*, la que se utilizó en el presente estudio no mostró capacidad de metabolizar la galactosa en las condiciones estudiadas. Además, no se observaron modificaciones del tipo químico de la galactosa ya que no hubo ninguna variación importante entre los 3 y los 60 días de maduración.

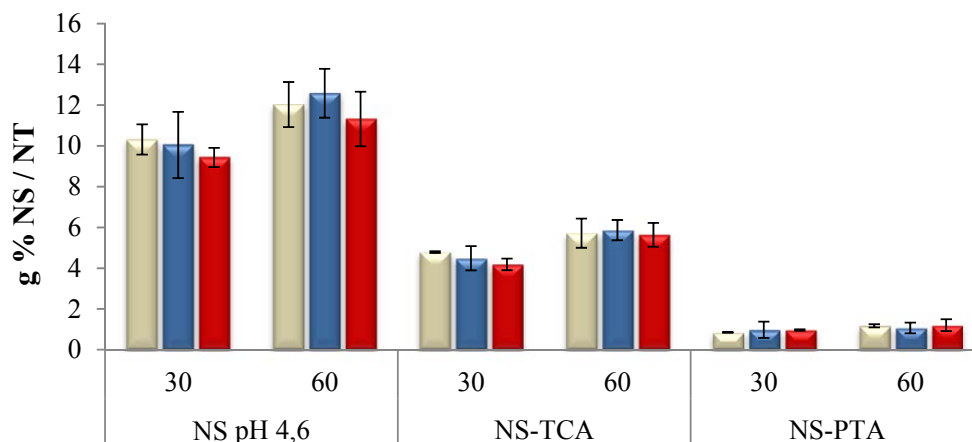


**Figura 3.8.** Concentración de lactosa (A) y galactosa (B) en los quesos miniatura de la segunda experiencia a 3 y 60 días de maduración. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (■), EU (■), ED (■) y ES (■).

### 3.1.5 Nitrógeno soluble

Durante la maduración, se observó un incremento de las fracciones de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS pH 4,6) y en ácido tricloroacético 12 % (NS-TCA) como resultado de la proteólisis. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre quesos control y experimentales de la primera experiencia en ninguna de las fracciones estudiadas: NS pH 4,6, NS-TCA, y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 5 % (NS-PTA).





**Figura 3.9.** Evolución del contenido de nitrógeno en las distintas fracciones solubles (NS-pH 4,6, NS-TCA, NS-PTA), expresado como proporción (%) del nitrógeno total (NT), durante la maduración de los quesos de la primera experiencia. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (■), EM (■), EA (■).

### 3.1.6 Ácidos orgánicos

Se cuantificaron ocho ácidos orgánicos en los quesos control y experimentales a 3 y 60 días de maduración (**Tabla 3.4**). En todos los quesos de ambas experiencias, los niveles más altos fueron para el ácido láctico (~ 900 mg / 100 g), seguido por los ácidos cítrico (~ 200 mg / 100 g) y acético (~ 50 mg / 100 g), mientras que los niveles más bajos fueron detectados en los ácidos orótico (~ 2 mg / 100 g) e hipúrico (~ 0,7 mg / 100 g). Los ácidos  $\alpha$ -cetoglutarato y pirúvico, que son importantes compuestos involucrados en el catabolismo de los aminoácidos por ser aceptores del grupo amino en la reacción de transaminación, mostraron niveles de ~ 5 y 7 mg / 100 g respectivamente. Por último, el ácido úrico mostró niveles de ~ 5 mg / 100 g.

En la primera experiencia de los quesos miniatura, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los ácidos orgánicos analizados entre los quesos control y experimentales, tanto a 3 como a 60 días de maduración. Sin embargo, la concentración del  $\alpha$ -cetoglutarato en el queso EA fue mayor que en el queso C tanto a 3 como a 60 días de maduración, aunque esta diferencia no fue significativa. Por otro lado, se detectaron algunas mínimas diferencias por el tiempo de maduración para el ácido úrico, ya que en los quesos C y EA, el ácido úrico disminuyó significativamente a los 60 días de maduración.

En la segunda experiencia, se observaron diferencias significativas en dos ácidos orgánicos a los 3 días de maduración. La concentración de ácido acético en todos los quesos experimentales (EU, ES y ED) fue significativamente mayor que en el control, mientras que la concentración de ácido pirúvico en el queso EU fue significativamente mayor que en el resto de los quesos. Además, se observaron algunas diferencias numéricas importantes, pero

que no llegaron a ser significativas. Por ejemplo, la concentración del ácido  $\alpha$ -cetoglutarato a 3 y 60 días de maduración y del ácido pirúvico a 60 días fue mayor en el queso EU respecto del control. En cambio en el queso ES a los 60 días de maduración tanto el  $\alpha$ -cetoglutarato como el ácido pirúvico disminuyeron respecto al control.

En general, durante los 60 días de maduración no se observaron grandes diferencias en la producción y consumo de los ácidos orgánicos. Estadísticamente solo se observó un incremento en el queso ES para los ácidos láctico e hipúrico. Por otro lado, algunas diferencias numéricas fueron observadas, tales como la del ácido úrico que mostró una disminución importante en todas las muestras y la disminución del ácido acético en el queso ED; pero en ninguno de estos últimos casos las diferencias fueron significativas.

Para lograr una interpretación global de los resultados, además del ANOVA, a los 3 días de maduración se realizó un análisis de componentes principales (ACP) incluyendo como variables la concentración de todos los ácidos orgánicos, lactosa y galactosa (**Figura 3.10**).

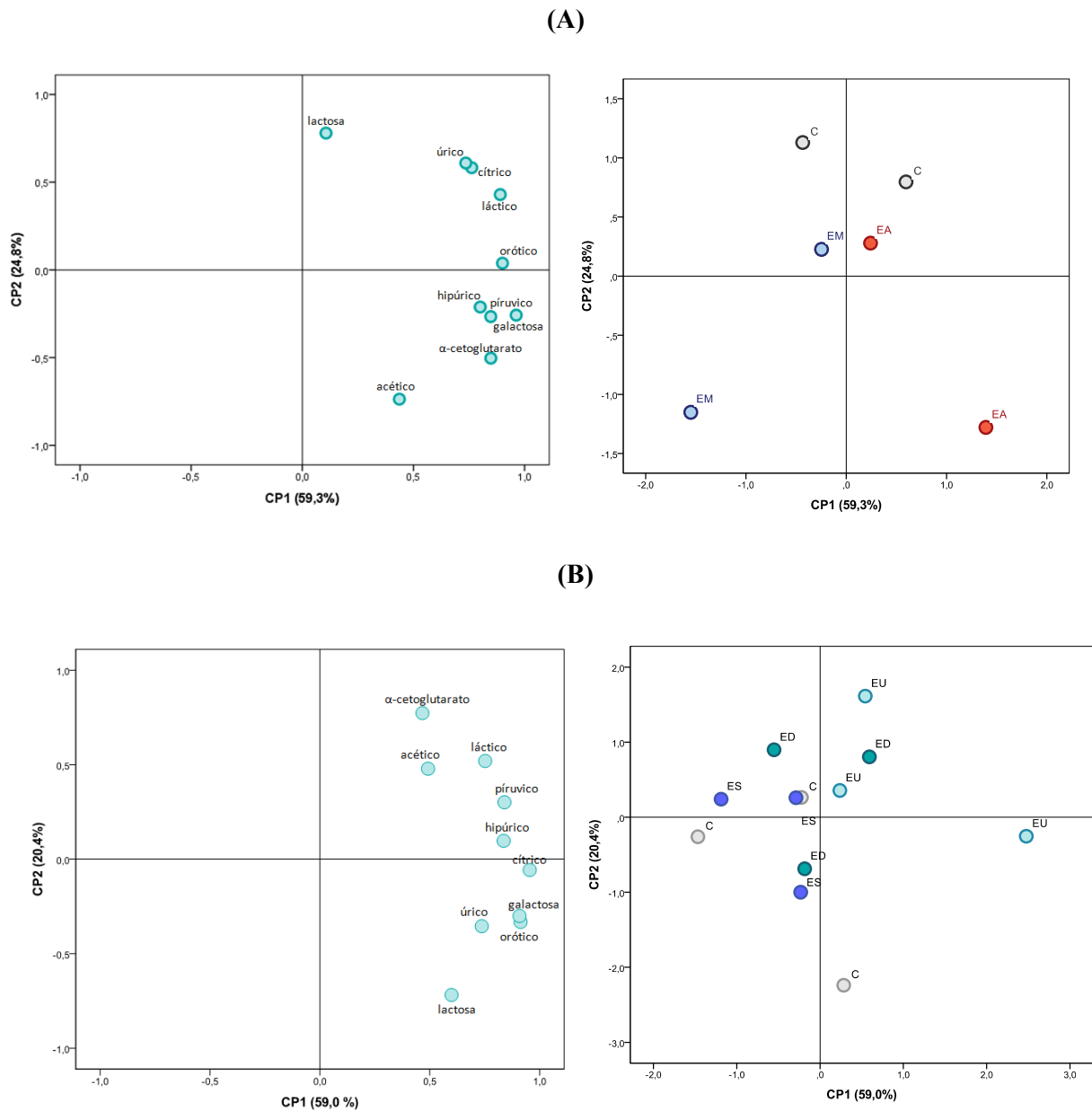
En la primera experiencia (**A**), se extrajeron 3 componentes que explicaron 95,2 % de la variabilidad. Para los dos primeros componentes, que explican un 84 % de la varianza total, se representan los gráficos de loading y scores. En el gráfico de loading de las nuevas variables puede observarse la influencia de la totalidad de los ácidos orgánicos y azúcares, excepto la lactosa sobre el eje del CP1. En el gráfico de los scores se puede ver una cierta separación de los quesos EA de los EM a lo largo del CP1, caracterizándose los quesos EA por mayores niveles de todas las variables estudiadas. Asimismo, se observa una clara separación de los quesos experimentales (EM y EA) respecto del queso control (C) a lo largo del eje CP2, debido sobre todo a las variables lactosa, y ácidos úrico, cítrico y láctico, que caracterizaron a los quesos control.

En la segunda experiencia (**B**), se extrajeron sólo dos componentes del ACP, los cuales explicaron el 79,4 % de la variabilidad total. A diferencia del ACP de la experiencia 1, no se observa una separación clara entre muestras experimentales y controles de las réplicas. De los tres tratamientos, las muestras de ultrasonido fueron las que más se diferenciaron del control

**Tabla 3.4.** Ácidos orgánicos (mg / 100 g) en los quesos miniatura de las dos experiencias a 3 y 60 días de maduración

		Ác. cítrico	$\alpha$ -cetoglutarato	Ác. pirúvico	Ác. orótico	Ác. láctico	Ác. acético	Ác. úrico	Ác. hipúrico	
Primera Experiencia	3 días	C	189,62	5,38	7,06	1,93	908,72	54,21	5,27	0,72
		EM	10,19	0,47	1,04	0,02	31,82	2,03	0,07	0,25
		EA	170,21	5,27	6,45	1,83	818,35	57,59	4,69	0,71
		EM	25,63	0,23	0,10	0,06	91,56	1,43	0,60	0,12
		EA	189,34	6,16	7,87	1,94	925,69	62,58	5,23	0,93
		EA	5,35	1,04	0,46	0,12	3,22	15,89	0,02	0,02
	60 días	C	190,24	5,67	6,92	1,92	921,89	58,22	3,88	0,66
		EM	32,24	0,90	1,59	0,29	183,27	0,87	0,37	0,15
		EA	179,84	5,63	7,03	1,79	872,79	56,51	3,78	0,82
		EM	35,68	1,04	2,57	0,22	117,40	1,58	0,56	0,06
		EA	192,20	5,96	8,89	1,85	874,29	59,20	3,84	0,68
		EA	11,21	0,04	1,10	0,05	71,70	5,56	0,01	0,22
Segunda Experiencia	3 días	C	187,10	5,41	7,79 <sup>a</sup>	1,99	863,36	50,86 <sup>a</sup>	5,21	0,76
		EU	8,79	0,38	0,28	0,24	32,34	3,34	0,39	0,19
		ED	201,08	6,56	9,26 <sup>b</sup>	2,15	960,59	55,92 <sup>b</sup>	5,51	1,00
		ES	9,36	0,79	0,78	0,22	48,20	3,37	0,26	0,24
		EU	187,13	5,77	7,85 <sup>a</sup>	1,97	918,05	57,89 <sup>b</sup>	5,34	0,85
		ED	2,54	0,40	0,13	0,11	76,43	1,68	0,37	0,12
	60 días	C	187,00	5,50	7,73 <sup>a</sup>	1,96	885,47	54,32 <sup>b</sup>	5,33	0,56
		EU	2,68	0,32	0,28	0,12	21,57	0,65	0,56	0,03
		ED	199,04	5,41	7,87	2,06	921,55	54,58	4,47	0,88
		ES	3,95	1,24	3,55	0,15	59,58	1,58	0,80	0,08
		EU	204,01	7,27	9,92	2,12	910,12	54,00	4,62	1,01
		ES	8,87	0,76	0,32	0,15	27,16	4,28	0,24	0,14
60 días	C	198,27	5,81	8,34	1,97	917,89	40,76	3,65	0,79	
	EU	6,33	0,63	1,63	0,17	70,92	29,30	2,48	0,07	
	ED	203,07	4,86	5,64	2,02	965,20	55,22	3,10	0,98	
	ES	8,63	0,98	2,24	0,14	28,00	0,89	1,51	0,25	
	ED	6,33	0,63	1,63	0,17	70,92	29,30	2,48	0,07	
	ES	203,07	4,86	5,64	2,02	965,20	55,22	3,10	0,98	

Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar (en gris) de las réplicas de elaboración de los quesos miniatura. Diferentes superíndices en una misma columna para un mismo tiempo de incubación indican la presencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 3.10.** Análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos y azúcares a 3 días de elaboración en la primera (A) y la segunda experiencia (B).

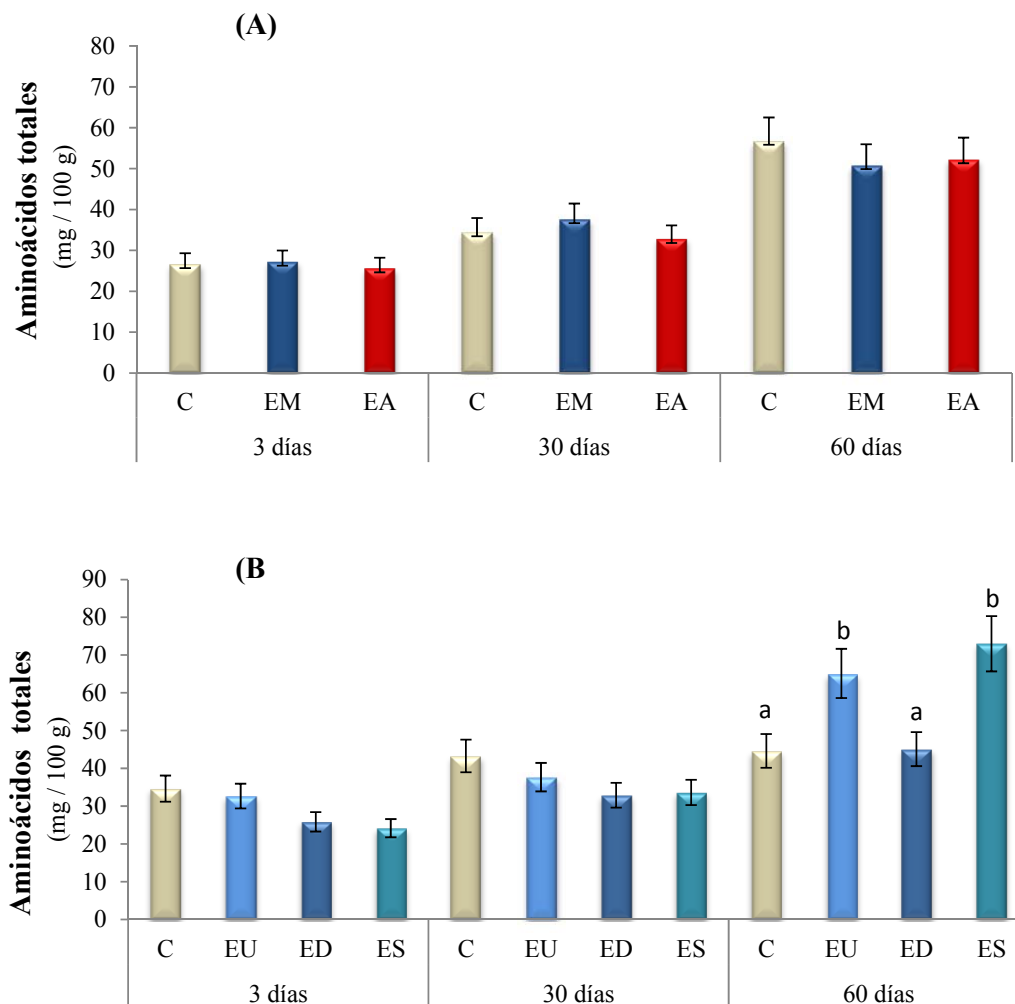
### 3.1.7 Aminoácidos libres (AA)

Los aminoácidos libres fueron determinados en los quesos cremosos miniatura a los 3, 30 y 60 días de maduración.

En la **Figura 3.11** se representan los niveles de AA totales en los quesos miniatura de ambas experiencias, donde se puede observar el aumento de los mismos durante la

maduración. En la primera experiencia, los AA totales para los tres quesos (C, EM EA) fueron similares entre ellos a cada tiempo de incubación.

En la segunda experiencia se observaron niveles significativamente mayores en los quesos EU y ES en relación a los quesos Cy ED a los 60 días de maduración, Mientras que para el resto de los quesos, el incremento no llegó a ser significativo.



**Figura 3.11.** Aminoácidos totales en los quesos miniatura a 3, 30 y 60 días de maduración, de la primera experiencia (A): C (■), EM (■), EA (■), y de la segunda experiencia (B): C (■), EU (■), ED (■) y ES (■). Los valores corresponden al promedio y desviación estándar de las replicas de elaboración de los quesos miniatura.

En la primera experiencia de quesos miniatura, la mayoría de los AA (Thr, Ser, Glu, Met, Tyr, Val, Phe, Ile, Lys y Leu) aumentaron durante la maduración, a diferencia de unos pocos (Ala, Asp, His, Pro y Arg) que prácticamente se mantuvieron constantes. Los niveles de los

---

AA individuales no mostraron diferencias significativas entre los quesos control y experimentales a ninguno de los tiempos analizados. Sin embargo, algunos mostraron diferencias numéricas, tales como Phe en los quesos EM y EA que mostraron niveles menores que el queso C a 60 días de maduración (**Figura 3.12**).

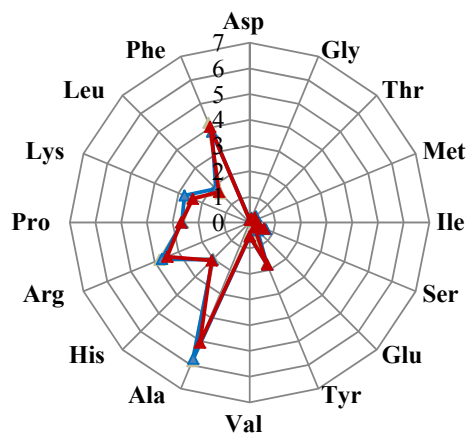
En la segunda experiencia de quesos miniatura tampoco se encontraron diferencias significativas entre controles y experimentales. Sin embargo, como en la experiencia 1 también se observaron algunas diferencias numéricas que se detallan a continuación.

A los 3 días de maduración, los niveles de los aminoácidos Lys, Pro y Arg en los tres quesos experimentales (EU, ES, ED) fueron inferiores al queso control, mientras que la His, solo fue inferior al queso C en los quesos ES y ED. También se observó que la Tyr fue menor al control en los quesos ED y ES. Asimismo, se observó que el Glu en el queso EU y la Ala en el queso ES fueron los únicos AA para los cuales, los niveles se encontraban por encima de los del queso control.

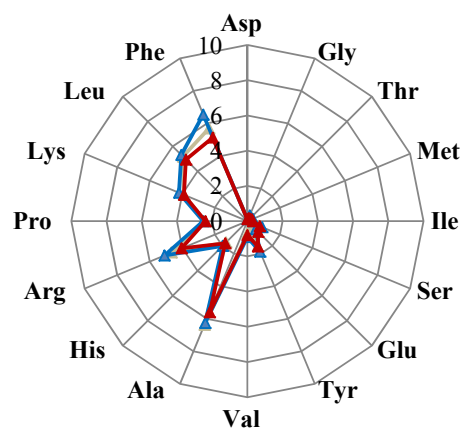
A los 30 días de maduración, el nivel de Phe en el queso EU fue mayor que el queso control, mientras que los niveles de Phe en los quesos EU y ED fueron inferiores al queso control. Estos últimos quesos experimentales (EU y ED), también presentaron niveles inferiores al control en Leu, Lys y Arg. Por otro lado la Ala se vio incrementada respecto al control en el queso ES.

Por último, también se observaron algunas diferencias numéricas a los 60 días de maduración, en los quesos EU y ES, ya que se observó un aumento de Phe, Leu y Arg en relación a los quesos C y ED. Además, los aminoácidos Glu, Tyr y Ser en el queso ES fueron superiores a los detectados en el queso control.

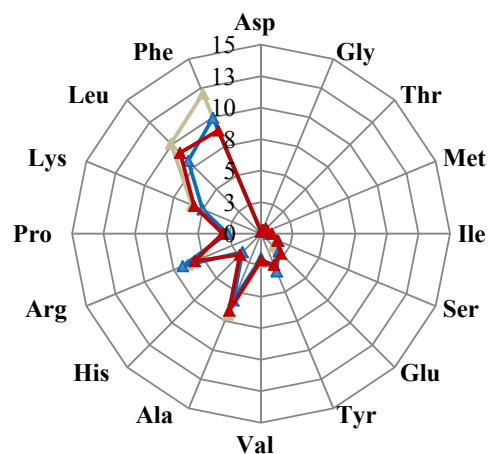
(A)



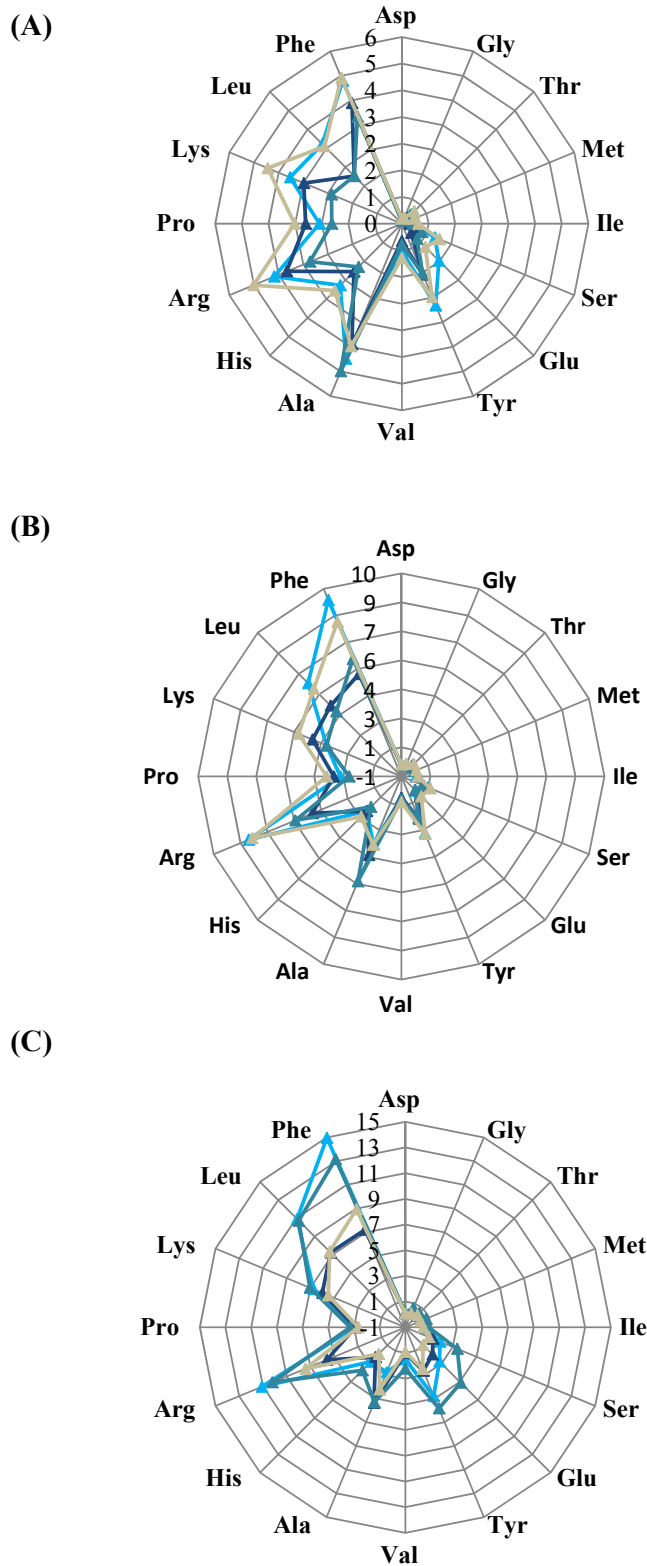
(B)



(C)



**Figura 3.12.** Aminoácidos libres en los quesos miniatura de la primera experiencia a 3 (A), 30 (B) y 60 (C) días de maduración. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (—▲—), EM (—▲—), y EA (—▲—).



**Figura 3.13.** Aminoácidos libres en los quesos miniatura de la segunda experiencia a 3 (A), 30 (B) y 60 (C) días de maduración. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos de elaboración de queso. Referencias: C (—▲—), EU (—▲—), ED (—▲—) y ES (—▲—).



### 3.1.8 Compuestos volátiles

La determinación de los perfiles de compuestos volátiles en los quesos de las dos experiencias por SPME-GC-FID, permitió la identificación de un amplio espectro de moléculas (alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres). En la **Tabla 3.5** y **3.6** se presentan los compuestos más relevantes que fueron identificados en las dos experiencias a 3, 30 y 60 días de maduración.

Dentro del grupo de los alcoholes se pudieron determinar alcoholes primarios, tales como etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol. Dentro de los alcoholes primarios, se determinaron dos alcoholes ramificados: el 3-metil-1-butanol, compuesto que deriva del metabolismo de la Leu, y el 2-etil-1-hexanol. También fueron hallados alcoholes secundarios tales como 2-butanol, 2-pentanol y 2-heptanol. Por último, también se pudo determinar un alcohol aromático como el alcohol bencílico.

Dentro del grupo de los aldehídos, se detectaron dos compuestos de importancia para el objeto de esta tesis, ya que pueden derivar del catabolismo de los aminoácidos. Se trata del acetaldehído, que puede provenir de la Asp, y benzaldehído, que puede derivar de Phe o Trp.

Al igual que el grupo de los alcoholes, el grupo de los ácidos detectados fue amplio y variado. Entre ellos se pueden mencionar a los ácidos acético, butírico, hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico, decanoico, dodecanoico y 2-metil propanoico.

Por último, se hallaron y cuantificaron cetonas tales como la propanona, 2-butanona, 2-hexanona, heptanona, deltadecalactona, 2,3-butanodiona y 3-hidroxi-2-butanona. Estos dos últimos compuestos, comúnmente denominados diacetilo y acetoína, respectivamente, son sumamente importantes ya que contribuyen al flavour de una gran variedad de quesos.

En la primera experiencia de quesos miniatura, se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) únicamente para el ácido acético a los 60 días de maduración; el área de este compuesto fue mayor en ambos quesos experimentales EA y EM respecto al control. Sin embargo, se pudieron observar algunas otras diferencias numéricas para algunos compuestos entre los quesos controles y experimentales, aunque las mismas no llegaron a ser significativas. Tal es el caso del diacetilo y la acetoína, compuestos que pueden derivar de la transaminación del Asp, que disminuyeron en todas las muestras de queso durante la maduración. Si bien ambos compuestos no presentaron diferencias significativas, se observaron algunas diferencias numéricas durante la maduración. En el queso EM a 3 días y en el queso EA a 60 días, el diacetilo presentó niveles mayores que el control. Por otro lado, la acetoína en el queso EM y EA a 3 días fue mayor que el control, mientras que a los 30 días maduración, sólo el queso EM presentó niveles más altos de acetoína.

### *Capítulo 3*

---

En la segunda experiencia de quesos miniatura, se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) únicamente para acetaldehído y acetato de etilo, que presentaron niveles mayores en el queso ES que en el resto de los quesos a 30 días de maduración.

Por otro lado, algunos compuestos presentaron diferencias significativas a un nivel  $P \leq 0,10$ , los cuales se detallan a continuación. El diacetilo a los 30 días de maduración presentó niveles significativamente mayores en el queso ED con respecto a al queso ES, pero no fue estadísticamente diferente a los quesos C y EU.

La acetoina a los 60 días de maduración fue significativamente más alta en el queso ES, respecto al queso EU, pero fue similar a los quesos C y ED.

Para el ácido butírico se observó que sólo hubo diferencias entre los quesos EU y ES, siendo los valores encontrados en este último menores que en el primero. Asimismo, el 1-propanol a 30 días en el queso ES fue significativamente mayor que en el queso control. La 2-heptanona también fue significativamente mayor en todos los quesos experimentales respecto al control; siendo los valores en ES y ED más altos que en EU.

### Capítulo 3

**Tabla 3.5.** Compuestos volátiles identificados en los quesos miniatura de la primer experiencia.

	AA precursor	3 días						30 días						60 días					
		C		EM		EA		C		EM		EA		C		EM		EA	
2-propanona	-----	35	37	46	41	54	47	49	47	50	59	25	23	61	53	50	51	56	53
Acetato de etilo	Ala, Gly, Ser	939	789	703	634	238	120	1103	912	771	612	1647	1210	153	108	213	211	594	324
2-butanona	-----	25	23	35	33	31	29	11	19	44	46	23	41	18	16	18	16	54	52
Etanol	Thr, Asp	519	450	538	557	676	694	554	517	495	465	513	492	477	430	503	479	605	532
Diacetilo	Asp	264	249	315	310	286	285	142	127	153	147	107	96	83	71	85	74	109	102
Butanoato de metilo	-----	14	13	6	7	19	18	43	57	30	42	18	19	15	14	19	28	16	21
2-butanol	-----	5	7	n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		5	4
Butanoato de etilo	-----	n.d		7	12	7	12	14	14	12	14	16	19	16	16	15	14	16	17
1-propanol	-----	9	7	12	11	11	10	14	13	13	12	12	15	16	16	12	11	19	18
2-hexanona	-----	33	30	33	32	43	40	14	12	14	13	11	13	12	11	14	12	23	20
2-metil-1-propanol	Val, Leu	n.d		n.d		n.d		11	18	7	11	n.d		n.d		5	5	n.d	
2-pentanol	-----	n.d		n.d		n.d		7	6	5	7	7	6	13	17	10	11	85	131
1-butanol	-----	10	13	11	14	6	7	11	9	13	13	11	11	28	48	9	11	12	20
2-heptanona	-----	23	21	24	27	23	23	77	107	55	60	60	61	250	233	192	171	480	475
3-metil 1-butanol	Leu	n.d		n.d		n.d		6	5	5	5	6	5	25	37	26	24	21	31
1-pentanol	-----	30	26	19	18	32	28	81	78	57	50	60	55	102	96	86	87	85	75
Acetoína	Asp	753	737	859	815	908	857	614	538	651	581	598	518	623	540	576	518	571	514
2-heptanol	-----	n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		7	12	5	4
1-hexanol	-----	8	7	8	8	7	6	16	17	13	14	25	33	18	20	112	167	46	63
2-nonanona	-----	n.d		n.d		n.d		20	34	17	22	17	21	77	83	83	78	197	237
1-heptanol	-----	n.d		n.d		n.d		6	6	n.d		n.d		8	7	8	7	6	5
Ác. acético	Asp, Ser, Ala, Gly	30	28	35	31	37	32	35	40	33	31	35	34	6 <sup>a</sup>	20	52 <sup>b</sup>	25	56 <sup>b</sup>	17
Benzaldehido	Phe, Trp	15	13	10	9	11	10	15	13	14	12	14		37	38	42	43	43	44
Ác. butírico	-----	39	37	61	63	50	43	90	100	77	73	85		188	176	167	145	177	154
2-etil-1-hexanol	-----	n.d		n.d		5	5	n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d	
2-metilpropanoico	Val, Leu	n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		7	1	7	1	7	3
Ác. isovalérico	Leu	n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		6	9	n.d		n.d	
Ác. hexanoico	-----	40	38	37	32	40	35	51	53	43	42	48		72	63	71	63	80	75
Alcohol bencílico	Phe	n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		n.d		11	14	15	15	8	8
Ác. octanoico	-----	18	16	31	29	27	23	26	27	24	22	27	25	39	40	32	28	28	27
Ác. decanoico	-----	16	13	13	14	16	15	17	19	12	12	14	13	15	15	19	16	20	21

Los valores representan el área promedio y la desviación estándar (en gris) de tres ensayos de elaboración de queso. Diferentes superíndices en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación indican la presencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

Tabla 3.6. Compuestos volátiles identificados en los quesos miniatura de la segunda experiencia.

AA precursor	3 días								30 días				60 días			
	C	EU	ED	ES	C	EU	ED	ES	C	EU	ED	ES				
Acetaldehído	Asp, Thr	156 58	222 1	158 129	152 41	29 <sup>a</sup> 20	49 <sup>a</sup> 68	6 <sup>a</sup> 8	187 <sup>b</sup> 50	n.d.	63 87	42 58	156 76			
2-propanona	-----	55 25	54 6	59 6	39 28	75 11	77 25	87 35	39 11	71 23	95 26	80 44	84 24			
Acetato de etilo	Ala,Gly,Ser	594 597	510 863	742 788	1570 1397	132 <sup>a</sup> 126	302 <sup>a</sup> 303	24 <sup>a</sup> 20	1829 <sup>b</sup> 451	159 207	330 569	246 424	678 103			
2-butanona	-----	54 33	58 62	80 66	61 82	41 8	144 125	51 22	80 70	42 17	60 37	43 13	91 59			
Etanol	Thr, Asp	2625 1813	2038 2226	1318 993	979 541	1009 1049	2026 2267	2031 2451	2433 2003	2878 2398	1156 870	2086 256	1591 1034			
Diacetilo †	Asp	336 134	347 61	359 22	258 94	157 <sup>a,b</sup> 58	220 <sup>a,b</sup> 59	282 <sup>b</sup> 116	100 <sup>a</sup> 14	109 39	150 89	170 59	104 15			
Butanoato de metilo	-----	12 3	18 21	26 2	17 10	13 4	21 10	26 8	14 5	9 5	25 23	16 4	14 2			
2-butanol	-----	6 3	n.d.	5 1	6 3	5 2	n.d.	n.d.	20 17	11 12	n.d.	n.d.	8 6			
Butanoato de etilo	-----	30 20	34 40	11 4	29 28	52 52	65 75	50 59	57 44	89 56	30 11	50 65	35 19			
1-propanol†	-----	38 11	34 2	39 7	44 3	34 <sup>a</sup> 5	35 <sup>a,b</sup> 7	45 <sup>a,b</sup> 4	58 <sup>b</sup> 15	42 14	33 1	38 2	59 29			
2-hexanona	-----	37 8	31 2	50 8	40 10	28 8	23 6	34 4	34 10	22 8	33 22	39 10	19 9			
2-heptanona	-----	35 <sup>a</sup> 2	39 <sup>b</sup> 3	44 <sup>c</sup> 1	42 <sup>c</sup> 1	45 7	59 11	63 33	59 25	231 328	1259 1088	1007 795	62 31			
3-metil 1-butanol	Leu	7 3	7 2	7 3	9 4	6 4	12 6	6 2	8 6	50 72	33 25	12 5	12 8			
1-pentanol	-----	28 16	37 1	38 5	31 5	61 25	69 9	66 23	38 11	74 15	84 28	62 20	57 23			
Acetoína‡	Asp	808 279	565 395	989 96	808 282	836 115	815 92	692 522	735 108	769 <sup>a,b</sup> 24	657 <sup>a</sup> 147	774 <sup>a,b</sup> 43	901 <sup>b</sup> 132			
1-hexanol	-----	13 4	12 4	13 3	13 3	15 3	15 2	15 1	14 2	31 18	32 18	52 42	15 12			
1-heptanol	-----	7 1	7 2	6 1	6 1	8 2	9 2	7 1	6 2	8 2	9 1	8 1	9 3			
Ác. acético	Asp, Ser, Ala, Gly	59 17	83 23	76 18	62 24	63 15	68 7	73 19	60 10	59 11	92 24	71 21	77 30			
Benzaldehído	Phe, Trp	96 123	22 9	21 5	22 6	28 11	31 16	37 20	29 13	75 72	47 26	51 19	26 14			
Ác. butírico*	-----	70 <sup>a,b</sup> 23	105 <sup>b</sup> 24	69 <sup>a,b</sup> 26	40 <sup>a</sup> 29	128 17	184 38	148 47	122 36	220 117	303 114	203 74	227 105			
Ác. hexanoico	-----	88 25	114 27	85 25	81 21	111 23	144 44	130 59	115 46	157 62	169 37	149 67	175 93			
Ác. heptanoico	-----	6 7	6 1	7 7	9 3	n.d.	n.d.	5 4	5 4	n.d.	5 2	7 2	n.d.			
Ác. octanoico	-----	87 32	78 11	79 31	83 16	82 31	83 27	85 32	85 39	70 18	88 24	75 37	110 66			
Ác. nonanoico	-----	45 46	33 34	38 50	49 47	47 43	33 22	36 33	47 48	25 32	18 15	22 14	57 74			
Delta decalactona	-----	n.d.	5 1	n.d.	5 1	6 1	6 0	6 0	5 1	n.d.	5 1	6 1	6 1			
Ác. decanoico	-----	35 10	40 7	31 12	29 10	34 10	38 8	36 6	38 11	32 5	42 10	34 12	32 5			
Delta dodecalactona	-----	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5 1	n.d.	n.d.			
Ác. dodecanoico	-----	7 4	9 1	8 3	7 2	7 1	7 2	8 2	6 3	8 2	9 3	7 3	6 2			

Los valores representan el área promedio y la desviación estándar (en gris) de tres ensayos de elaboración de queso. Diferentes superíndices en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación indican la presencia de diferencias significativas. Las diferencias de  $P \leq 0,10$  a 3, 30 y 60 días se indican con los símbolos \*, †, ‡ respectivamente. En caso que no se indique se refiere a diferencias de  $P \leq 0,05$ .

**3.2 Extractos de queso****3.2.1 Viabilidad y pH.**

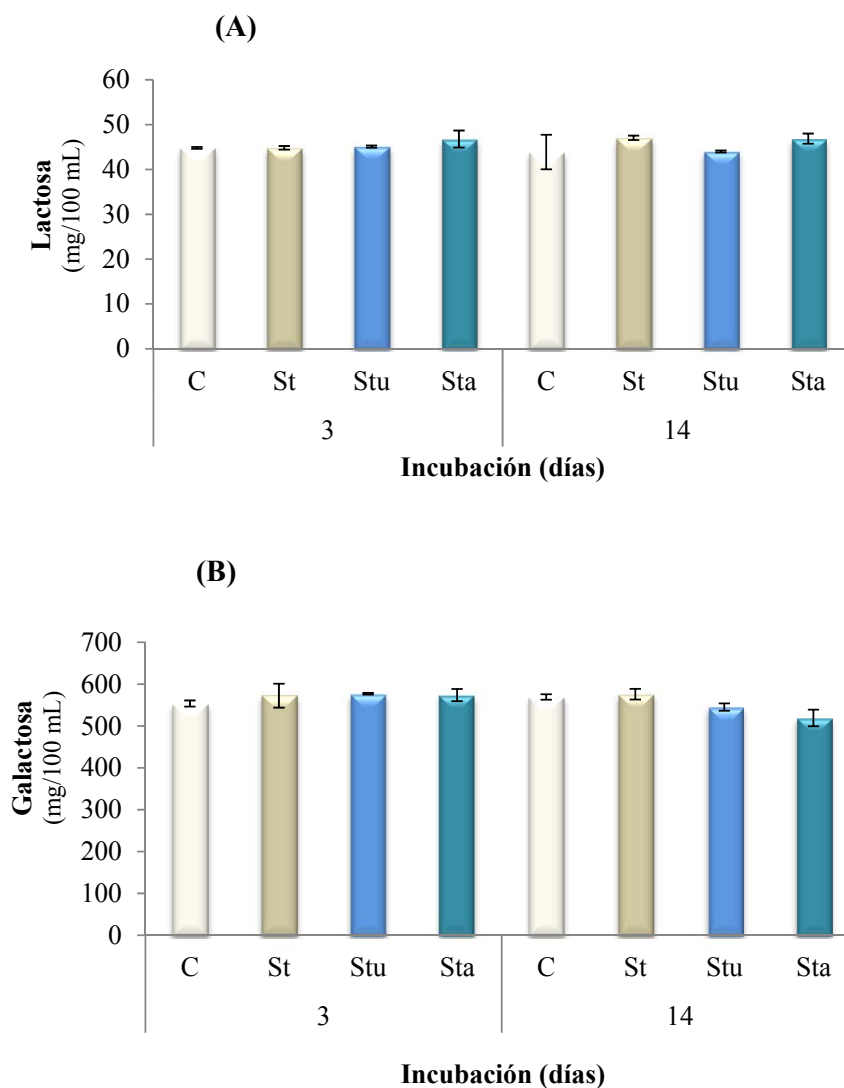
Los extractos sin inocular (C), y los extractos inoculados con las células permeabilizadas con etanol (Sta), no presentaron ningún tipo de desarrollo microbiano durante todo el período de incubación, lo que se verificó sembrando muestras de los extractos en APC-leche. A los 3 días de incubación, los recuentos de *S. thermophilus* en el extracto St alcanzó niveles de  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, mientras que en el extracto Stu alcanzó niveles de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. A los 7 días, la población en el extracto Stu disminuyó a  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, mientras que en el extracto St, no se detectaron células cultivables. Como puede observarse en la **Tabla 3.7**, el descenso de pH durante los 14 días de incubación no fue significativamente diferente entre los extractos controles y experimentales.

**Tabla 3.7.** Descenso de pH durante la incubación de los extractos de queso control y experimentales.

	Incubación (días)			
	0	3	7	10
C	5,20 0,01	5,20 0,01	5,25 0,01	5,15 0,01
St	5,20 0,01	5,20 0,01	5,20 0,01	5,15 0,01
Stu	5,20 0,02	5,20 0,01	5,25 0,01	5,18 0,04
Sta	5,20 0,01	5,20 0,01	5,23 0,04	5,18 0,04

**3.2.2 Lactosa y galactosa**

Las concentraciones de lactosa y galactosa determinadas en los extractos de queso a 3 y 14 días de incubación, se representan en la **Figura 3.14**. Para ninguno de los dos tiempos determinados se observaron diferencias significativas en la concentración de estos azúcares entre los distintos extractos.



**Figura 3.14.** Concentración de lactosa (A) y galactosa (B) en los extractos de quesos Cremoso incubados durante 14 días. Referencias: extracto sin inocular (□), extracto inoculado con *S. thermophilus* viable (■), *S. thermophilus* tratado con ultrasonido (■), o tratado con alcohol (■).

### 3.2.3 Ácidos orgánicos

Se determinaron 9 ácidos orgánicos en los extractos de queso Cremoso, cuyas concentraciones se muestran en la **Tabla 3.8**. Además, para visualizar mejor la tendencia del  $\alpha$ -cetoglutarato y el piruvato, se realizó un gráfico con las diferencias de concentración entre los extractos inoculados y el control sin inocular (**Figura 3.15**).

El  $\alpha$ -cetoglutarato, compuesto esencial para el inicio del catabolismo de los aminoácidos vía transaminación, presentó niveles significativamente ( $P \leq 0,05$ ) mayores en todos los extractos inoculados, ya sea con las células viables de *S. thermophilus* (St) o con las células atenuadas (Sta y Stu), tanto a 3 como a 14 días de incubación. La concentración de este ácido

### Capítulo 3

---

en el extracto sin inocular (C) no se vio modificada durante la incubación, a diferencia de los demás extractos en los que se verificó un incremento entre 3 y 14 días de incubación. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los extractos con células atenuadas y sin atenuar.

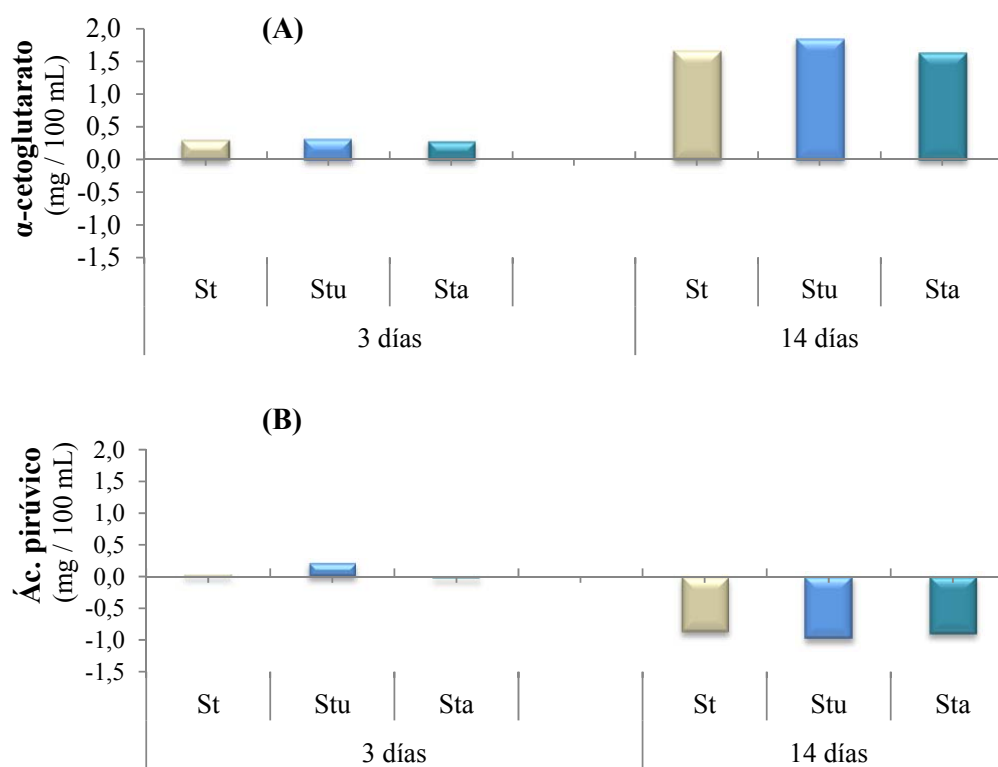
La concentración de ácido pirúvico, compuesto que también puede ser utilizado como aceptor de grupo amino, fue significativamente mayor en todos los extractos a 14 que a 3 días de incubación. Además, la concentración de este ácido en los tres extractos inoculados a los 14 días fue significativamente ( $P \leq 0,05$ ) menor que en el extracto sin inocular, a diferencia de lo observado a 3 días, donde no se encontraron diferencias significativas.

El ácido acético, compuesto que puede derivar del metabolismo de aminoácidos como Asp, Ser, Ala y Gly, entre otros caminos metabólicos posibles, mostró un ligero incremento durante la incubación, pero los valores, tanto a 3 como a 14 días, resultaron sin diferencias significativas entre los distintos extractos. El ácido propiónico presentó niveles mayores en el extracto Sta y principalmente en el Stu en relación al control a los 3 días de incubación aunque los valores no fueron significativamente diferentes; a los 14 días los niveles fueron similares entre todos los extractos. La concentración del ácido fórmico fue similar entre todos los extractos y también durante la incubación. El ácido láctico se incrementó levemente en todos los extractos entre 3 y 14 días de incubación, excepto en el Stu, pero no mostró diferencias significativas entre los distintos extractos. El ácido orótico no presentó diferencias significativas entre los distintos extractos, aunque en el Stu los niveles a 3 días fueron numéricamente mayores respecto del control; durante la incubación la concentración de este ácido se incrementó levemente en todos los extractos.

**Tabla 3.8.** Ácidos orgánicos en los extractos de queso (mg / mL).

	3 días				14 días			
	C	St	Stu	Sta	C	St	Stu	Sta
Ác. cítrico	130,29 <sup>a</sup> 1,58	145,64 <sup>a,b</sup> 10,98	156,01 <sup>b</sup> 1,48	141,14 <sup>a,b</sup> 0,64	156,77 1,91	147,39 4,56	144,19 4,32	145,04 2,92
$\alpha$ -cetoglutarato	4,33 <sup>a</sup> 0,04	4,64 <sup>b</sup> 4,64	4,66 <sup>b</sup> 0,09	4,63 <sup>b</sup> 0,05	4,58 <sup>a</sup> 0,76	6,24 <sup>b</sup> 0,12	6,43 <sup>b</sup> 0,20	6,22 <sup>b</sup> 0,21
Ác. pirúvico	1,52 0,01	1,56 0,18	1,74 0,02	1,50 0,06	3,65 <sup>b</sup> 0,37	2,79 <sup>a</sup> 0,27	2,67 <sup>a</sup> 0,05	2,74 <sup>a</sup> 0,13
Ác. orótico	0,92 0,01	1,15 0,33	1,41 0,03	0,90 0,04	1,58 0,01	1,60 0,06	1,49 0,08	1,57 0,02
Ác. láctico	726,47 4,24	737,62 21,68	747,32 2,58	737,21 1,77	765,47 0,97	772,00 24,07	716,41 21,33	765,38 6,69
Ác. fórmico	16,66 0,81	17,55 0,70	18,28 0,16	17,52 0,16	18,62 0,23	18,73 2,49	17,23 0,85	17,84 0,74
Ác. acético	51,33 1,15	52,12 1,85	53,58 0,94	51,87 0,03	59,24 1,08	59,31 3,65	55,40 1,84	58,46 0,74
Ác. úrico	2,47 0,01	2,49 0,06	2,54 0,01	2,50 0,01	2,57 0,02	2,57 0,08	2,43 0,05	2,56 0,02
Ác. propiónico	8,95 0,56	9,29 0,28	11,0 0,09	10,4 1,00	8,81 0,52	8,82 1,36	8,43 0,13	8,22 0,28

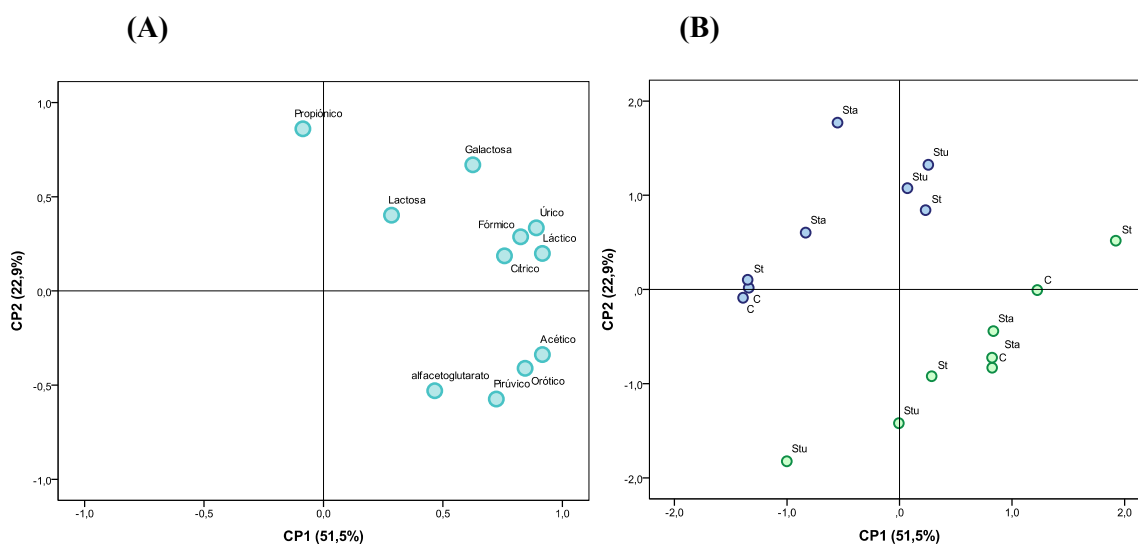
Los valores representan la concentración promedio y la desviación estándar de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio. Diferentes superíndices en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación indican la presencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 3.15.** Variación de la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato (A) y ácido pirúvico (B) en los extractos inoculados en relación al extracto sin inocular. Referencias: extracto inoculado con *S. thermophilus* viable (■), *S. thermophilus* tratado con ultrasonido (■), o tratado con alcohol (■).



Se realizó un análisis de componentes principales incluyendo como variables los ácidos orgánicos, la lactosa y la galactosa a 3 y 14 días de incubación; el análisis extrajo tres componentes que explicaron el 87 % de la variabilidad total. En la **Figura 3.16** se representan los loading y scores para CP1 y CP2, que explican el 51,5 %, y 22,9 % de la variabilidad total, respectivamente. Se puede observar que las variables propiónico, galactosa y lactosa impactan fundamentalmente sobre el CP2. En cambio, en el eje del CP1 se observa una influencia generalizada de todos los ácidos orgánicos a excepción del propiónico. En el gráfico de los scores se puede observar una diferenciación de las muestras principalmente por el tiempo de incubación y una separación de los extractos Stu del resto de los extractos a los 14 días de incubación



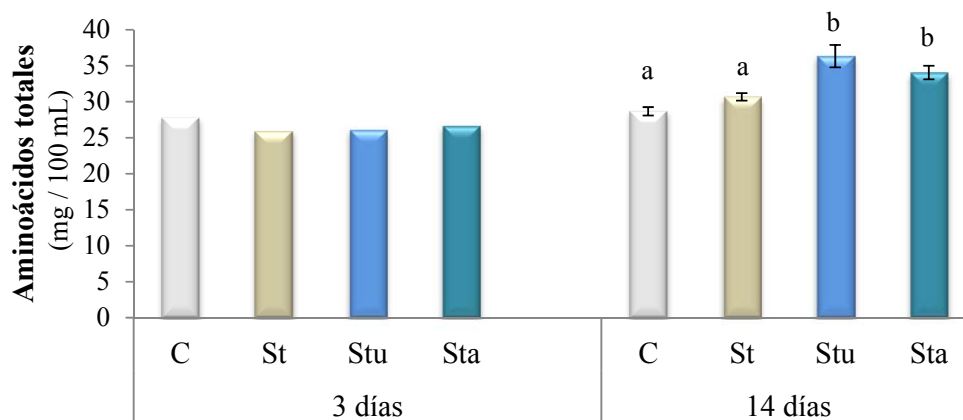
**Figura 3.16.** Análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos, lactosa y galactosa determinados en los extractos de queso. Gráfico de loading (A) y gráfico de scores (B). Referencias: (●) 3 días y (●) 14 días de incubación.

### 3.2.4 Aminoácidos libres (AA)

Los AA fueron cuantificados en las dos réplicas de la experiencia en los extractos a los 14 días de incubación y en una de las dos réplicas a los 3 días; por lo que se sólo se realizó el ANOVA a los 14 días de incubación. En la **Figura 3.17** se presentan los niveles de AA totales en los extractos control y experimentales a 3 y 14 días de incubación.

Los niveles de AA se incrementaron entre 3 y 14 días de incubación en los extractos inoculados, siendo este aumento más notorio en los extractos Stu y Sta. En este sentido, se verificaron valores significativamente mayores en dichos extractos en relación a los extractos C y St a los 14 días de incubación ( $P \leq 0,05$ ). Los niveles de AA totales en Stu y Sta

observados en estos extractos fue de  $\sim 32$  mg / 100 mL. Si bien el incremento de los AA totales en Stu y Sta en relación a C y St, de  $\sim 5$  mg / 100 mL, fue significativo, como se observará en el próximo capítulo, dicho incremento es relativamente muy bajo si se compara con el incremento de aminoácidos causado por los lactobacilos, que fue de  $\sim 45$  y 120 mg / 100 mL de AA para las cepas *Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72, respectivamente.

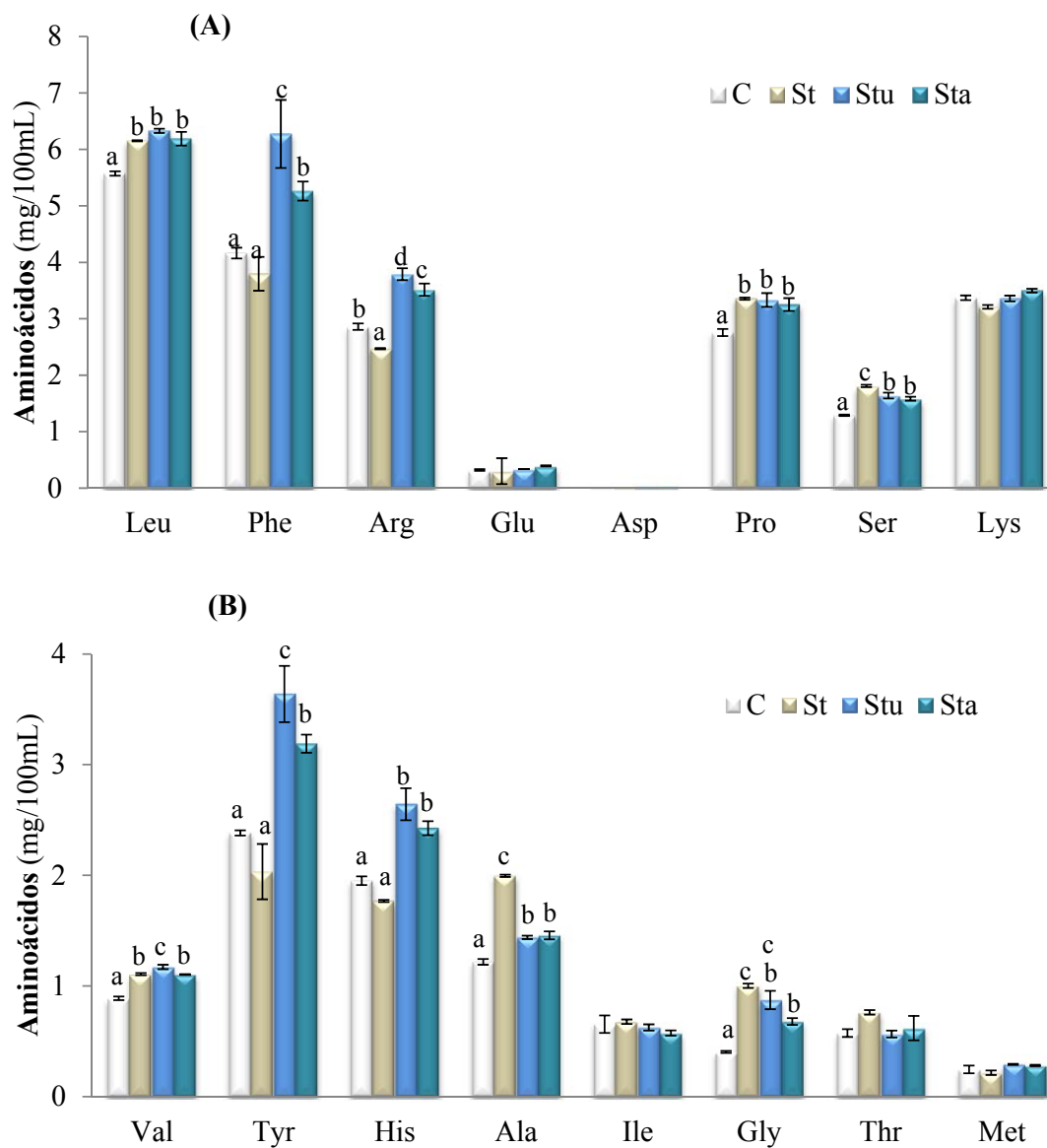


**Figura 3.17.** Niveles de AA totales en los extractos de queso cremoso a 3 y 14 días de incubación. Referencias: extracto sin inocular (▨), extracto inoculado con *S. thermophilus* viable (▩), *S. thermophilus* tratado con ultrasonido (▣), o tratado con alcohol (▤).

En la **Figura 3.18** se representan los valores de los aminoácidos individuales de las dos réplicas de la experiencia a los 14 días de incubación.

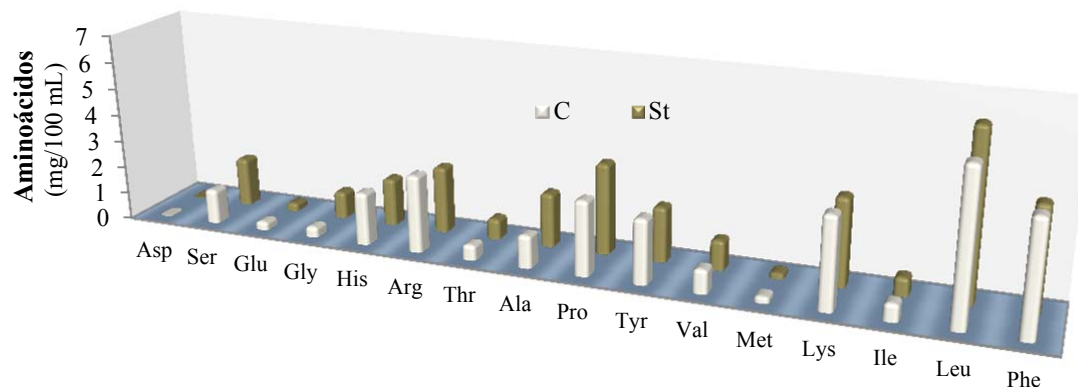
Los niveles de los aminoácidos Val, Gly, Leu, Pro, Ser y Ala se incrementaron significativamente en los tres extractos experimentales (St, Stu y Sta) respecto del control (C). Esto demuestra que para estos AA en particular, la cepa de *S. thermophilus* 2 fue capaz de producirlos en proporción mayor que de degradarlos. La influencia de los tratamientos de atenuación (Stu y Sta) se observó en los aminoácidos aromáticos (Phe y Tyr) y en la His, debido a que se incrementaron significativamente respecto del control (C) y del extracto inoculado con las células viables sin ningún tratamiento (St).

Por otro lado, los niveles de los aminoácidos Asp, Glu, Thr, Met, Lys e Ile no fueron estadísticamente diferentes entre los distintos extractos, lo cual sugiere que en las condiciones estudiadas, *S. thermophilus* 2 no fue capaz de degradarlos ni de producirlos por peptidólisis o biosíntesis.



**Figura 3.18.** Aminoácidos libres en los extractos de queso a 14 días de incubación. Referencias: extracto sin inocular (□), extracto inoculado con *S. thermophilus* viable (◼), *S. thermophilus* tratado con ultrasonido (◼), o tratado con alcohol (◼).

En la **Figura 3.19** se presenta un gráfico del perfil de AA en extractos de queso control (C) e inoculado con *S. thermophilus* 2 viable (St) a los 14 días de incubación, donde se puede observar que en general, dicho perfil no se modificó por el agregado de las células de *S. thermophilus*. Los cambios cuantitativos más importantes fueron en Leu y Pro.

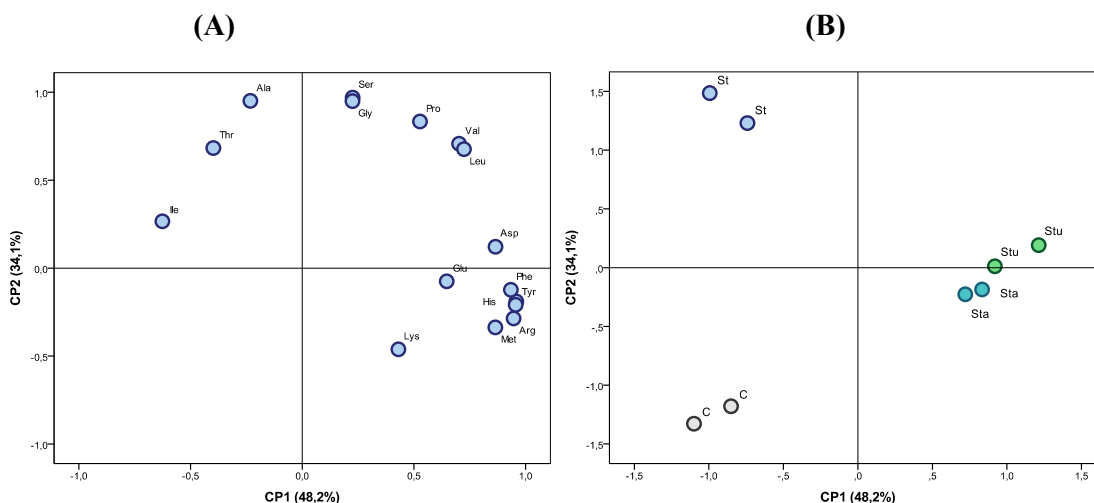


**Figura 3.19.** Perfil de los AA en los extractos de queso Cremoso sin inocular (▣) e inoculado con las células de *S. thermophilus* viable (▤)

Al aplicar un análisis de componentes principales a los 14 días de incubación, se extrajeron tres componentes que explicaron el 92,2 % de la variabilidad total. En la **Figura 3.20** se representan los gráficos de los scores y loading para los dos primeros componentes que explican el 82,3 % de las variables.

En el gráfico de loading se puede observar que para CP1 los AA con mayor impacto fueron Asp, Phe, Tyr, Arg e His, mientras que Ala, Thr e Ile tuvieron por el contrario una carga negativa en este CP. Para CP2, las variables de mayor influencia fueron Ala, Ser, Gly entre otras del semiplano positivo.

El gráfico de scores reveló una separación de los extractos Stu y Sta de los extractos St y C a lo largo del CP1, debido a un incremento de la mayoría de los AA. Asimismo, a lo largo del CP2 se verificó una separación del extracto C, de los Stu y Sta y de los St.



**Figura 3.20.** Gráfico de loading (A) y scores (B) del análisis de componentes principales de los AA presentes en los extractos de queso a 14 días de incubación.

### **3.2.5 Compuestos volátiles**

La incubación de los extractos de queso dio lugar a la formación de un gran número de compuestos volátiles, de los cuales 33 de los más relevantes se hallan detallados en la **Tabla 3.9**.

A los 3 días de incubación, los compuestos que tuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) fueron: etanol, acetoína, 1-heptanol y 4-OH-benzaldehído. Al mismo tiempo de incubación, también se detectaron diferencias con un nivel de significancia de  $P \leq 0,10$  para: 2-propanona, 2-butanona y 3-metilbutanal. A los 14 días de incubación, se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para: 2-hexanol y 1-heptanol. A igual tiempo pero a un nivel  $P \leq 0,10$ , se encontraron diferencias para: acetaldehído, 2-etil-1-hexanol, benzaldehído y 4-OH-benzaldehído.

Cinco de los compuestos que presentaron diferencias significativas son de especial interés para el presente trabajo de tesis ya que pueden derivar del metabolismo de aminoácidos. Ellos son etanol, acetoína, 3-metilbutanal, benzaldehído y 4-OH-benzaldehído.

La formación de compuestos volátiles en el extracto de queso Cremoso sin inocular se debe principalmente a reacciones químicas, ya que las enzimas provenientes del cultivo primario utilizado en la elaboración del queso Cremoso y/o de las enzimas de las NSLAB probablemente se encontraban inactivadas por el tratamiento térmico aplicado al extracto. Sin embargo, la reactivación de las enzimas a lo largo de la incubación también es una explicación posible.

El acetaldehído, compuesto que puede derivar de la Thr y el Asp, entre otras fuentes, mostró a los 14 días de incubación un incremento significativo ( $P \leq 0,10$ ) en el extracto con las células viables respecto al control y a los extractos experimentales (Stu y Sta).

Las áreas de 3-metilbutanal y butanona a los 3 días de incubación fueron significativamente mayores ( $P \leq 0,10$ ) en el extracto St que en el resto de los extractos (C, Stu y Sta). La 2-propanona en el extracto St fue significativamente mayor ( $P \leq 0,10$ ) que en los extractos Stu y Sta; aunque no resultó estadísticamente diferente del extracto C.

El área del pico de etanol a los 3 días de incubación en los extractos St y Sta fue significativamente mayor que en el extracto C ( $P \leq 0,10$ ). Además, el área en el extracto Sta se evidenció mayor que en Stu.

Por otro lado, el 2-hexanol mostró mayores valores de área en todos los extractos experimentales (St, Stu y Sta) respecto del extracto control a los 14 días de incubación ( $P \leq 0,05$ ), mientras que 1-heptanol resultó mayor en los extractos St y Stu respecto del C y Sta a 3 y 14 días de incubación.

La acetoina aumentó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en los extractos con células atenuadas Stu y Sta respecto del extracto St. Además, los niveles de este compuesto en los extractos Stu y Sta fueron más altos que en el extracto control, aunque esta diferencia no resultó significativa.

El 4-OH-benzaldehído, compuesto derivado de la Tyr, fue significativamente ( $P \leq 0,05$ ) menor en los extractos inoculados con las células viables respecto al resto de los extractos, tanto a 3 como a 14 días de incubación.

El benzaldehído, compuesto relacionado con el metabolismo de los aminoácidos Phe y Trp, aumentó significativamente ( $P \leq 0,10$ ) en el extracto Stu respecto del resto de los extractos (C, St y Sta) a los 14 días de incubación.

El fenol, compuesto relacionado con el catabolismo de la Tyr, presentó áreas significativamente mayores en los extractos Stu y Sta ( $P \leq 0,10$ ) que en los extractos St y C.

Por último, es conveniente destacar la presencia de los compuestos 1,2-propanodiol y acetofenona, moléculas que pueden derivar de Thr y Phe, ya que resultaron los únicos compuestos que sólo se detectaron en los extractos experimentales.

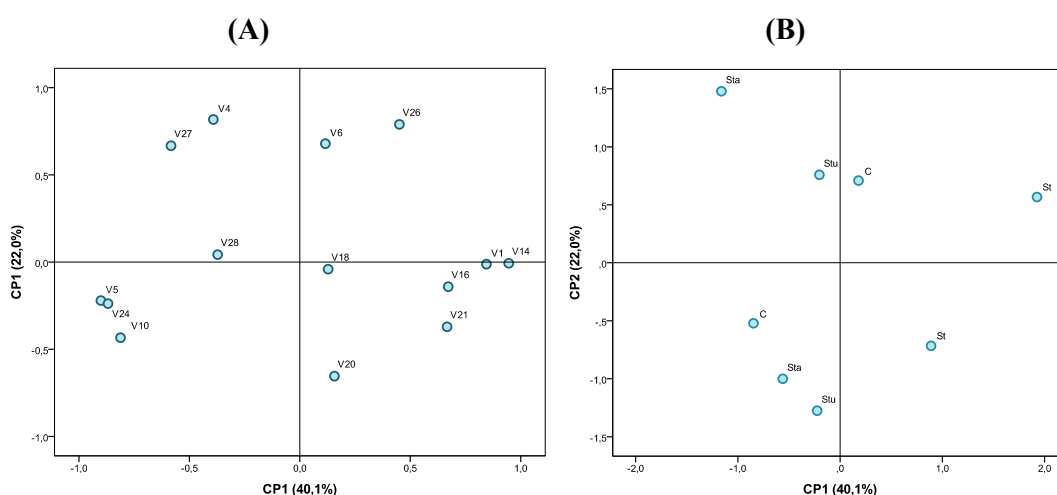
## Capítulo 3

**Tabla 3.9.** Compuestos compuestos volátiles en los extractos de queso a 3 y 14 días de incubación.

	AA precursor	3 días				14 días			
		C	St	Stu	Sta	C	St	Stu	Sta
Acetaldehído†	Asp, Thr	94 49	21 30	72 8	102 47	91 <sup>a</sup> 72	175 <sup>b</sup> 11	28 <sup>a</sup> 10	41 <sup>a</sup> 23
2-propanona*	-----	54 <sup>a,b</sup> 10	72 <sup>b</sup> 4	48 <sup>a</sup> 10	48 <sup>a</sup> 3	32 5	30 5	36 5	27 12
2-butanona*	-----	27 <sup>a</sup> 1	36 <sup>b</sup> 2	25 <sup>a</sup> 5	25 <sup>a</sup> 1	13 4	10 2	14 5	9 8
3-metilbutanal*	Leu	18 <sup>a</sup> 4	27 <sup>b</sup> 1	16 <sup>a</sup> 4	15 <sup>a</sup> 2	11 1	8 1	12 7	11 7
Etanol	Thr, Asp	57 <sup>a</sup> 10	81 <sup>b,c</sup> 1	62 <sup>a,b</sup> 3	96 <sup>c</sup> 12	73 11	62 13	76 7	90 2
Diacetilo	Asp	71 6	82 5	66 10	69 2	79 11	78 5	85 4	70 27
1-propanol	-----	7 5	6 8	11 1	11 1	7 2	9 1	7 2	8 2
2-hexanona	-----	92 14	106 14	83 21	92 5	48 3	30 2	37 12	46 21
2-pentanol	-----	76 12	107 6	81 38	80 17	39 2	38 1	38 6	30 6
Acetato de isoamilo	Leu, Gly, Ser	23 2	24 1	22 8	25 5	20 3	15 4	20 2	19 1
1-butanol	-----	45 13	47 4	43 9	46 1	45 6	39 4	45 12	45 3
2-hexanol	-----	11 1	16 4	11 2	12 2	9 <sup>a</sup> 1	18 <sup>b</sup> 1	17 <sup>b</sup> 1	18 <sup>b</sup> 3
Hexanoato de etilo	-----	40 10	63 9	34 1	43 1	29 13	55 13	25 7	71 65
Acetoína	Asp	382 <sup>a,b</sup> 12	345 <sup>a</sup> 24	420 <sup>b</sup> 1	391 <sup>b</sup> 9	408 11	456 40	418 1	400 19
1-heptanol	-----	9 <sup>a</sup> 1	13 <sup>b</sup> 2	14 <sup>b</sup> 2	9 <sup>a</sup> 1	9 <sup>a</sup> 2	13 <sup>b</sup> 1	16 <sup>c</sup> 1	8 <sup>a</sup> 1
Ác. acético	Asp, Ser, Ala, Gly	79 20	72 1	141 102	112 90	53 13	73 16	65 7	49 9
2-etil-1-hexanol†	-----	593 50	774 99	497 113	425 196	778 <sup>a,b</sup> 369	1443 <sup>b</sup> 240	832 <sup>a</sup> 28	648 <sup>a</sup> 135
Benzaldehído†	Phe, Trp	198 20	188 6	186 28	176 1	206 <sup>a</sup> 5	216 <sup>a</sup> 17	257 <sup>b</sup> 16	211 <sup>a</sup> 14
1 octanol	-----	10 1	13 1	11 1	9 1	12 2	15 1	14 1	12 1
1,2-propanodiol	Thr	n.d.	9 1	7 2	8 1	n.d.	n.d.	6 4	n.d.
Ác. butírico	-----	38 13	30 4	61 39	50 19	44 8	49 1	45 9	40 3
Acetofenona	Phe	n.d.	n.d.	6 1	7 10	n.d.	6 1	8 2	8 11
Ác. isovalérico	Leu	70 18	7 1	49 49	49 16	52 58	18 3	94 7	87 12
4 OH-benzaldehído†	Tyr	62 <sup>b</sup> 6	16 <sup>a</sup> 2	47 <sup>b</sup> 14	67 <sup>b</sup> 9	122 <sup>b</sup> 54	36 <sup>a</sup> 1	119 <sup>b</sup> 12	122 <sup>b</sup> 15
Ác. hexanoico	-----	44 8	35 3	78 28	62 9	77 16	83 9	77 11	73 6
Alcohol bencílico	Phe	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5 1	6 1	6 1	6 1
Benzotiazol	Cys, Met	15 2	13 1	19 6	16 5	57 15	33 9	38 10	65 35
Fenol†	Tyr	398 20	346 22	376 34	387 136	1040 <sup>a</sup> 122	1036 <sup>a</sup> 135	1468 <sup>b</sup> 65	1568 <sup>b</sup> 204
Ác. octanoico	-----	43 6	36 1	69 19	57 8	64 12	74 9	69 2	69 5
Ác. nonanoico	-----	n.d.	10 7	10 2	14 17	5 8	10 1	21 11	17 5
Ác. decanoico	-----	33 2	28 1	48 7	39 1	41 4	51 3	46 7	50 1
Delta dodecalactona	-----	8 1	6 1	8 5	8 2	9 3	7 1	10 2	10 3
Ác. dodecanoico	-----	9 1	7 1	10 1	8 1	9 1	11 1	10 3	10 1

Los valores representan el área promedio y la desviación estándar (en gris) de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio. Diferentes superíndices en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación indican la presencia de diferencias significativas. Las diferencias de  $P \leq 0,10$  a 3 y 14 días se indican con los símbolos \* y † respectivamente. En caso que no se indique se refiere a diferencias de  $P \leq 0,05$ .

Se realizó un análisis de componentes principales de los compuestos volátiles derivados de los aminoácidos a los 14 días de incubación. Del análisis se extrajeron 4 componentes que explicaron un 88,4 % de la variabilidad total. Para los dos primeros componentes CP1 y CP2, que representan un 62,1 % de la variabilidad, se presentan los gráficos de loading y scores. La figura revela que las variables: acetaldehído, acetoína, acético y butírico tienen un peso importante sobre el CP1 y que las variables: benzotiazol, 3-metilbutanal y diacetilo lo tienen sobre el CP2. En el gráfico de los scores, se observa una variación importante entre los extractos, aunque una leve separación a lo largo del eje del CP, se observa para las muestras de St en relación al resto de los extractos.



**Figura 3.21.** Gráficos de loading (A) y scores (B) del análisis de componentes principales de los compuestos volátiles que derivan de los aminoácidos a 14 días de incubación. Variables: v<sub>1</sub> acetaldehído, v<sub>4</sub> 3-metilbutanal, v<sub>5</sub> etanol, v<sub>6</sub> diacetilo, v<sub>10</sub> acetato de isoamilo, v<sub>14</sub> acetoína, v<sub>16</sub> acético, v<sub>18</sub> benzaldehído, v<sub>20</sub> 1,2-propanodiol, v<sub>21</sub> butírico, v<sub>24</sub> 4-OH-benzaldehído, v<sub>26</sub> alcohol bencílico, v<sub>27</sub> benzotiazol, v<sub>28</sub> fenol.

#### 4. Discusión

Durante el presente trabajo fue posible comprobar que los modelos de queso propuestos, tanto los quesos miniatura como el extracto estéril, constituían matrices experimentales reproducibles y representativas del alimento real. La importancia de la reproducibilidad observada en la composición global y el pH radica en que las actividades enzimáticas se ven fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales. En los quesos, las condiciones que más influyen son la concentración de sal en la humedad - parámetro asimilable a la aw - la temperatura y el pH. Estos primeros resultados, al demostrar que no existieron diferencias significativas de composición entre los quesos controles y experimentales, permiten en lo sucesivo adjudicar las diferencias halladas a los



### Capítulo 3

---

tratamientos y no a una inconstancia en el modelo utilizado. Milesi y col. (2007) e Hynes y col. (2000) informaron resultados similares para quesos miniatura, mientras que Milesi y col. (2011), Neviani y col. (2012) y Bergamini y col. (2013) comprobaron reproducibilidad para un modelo de extracto estéril de queso.

Los altos recuentos verificados para los estreptococos durante los 60 días de maduración de los quesos experimentales nos indican que la adición de células atenuadas o en su defecto el extracto libre de células obtenido por el disruptor celular, no generaron cambios significativos en la viabilidad del cultivo sin atenuar.

En general el crecimiento de BAL en la leche o suero va acompañado por una marcada disminución en el pH. En este mismo sentido, aunque las BAL son productores de abundantes cantidades de ácido láctico, la mayoría de las especies son neutrófilas y crecen mejor a niveles de pH por encima de 6,0 (Hutkins, 2006). Además, cuando las células son mantenidas a pH 5 o por debajo de este valor, incluso durante un corto período, pierden la viabilidad (Hutkins, 2006). En efecto, la principal diferencia en la viabilidad de la cepa de *S. thermophilus* 2 en el queso y en el extracto de queso puede adjudicarse al pH inicial. En el caso de los miniquesos, el pH inicial fue el de la leche, ligeramente acidificado (6,5), y durante las primeras horas de fermentación el pH del medio disminuyó hasta el pH final de 5,2. Muy diferente fue el caso de los extractos de queso, cuyo pH inicial fue de 5,2, y no sufrió variaciones significativas durante la incubación. Es conocido que *S. thermophilus* tiene la capacidad de mantener el pH interno mientras crece en leche en el rango de 6,8 a 5,2. Este último valor de pH (5,2) es considerado como el punto crítico, ya que a partir del mismo y por debajo de éste se comienza a perder la capacidad de mantener el pH en el citosol, y la viabilidad se ve afectada (Hutkins y Nannen, 1993). Esta es una de las principales diferencias entre *S. thermophilus* y los lactobacilos; por ejemplo *Lb. casei* es capaz de mantener el pH citoplasmático entre 5,1 y 6,4 cuando el pH externo es menor a 3,8 (Nannen y Hutkins, 1991). En este mismo sentido, Adamberg y col. (2003), que estudiaron el efecto del pH en el crecimiento y producción de ácido láctico, observaron que la cepa *S. thermophilus* 20 fue incapaz de crecer a un pH inferior a 5,1. Además, los índices de producción de lactato y crecimiento de *S. thermophilus* 20 disminuyeron rápidamente con una disminución del pH de 6,5 a 5,1. Por todo ello, se considera que el ambiente del extracto originó un efecto bacteriostático sobre *S. thermophilus* 2 durante la incubación, efecto que no fue observado en el queso donde la cepa se desarrolló y mantuvo números elevados de acuerdo a su desempeño habitual como fermento.

### Capítulo 3

---

Por otro lado, en los extractos de queso observamos un efecto positivo en la viabilidad de las células *S. thermophilus* 2 por el tratamiento de ultrasonido. Dicho efecto ha sido previamente informado por Wang y Sakakibara (1997) en cepas de *Lactobacillus* y por Sulaiman y col. (2011) en *Kluyveromyces marxianu*, entre otros autores.

La disminución incrementada de la lactosa observada en los quesos experimentales, se correlacionó con los efectos de los tratamientos de atenuación ensayados en la permeabilidad celular de *S. thermophilus* 2, informados en el capítulo anterior. De esta manera, los resultados obtenidos se fundamentan en una mayor accesibilidad de la  $\beta$ -GAL hacia la lactosa presente en el queso.

Además de la lactosa presente en los quesos, también se encontró galactosa en altas concentraciones, que no se modificó durante la maduración, debido a que *S. thermophilus* 2, como la mayoría de las cepas de esta especie, no es capaz de metabolizarla (Hols y col., 2005; St-Gelais y col., 2009). De hecho, son muy raras las cepas de *S. thermophilus* que poseen la capacidad de metabolizar la galactosa (Mukhurjee y Hutkins, 1994; de Vin y col., 2005; Anbukkarasi y col., 2013).

A diferencia de lo ocurrido en los quesos, la concentración de la lactosa en los extractos de queso no se modificó durante el período de incubación en ninguno de los extractos. Por otro lado, la galactosa también permaneció constante.

De los ocho ácidos orgánicos que se cuantificaron, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el piruvato presentan gran interés a los fines planteados en la presente tesis, ya que ambas moléculas pueden participar en el metabolismo de los aminoácidos al ser aceptores de grupo amino en la reacción de transaminación (Yvon, 2006). El incremento significativo del ácido pirúvico a los 3 días de maduración en el queso EU, y el incremento en los niveles (aunque no significativo) del pirúvico a 60 días y del  $\alpha$ -cetoglutarato a 3 y 60 días de maduración en las mismas muestras, sugiere que la permeabilización de *S. thermophilus* 2 mediante el tratamiento de ultrasonido tuvo un efecto positivo sobre la producción de dichos cofactores. Estos incrementos son consistentes con el aumento de las actividades de las enzimas indicadoras LDH y  $\beta$ -GAL halladas e informadas en el capítulo 2 para el tratamiento de ultrasonido, lo que luego se confirmó en las muestras de queso del presente capítulo. También va en el mismo sentido que el aumento en la concentración de algunos aminoácidos, como se verá más adelante.

Por otra parte, la concentración de lactosa en el queso EU a los 3 días no fue significativamente diferente del control, por lo que el incremento del ácido pirúvico no

### Capítulo 3

---

parece estar relacionado con la actividad glicolítica. Tampoco la vía aspartato aminotransferasa parece probable, ya que la concentración del Asp en todos los quesos fue mínima y más aún, no fueron significativas las diferencias entre controles y experimentales. La formación de pirúvico a partir del citrato podría descartarse también ya que *S. thermophilus* 2 no es capaz de metabolizar dicho ácido. El hecho de que existan numerosas vías metabólicas, como se verá en el capítulo siguiente, que convergen en el piruvato (Cocaign-Bousque y col., 1996; McSweeney y Sousa, 2000; Liu, 2003; Broadbent y col., 2004; Kaminarides y col., 2007), es una de las principales causas que dificultan la determinación del origen de este compuesto en las muestras, pero aparecen entre las probables vías de formación el metabolismo de la Ala (Le Bars e Yvon, 2008), y de la Ser (Liu y col., 2003b). Es probable que la concentración de ácido pirúvico sea un balance entre la producción y la degradación por varias vías metabólicas.

El hecho de no encontrar diferencias significativas en la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato entre muestras de queso controles y experimentales, indica que el desafío de las envolturas celulares de *S. thermophilus* 2 para lograr una mayor accesibilidad de la GDH-NAD dependiente, hallada en alta concentración en esta cepa, sobre el glutamato presente en la matriz alimentaria no resultó una estrategia adecuada. Otros autores que desafiaron cultivos de *S. thermophilus* por microfluidización y los incubaron en un sustrato de leche delactosada, arribaron a resultados similares a los de la presente tesis (Hayes y col., 2011).

Dicha comprobación puede explicarse desde diversos enfoques. Por un lado, es importante tener en cuenta que en la reacción de regeneración del  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del glutamato por la actividad GDH, es necesaria la presencia del cofactor  $\text{NAD(P)}^+$ , cuya reposición es limitada en las condiciones anaeróbicas de un queso, con un potencial redox negativo (Thage y col., 2005; Ardö, 2006; Ardö y Varming, 2010). Asimismo, se ha señalado que los cambios en el potencial de oxidoreducción debido a la deaminación oxidativa de glutámico a  $\alpha$ -cetoglutarato por parte de *S. thermophilus* podrían generar un freno en varias reacciones catabólicas de los aminoácidos (Kieronczyk y col., 2003; Helinck y col., 2004). En este sentido, también se ha determinado que el balance redox intracelular, reflejado principalmente por la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , juega un rol importante en el patrón de fermentación de *L. lactis* (Kleerebezem y col., 2000). Asimismo, la modificación del potencial redox del queso mediante la adición de agentes oxidantes o reductores a la leche de elaboración del queso ha demostrado un impacto

### Capítulo 3

---

significativo en los compuestos de flavour producidos (Caldeo y McSweeney, 2012). De esta manera, la limitación de ciertas actividades enzimáticas debido al potencial redox del medio e intracelular podrían ser una explicación posible a nuestros resultados.

Por otro lado, también hay que tener en cuenta que las actividades enzimáticas determinadas en las cepas estudiadas en la presente tesis, fueron realizadas luego del crecimiento de las mismas en condiciones óptimas, mientras que existen grandes variaciones en la expresión genética bacteriana en respuesta a distintas condiciones de crecimiento, en especial frente a las condiciones adversas presentes en el medioambiente del queso durante la maduración (Pastink y col., 2008; Taïbi y col., 2011). En los ensayos realizados en el presente capítulo, las cepas fueron expuestas a un medio adverso similar al presente en quesos durante la maduración: pH ácido, baja concentración de lactosa, y presencia de cloruro de sodio. La inhibición de la expresión de enzimas clave frente a dichas condiciones adversas ha sido propuesta como la explicación más probable para la falta de correlación detectada de la capacidad de formación de flavour en quesos o modelos de quesos por parte de cepas de lactobacilos o estreptococos que demostraron una alta actividad GDH en pruebas *in vitro* (Tanous y col., 2002; Kieronczyk y col., 2004; Williams y col., 2006; De Angelis y col., 2010a). Asimismo, un estudio llevado a cabo por De Angelis y col. (2010a,b) demostró que tanto la expresión como la actividad de enzimas clave pueden ser afectadas por las condiciones desfavorables presentes en el medioambiente del queso durante la elaboración y maduración. Estos autores observaron discrepancias en los niveles de actividad GDH de una cepa de *Lb. plantarum* luego del crecimiento en MRS, y estudiadas en condiciones similares a las encontradas en el queso (4 °C, pH 6,0 y 3,75 % NaCl), y la expresión de los genes que codifican dicha enzima en cultivos crecidos directamente en dichas condiciones desfavorables.

Por otro lado, Helinck y col. (2004) han observado que el catabolismo de AA por parte de una cepa de *S. thermophilus* con alta actividad GDH fue similar al demostrado por lactobacilos mesófilos en otro estudio llevado a cabo en condiciones similares (Tanous y col., 2002). Estos autores establecieron que en su caso, no hubo una limitante en la degradación de AA por la acumulación de  $\alpha$ -cetoácidos sin subsiguiente degradación ya que cuando se adicionó  $\alpha$ -cetoglutarato al medio, hubo mayor degradación. De esta manera, Helinck y col. (2004) postularon que la GDH de *S. thermophilus* es menos eficiente para producir  $\alpha$ -cetoglutarato que otras BAL GDH (+), aunque no dieron una explicación de las posibles causas.

### Capítulo 3

---

Por último, también es importante considerar que la actividad glutamato decarboxilasa, que cataliza la conversión de Glu a GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), que constituye un medio para regular el pH intracelular en un medioambiente ácido, ha sido detectada en cepas de *S. thermophilus* (Ardö y col., 2002; Ardö, 2006). En los extractos, *S. thermophilus* estuvo expuesto a un medio adverso ácido desde el inicio de la experiencia y podría haber derivado el Glu hacia GABA, en vez de producir  $\alpha$ -cetoglutarato por la actividad GDH. En la presente tesis no determinamos la concentración de GABA.

En el modelo del extracto de queso, el comportamiento en cuanto a la formación de ácido pirúvico fue diferente al del queso Cremoso miniatura, ya que a los 14 días de incubación todos los extractos inoculados con la cepa de *S. thermophilus* 2 viables o atenuadas, mostraron un nivel de pirúvico menor con respecto al extracto sin inocular. Estos resultados sugieren que la cepa tuvo la capacidad de metabolizarlo en dichas condiciones, inclusive las células no viables del extracto Sta. La diferencia de lo ocurrido entre los modelos para el caso del piruvato, puede ser deberse a la diferencias de temperatura de mantenimiento de ambos modelos. En efecto, un incremento de la actividad aminotransferasa que utilice el piruvato como compuesto aceptor de grupos amino en la reacción de transaminación de los aminoácidos podría justificarse por el uso de una temperatura más próxima a la óptima (Yvon, 2006). En efecto, la mayoría de las enzimas involucradas en el catabolismo de los AA tienen temperaturas óptimas entre 30 °C y 45 °C (Yvon y col., 2000; Curtin y col., 2001; Thage y col., 2004b), las cuales están más próximas a las utilizadas durante la incubación del extracto.

Esta misma observación se verificó para el  $\alpha$ -cetoglutarato que, al contrario de lo ocurrido en los quesos Cremoso miniatura, aumentó en todos los extractos inoculados, sin que se hallaran diferencias entre los tratamientos de las células. De esta manera, la conversión de Glu en  $\alpha$ -cetoglutarato parece haberse visto favorecida en el extracto con respecto al queso Cremoso miniatura, a pesar de que ambos modelos contenían las mismas cepas; dicha diferencia, por lo tanto, sustenta, entre las explicaciones posibles, la hipótesis de que el medio y las condiciones de incubación/maduración fueron condicionantes para la expresión o actividad de la enzima en los quesos miniatura.

En cuanto a la fermentación láctica en los modelos propuestos, se destaca que la producción de ácido láctico en todos los quesos Cremoso miniatura fue similar, lo que resultó acompañado por valores de pH muy similares para todos los tratamientos, y por el hecho de que no se evidenció postacidificación o sobreacidificación en los quesos con el

### Capítulo 3

---

agregado de cultivos atenuados. En los extractos, tampoco hubo cambios significativos en el pH, como ya se discutió al principio de esta sección, y dicha constancia fue también verificada para la concentración de ácido láctico en los distintos tipos de extracto.

El citrato fue el segundo ácido orgánico más abundante en todas las muestras, luego del ácido láctico. Resultados similares fueron informados por Milesi y col. (2010) para un modelo similar y por Izco y col. (2002) para queso Cheddar. El hecho de que la concentración del ácido cítrico en los quesos no disminuyera durante el período de maduración o incubación del extracto confirma que, además de *S. thermophilus*, especie que alberga cepas citrato-negativas (McSweeney y Sousa, 2000; St-Gelais y col., 2009; Beresford, 2011), no estuvieron presentes contaminaciones capaces de metabolizar el citrato. El incremento del ácido cítrico a los 3 días de incubación en todos los extractos inoculados (St, Stu y Sta) sugiere la capacidad de producirlo. En este mismo sentido, diversos autores han obtenido resultados similares (McGregor y White, 1990; Lues y Bekker 2002; Upreti y col., 2006) observaron un incremento de ácido cítrico durante la maduración del queso. Upreti y col. (2006) sugieren que dicho incremento podría provenir del oxaloacetato por acción de la citrato sintasa.

Como ya se mencionó, el ácido acético puede derivar del metabolismo de la lactosa, del citrato y de algunos aminoácidos tales como el Asp, Ser, Ala, Gly (Ong y col., 2007). Liu y col. (2003b) informaron la producción de acetato, entre otros metabolitos, como el ácido fórmico, a partir del catabolismo de la Ser en una cepa aislada de queso, *Lb. plantarum* B3089. Kieronczyk y col. (2001) sugieren la utilización de la Ser por *Lactobacillus* como fuente de energía. También se ha observado la degradación de Ser a piruvato en *L. lactis* (Novak y col., 1997; Lahtvee y col., 2011). Los resultados del presente capítulo sugieren descartar al citrato como origen del acetato producido ya que el fermento involucrado no fue capaz de metabolizarlo y además la concentración de citrato permaneció constante en ambos modelos aplicados. En los miniquesos, el ácido acético aumentó significativamente cuando se aplicaron tratamientos de permeabilización, para los 5 tratamientos ensayados. Estos cambios se verificaron mediante el estudio de los ácidos solubles en agua (HPLC) para los tratamientos EU, ES y ED, y para el ensayo de compuestos volátiles en el caso de EM y EA. Por el contrario, no se hallaron variaciones significativas para el acético en la experiencia de los extractos.

La presencia de los ácidos orótico, hipúrico y úrico en los quesos y en los extractos controles y experimentales es consecuencia de que se hallan naturalmente en la leche. El

### Capítulo 3

---

ácido orótico es un compuesto intermediario en la biosíntesis de las pirimidinas (Park, 2009). Se ha sugerido que las BAL pueden utilizar este ácido como fuente de energía (Smeianov y col, 2007). Upreti y col. (2009), que observaron disminución del ácido orótico durante el período de maduración del queso, indicaron que las BAL lo utilizan como un factor de crecimiento. En el presente trabajo, el ácido orótico se mantuvo más o menos constante en ambos modelos ensayados. El ácido úrico, compuesto caracterizado como antioxidante en muchos sistemas biológicos, proviene de la descomposición de nucleótidos por microorganismos del rumen (Vogels y der Drift, 1976; Fox y col., 2000; Østdal y col., 2000). Al igual que para el orótico, el fermento utilizado no mostró la capacidad de metabolizar el ácido úrico. Por último, el ácido hipúrico, compuesto que puede formarse a partir de ácido benzoico (Sieber y col., 1995), tampoco se vio afectado por los tratamientos

En lo que hace al aumento de la peptidólisis por *S. thermophilus* 2, éste fue muy bajo en ambos modelos estudiados, aunque sí hubo un aumento significativo en los AA totales atribuible al daño en los envoltorios celulares, lo que se verificó para los dos modelos, queso y extracto. En los miniquesos, se encontraron diferencias significativas para el tratamiento de ultrasonido y SDS, y en los extractos, para los dos tratamientos estudiados (etanol y ultrasonido). El incremento de los aminoácidos totales se produjo por aumentos netos en la concentración de algunos aminoácidos del perfil, mientras la mayoría permanecieron constantes y algunos disminuyeron levemente.

El sistema proteolítico de *S. thermophilus* es similar al de otras BAL, y aunque se conoce que *S. thermophilus* está potencialmente equipado con más de 20 enzimas proteolíticas, no se ha caracterizado completamente y en parte es inferido de *Lactococcus lactis* (Hols y col., 2005). La actividad de la proteasa de pared de *S. thermophilus* y de lactococos comparten un número de propiedades, incluyendo pH y temperatura óptimas, activadores e inhibidores, pero esta actividad enzimática es mucho menos frecuente en cepas de la especie *S. thermophilus* que en lactococos (Shahbal y col., 1993). En cuanto a la actividad de las peptidasas, estas sí están más frecuentemente distribuidas en la especie y son similares a las de *Lactococcus lactis*. Se informó que PepN de *S. thermophilus* A, por ejemplo, muestra un pH óptimo de 7 y una temperatura óptima de 37 °C (Chavagnat y col., 1999). Letort y col. (2002), observaron que en las primeras etapas de crecimiento de *S. thermophilus* ST18 en la leche disminuyó la concentración de algunos aminoácidos

### Capítulo 3

---

mientras que en la segunda fase de crecimiento algunos se incrementaron, describiendo la actividad de esta cepa de *S. thermophilus* para producir y degradar los AA en leche.

La diversidad de los compuestos volátiles hallados en ambos modelos es característica de la composición de alimentos complejos como el queso (Marilley y Casey, 2004), y aunque hubo algunas diferencias en las moléculas volátiles del extracto y de los miniquesos, en general se mantuvo un perfil similar. Entre las diferencias, merece destacarse la presencia de 4-OH-benzaldehído, acetofenona, benzotiazol y 1-2 propanodiol, que sólo fueron detectados en los extractos. Como se mencionó anteriormente, una de las mayores diferencias entre los dos modelos radica en la temperatura a la cual se mantuvieron. En este mismo sentido, se ha comprobado que una variación de 7 °C influye en la producción de volátiles: Azizan y col. (2012) observaron que el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 en medio M17 a 30 °C y a 37 °C, producía diferentes compuestos volátiles. Además, numerosos trabajos destacan la variación de las actividades enzimáticas involucradas en la producción de aroma en queso, de acuerdo al medio de cultivo en el cual fueron crecidas (Jensen y Ardö, 2010; Pedersen y col., 2013), o bien la influencia de la temperatura sobre dichas actividades enzimáticas (De Angelis y col., 2010a,b).

La producción de acetoína y diacetilo aumentó para algunos de los tratamientos de permeabilización adoptados. En el caso del tratamiento con SDS se verificó el aumento de acetoína en los quesos a los 60 días de maduración. Estos cambios parecen indicar que la permeabilización favoreció el incremento de alguna de las múltiples vías que convergen en el ácido pirúvico, que como se describió anteriormente es precursor de ambos compuestos. Entre estas vías es posible la transaminación del aspartato (Le Bars y Yvon, 2008).

El ácido 2-metil-propanoico sólo fue identificado en los quesos miniatura de la primera experiencia a los 60 días de maduración. Aunque se haya encontrado en bajos niveles, su aparición indica la degradación de la Val, ya que dicho aminoácido es precursor de este volátil (Banks y col., 2001; Tammam, y col., 2000; Singh y col., 2003; Curtin y McSwenney, 2004; Beck, 2005; Smit y col., 2005; Azizan y col., 2012), o de la Leu, otro aminoácido ramificado, ya que el  $\alpha$ -cetoácido derivado de la reacción de transaminación de la Leu ( $\alpha$ -cetoisocaproato), puede formar el aldehído precursor (2-metilpropanal) del 2-metil-propanoico (Smit y col., 2005). También el aldehído 3-metilbutanal, derivado del catabolismo de la Leu (Marilley y Casey, 2004; Smit y col., 2005), se incrementó en al menos uno de los tratamientos estudiados, indicando que la cepa es capaz de producirlo.



### Capítulo 3

---

El acetaldehído es un compuesto que puede derivar de numerosas vías, siendo algunas de ellas el metabolismo de la lactosa, Thr, Asp e inclusive nucleótidos derivados del ADN (Lees y Jago 1978; Chaves y col., 2002). El posible equilibrio entre acetaldehído y etanol puede hallarse en el incremento de acetaldehído a los 14 días de incubación en el extracto St, concomitante con la disminución del etanol durante la incubación. También el aumento del etanol en St y Stu respecto al control, puede relacionarse con la disminución del acetaldehído en dichos extractos, siempre respecto del control.

El 4-OH-benzaldehído es un compuesto que se ha detectado en quesos semiduros y proviene del catabolismo de la Tyr (Singh y col., 2003; Curtin y McSweeney, 2004). En efecto, la Tyr a través de la reacción catalizada por una aminotransferasa específica produce el 4-OH-fenilpiruvato; que puede degradarse espontáneamente a 4-OH-benzaldehído (Smit y col., 2004a; McSweeney y Sousa, 2000; Curtin y McSweeney, 2004). El hecho de que el extracto St presentara niveles significativamente inferiores al resto de los extractos (Stu, Sta y C) a 3 y a 14 días de incubación, sugiere que la cepa estudiada podría poseer actividad hidroxilácido dehidrogenasa que transforma los cetoácidos en hidroxilácidos, una actividad no deseada ya que estos últimos compuestos no contribuyen al aroma. En este mismo sentido, Broadbent y col. (2004) sugieren que la disminución significativa del benzaldehído en el queso inoculado con una cepa mutante caracterizada por tener alta actividad hidroxilácido dehidrogenasa (*Lb. casei* HADH), se debió a la disminución del  $\alpha$ -cetoácido formado de la degradación de la Phe (fenilpiruvato), por la actividad de dicha enzima, lo que origina una menor cantidad de fenilpiruvato que puede degradarse espontáneamente a benzaldehído. Aunque las diferencias fueron mínimas, y no llegaron a ser significativas, en nuestro caso también comprobamos que en los extractos de queso a 3 días de incubación el benzaldehído disminuyó. El benzaldehído posee aroma característico a almendras amargas, y ha sido hallado en una gran variedad de quesos (Corrêa Lelles Nogueira y col., 2005), puede provenir de la Phe y/o Trp, vía reacción enzimática y degradación química, respectivamente (Groot y de Bont, 1998; McSweeney y Sousa, 2000; Gummalla y Broadbent, 2001; Klein y col., 2001).

La acetofenona, compuesto que previamente se ha encontrado en queso Cheddar (McSweeney y Sousa, 2000), solamente fue identificada en los extractos inoculados; esta acetona deriva de la degradación de la Phe (Griffith y Hammond, 1989; Sieber y col., 1995; Urbach 1997).

El fenol, en tanto, puede producirse por degradación de Strecker a partir de la Tyr (Tavaria y col., 2002; Singh y col., 2003; Curtin y McSweeney, 2004). El incremento observado a los 14 días de incubación en los extractos Stu y Sta, coincide con el incremento de la concentración de Tyr en ambos extractos.

La presencia del 1,2-propanodiol solamente en los extractos inoculados con la cepa de *S. thermophilus* 2, ya sea viable o atenuada, indica la utilización de la Thr (Tavaria y col., 2002).

Por último, tanto en extractos de quesos como en los quesos miniatura, fue posible identificar metilcetonas (2-propanona, 2-butanona, etc.) y alcoholes secundarios (2-pentanol, 2-hexanol, etc.) que se deben a la beta oxidación y decarboxilación de los ácidos grasos. Por otro lado, los ésteres (hexanoato de etilo, acetato de isoamilo, etc.), provienen de la reacción de los ácidos grasos con alcoholes (Collins y col., 2003b; Marilley y Casey, 2004). Algunos AA tales como Leu, Gly y Ser, podrían contribuir a la producción del acetato de isoamilo debido a que la degradación de la Leu produce 3-metil-1-butanol (alcohol isoamilico), y el ácido acético como ya se discutió proviene de diversos caminos metabólicos y es habitual en queso (Fernández y Zúninga 2006; Yvon, 2006); ambos compuestos son precursores de acetato de isoamilo.

## **5. Conclusiones**

El monitoreo de la lisis o permeabilización de las células del fermento requiere una estrategia que incluya varios índices, a los fines de llegar a conclusiones valederas. En el presente trabajo, la actividad  $\beta$ -galactosidasa, combinada con el seguimiento del catabolismo de la lactosa, verificado en las matrices alimentarias estudiadas, fueron medidas complementarias y útiles para evaluar el daño a los envoltorios celulares en el cultivo estudiado.

Los tratamientos de atenuación, si bien facilitaron la accesibilidad a las enzimas indicadoras LDH y  $\beta$ -GAL - y este cambio se vio reflejado en modificaciones en la bioquímica de la maduración de los miniquesos y durante la incubación de los extractos - no tuvieron gran impacto sobre la producción de péptidos, aminoácidos y ácidos orgánicos. Entre las diferencias de importancia, sin embargo, vale señalar aquellas encontradas para el  $\alpha$ -cetoglutarato y el ácido pirúvico, compuestos claves para la formación de volátiles en etapas posteriores. Este hallazgo correlaciona con las diferencias entre tratamientos encontradas en los compuestos volátiles, donde sí fue posible determinar mayor

### Capítulo 3

---

producción de compuestos derivados de aminoácidos para algunos de los tratamientos de atenuación.

Una explicación acerca del bajo impacto de la permeabilización en la transformación de aminoácidos por parte de la cepa estudiada puede basarse en la distinta permeabilización que AT y GDH pueden mostrar con respecto a las indicadoras LDH y  $\beta$ -GAL: en efecto, pueden ser de mucho menor accesibilidad, o bien, al contrario, haberse liberado completamente al medio y no estar activas en el mismo. Sin embargo, cuando la lisis celular mediante disruptor se aplicó para analizar las enzimas AT y GDH en las cepas de *S. thermophilus* estudiadas, ambas mostraron valores elevados, especialmente *S. thermophilus* 2, y en presencia del cofactor adecuado, transformaron el aminoácido de interés o formaron  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de glutamato. Otra hipótesis posible radica en alguna falla de los sistemas transportadores de membrana necesarios para que los aminoácidos ingresen al interior celular. Las cepas de lactobacilos mesófilos estudiadas en esta tesis, con actividades AT y GDH similares o menores que *S. thermophilus*, fueron capaces de formar compuestos de flavor a partir de los aminoácidos en modelos casearios, lo que se abordará en el capítulo 4.

Los resultados del presente capítulo dejan en evidencia que la integridad celular del fermento de *S. thermophilus* 2 no es la principal causa de la baja producción de aroma en quesos.

## *Capítulo 4*

*“Influencia de lactobacilos mesófilos en la  
producción de compuestos de aroma y  
cooperación con fermentos lácticos primarios”*

**1. Introducción.**

Las características de flavour de los distintos tipos de quesos son fundamentales en la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores. Por esta razón, el estudio de estrategias para lograr un incremento del desarrollo de aroma y sabor durante la etapa de maduración de quesos es una temática de gran interés para industriales e investigadores relacionados a la producción quesera. Asimismo, la aceleración del proceso de maduración para disminuir los costos de producción constituye otro de los tópicos de gran interés para las industrias lácteas (Law, 2001; Upadhyay y McSweeney, 2003).

La participación de las BAL, a través de sus capacidades enzimáticas características, es fundamental en el desarrollo de aroma y sabor de la mayoría de los quesos (Urbach, 1995; Steele y col., 2013). En particular, mediante reacciones catalizadas por aminotransferasas (AT), las bacterias lácticas (BAL) inician el catabolismo de los aminoácidos (AA) generando  $\alpha$ -cetoácidos, que son posteriormente degradados a una gran gama de compuestos aromáticos: ácidos carboxílicos, aldehídos, alcoholes y ésteres, entre otros compuestos constituyentes del flavour (Yvon y Rijnen, 2001; Yvon, 2006). Como ya ha sido mencionado en capítulos anteriores, para que se produzca la transaminación, es necesaria la presencia de un aceptor del grupo amino como el  $\alpha$ -cetoglutarato. Este compuesto se encuentra presente naturalmente en el queso, aunque en baja proporción, y por este motivo ha sido identificado como el reactivo limitante en la biosíntesis de aroma (Yvon y col., 1998). En efecto, la adición exógena de este cosustrato a la leche de elaboración de quesos demostró un incremento significativo del catabolismo de aminoácidos con una consecuente mayor producción de compuestos volátiles (Yvon y col., 1998; Banks y col., 2001; Casey y col., 2004), e incluso se depositó una patente que describe esta estrategia tecnológica (Yvon y Gripon, 2003). Por otro lado, para superar el déficit en la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato en el queso y evitar la adición del mismo como un ingrediente, se ha propuesto la utilización de fermentos lácticos que posean la actividad glutamato dehidrogenasa (GDH). Esta enzima cataliza la producción del  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del glutamato, que existe naturalmente en el queso en una cantidad relativamente elevada (Tanous y col., 2002). En este sentido, el uso de cepas de lactococos o lactobacilos con alta actividad GDH produjo un incremento en la formación de compuestos de aroma derivados del catabolismo de aminoácidos (Rijnen y col., 2000; Williams y col., 2006; De Angelis y col., 2010a). Sin embargo, también se ha encontrado que algunas cepas de BAL con alta actividad GDH, como cepas de *S. thermophilus*, degradan los aminoácidos con producción de  $\alpha$ -cetoácidos, que se acumulan pero no pasan a compuestos de aroma (Tanous

## Capítulo 4

---

y col., 2002; Helinck y col., 2004). De esta manera, la combinación de BAL que posean actividades enzimáticas claves, como la AT y la GDH, podría conducir a un mayor control de la producción de aroma y sabor en el queso, a través de la transformación de los aminoácidos en compuestos volátiles y la continua “reposición” del cosustrato necesario para dicha reacción (Kieronczyk y col., 2004; Tanous y col., 2005; Amárta y col., 2006). El uso de mezclas de cepas con caminos metabólicos complementarios podría conducir a un incremento en el desarrollo de compuestos volátiles, aunque también puede ocurrir una interacción negativa, donde compuestos deseables producidos por una cepa son degradados por la otra (Pastink y col., 2008; Smit y col., 2009). Algunos escasos estudios han informado complementación positiva entre cepas de lactococos y lactobacilos (Ayad y col., 2001, 2000; Amárta y col., 2006), mientras que no existen trabajos de investigación sobre cooperación entre cepas de lactobacilos mesófilos, usados en general como fermentos adjuntos, y cepas de *S. thermophilus*, que es la especie bacteriana más comúnmente utilizada en nuestro país como fermento primario en la elaboración de quesos blandos y semiduros.

En relación a las aminotransferasas, se ha planteado la existencia de una competencia entre las ATs por el cosustrato de la reacción ( $\alpha$ -cetoglutarato), estableciéndose de esta manera la importancia del perfil de actividad AT hacia distintos AA de cada cepa láctica, sobre los compuestos volátiles producidos (Kieronczyk y col., 2004; Thage y col., 2005).

Por otro lado, el incremento de la accesibilidad de las enzimas implicadas en la producción de compuestos de flavour a sus sustratos específicos es otro de los factores que se ha estudiado intensamente con el objetivo de aumentar el aroma de los quesos. En este sentido, se han ensayado una gran diversidad de métodos de atenuación en BAL que, con diferentes principios alteran la permeabilidad de las membranas celulares llegando en algunos casos a la lisis celular (Morgan y col., 1997; Bury y col., 2001; O’Sullivan y col., 2003; Sheehan y col., 2005; Martínez-Cuesta y col., 2006a; Doolan y Wilkinson., 2009; Hayes y col., 2011). Sin embargo, algunas enzimas requieren la integridad celular para su actividad ya sea por la necesidad de los cofactores presentes en el citoplasma o bien por las condiciones medioambientales tales como el valor de pH interno que, por lo general, es el óptimo para las enzimas (Niven y Mulholland, 1998; Smit y col., 2009).

El objetivo de este capítulo fue caracterizar la fermentación de azúcares, el metabolismo de aminoácidos y producción de compuestos de aroma en un modelo de queso blando por parte de cepas de lactobacilos mesófilos con diferente perfil de aminotransferasas, y la posibilidad de cooperación en la formación de aroma entre estos fermentos y una cepa de *S.*

## Capítulo 4

*thermophilus* con alta actividad glutamato dehidrogenasa, ya sea viable o sometida a tratamientos de atenuación.

### 2. Materiales y métodos

#### 2.1. Diseño experimental

Las experiencias del presente capítulo fueron realizadas empleando un modelo de queso blando consistente de extractos acuosos de queso cremoso esterilizados por calor. En la **Tabla 4.1** se presenta el diseño experimental aplicado. Cada tratamiento experimental se realizó por duplicado utilizando dos cultivos celulares independientes para la inoculación en cada réplica.

**Tabla 4.1.** Diseño experimental

	Cepas inoculadas	Código
Control	-----	C
Experiencia 1	<i>Lb. paracasei</i> 90	90
	<i>S. thermophilus</i> + <i>Lb. paracasei</i> 90	St+90
	<i>S. thermophilus</i> atenuado con ultrasonido + <i>Lb. paracasei</i> 90	Stu+90
	<i>S. thermophilus</i> atenuado con alcohol + <i>Lb. paracasei</i> 90	Sta+90
Experiencia 2	<i>Lb. casei</i> 72	72
	<i>S. thermophilus</i> + <i>Lb. casei</i> 72	St+72
	<i>S. thermophilus</i> atenuado con ultrasonido + <i>Lb. casei</i> 72	Stu+72
	<i>S. thermophilus</i> atenuado con alcohol + <i>Lb. casei</i> 72	Sta+72

#### 2.2. Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de lactobacilos estudiadas en las experiencias del presente capítulo: *Lactobacillus paracasei* 90 y *Lactobacillus casei* 72, fueron seleccionadas por presentar diferente perfil enzimático de aminotransferasas (ver capítulo 1). La cepa de *Lb. paracasei* 90 presentó niveles de AT mucho mayores para el Asp, mientras que la cepa de *Lb. casei* 72 presentó niveles similares para los ocho aminoácidos estudiados. A su vez, la cepa de *Lb. paracasei* 90 mostró cierto nivel de actividad GDH-NAD dependiente, mientras que la cepa de *Lb. casei* 72 mostró niveles insignificantes. De las dos cepas de *Streptococcus thermophilus* estudiadas en la presente tesis, se eligió para las experiencias de cooperación con lactobacilos mesófilos, aquella que presentó mayor actividad GDH, que fue la *S. thermophilus* 2. Las cepas se reactivaron y cultivaron en los mismos medios de cultivo y condiciones descriptos en el capítulo 1.

### **2.3. Preparación, inoculación e incubación de los extractos de quesos**

Los extractos fueron preparados a partir de quesos cremosos elaborados en la planta piloto del Instituto, con la misma metodología que se describió en el capítulo 3. Luego de la filtración, estandarización del contenido de sal a 1,5 % y esterilización por calor a 70 °C durante 30 minutos, el volumen total del extracto preparado fue dividido en 9 botellas estériles: 8 se utilizaron para la inoculación con las cepas de lactobacilos y la cepa de estreptococo en distintos estados fisiológicos de acuerdo al diseño experimental (**Tabla 4.1**) y la botella restante no se inoculó y se utilizó como control. Para inocular los extractos, el crecimiento de las tres cepas se realizó en sus medios de cultivo correspondientes hasta la fase logarítmica tardía, luego las células fueron cosechadas por centrifugación (12000 g - 10 min - 4 °C) y lavadas dos veces con buffer fosfato de potasio 50 mM - pH 7, con la finalidad de eliminar cualquier resto de medio de cultivo. Por otro lado, el cultivo de *S. thermophilus* permeabilizado fue preparado como se describió en el capítulo 2, exponiendo las células de *S. thermophilus* 2 a una solución de etanol al 40 % durante 30 min a 37 °C o a la acción de las ondas de ultrasonido durante 1 hora a una frecuencia de 47 kHz y potencia 80 w a baja temperatura, para los tratamientos de etanol y ultrasonido, respectivamente. Finalmente, las células viables y atenuadas se resuspendieron en un pequeño volumen de extracto de queso estéril, que se utilizó inmediatamente para la inoculación en las 8 botellas correspondientes según el diseño experimental. El volumen a inocular de cada cepa para lograr un recuento inicial de  $7 \cdot 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> en los extractos, fue calculado en base a resultados previos del nivel de población alcanzada de cada una de las cepas estudiadas en el mismo medio de crecimiento e igual tiempo de incubación. En el caso de las células atenuadas de *S. thermophilus*, se utilizó en cada caso la misma cantidad que la utilizada para las células de *S. thermophilus* viables. Por último, el volumen de cada extracto inoculado fue homogenizado correctamente y dividido en tubos independientes para el muestreo a distintos tiempos de incubación: 0, 3, 7 y 14 días para los análisis correspondientes. La incubación fue realizada a 37 °C durante 14 días. Las experiencias de inoculación e incubación se llevaron a cabo por duplicado utilizando cultivos independientes de las cepas en estudio para cada réplica. Con el objetivo de minimizar la variabilidad en los resultados debido a diferencias en la matriz ensayada, se utilizó la misma preparación de extracto de queso en ambas réplicas.

### **2.4. Análisis durante la incubación**

Durante la incubación de los extractos, a 3, 7 y 14 días, se realizaron determinaciones de pH y recuentos microbiológicos en placa, utilizando medios agarizados de Elliker y MRS



## Capítulo 4

---

(ambos de Biokar, Beauvais, Francia) para el control del crecimiento y viabilidad de *Streptococcus thermophilus* y de los lactobacilos mesófilos, respectivamente. Asimismo, a 3 y 14 días de incubación se realizaron los análisis de azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos libres y perfil de compuestos volátiles utilizando las metodologías descritas en el capítulo 3.

### 2.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas entre los distintos extractos de cada experiencia atribuibles a una cooperación o inhibición de las reacciones enzimáticas microbianas. Asimismo, los resultados obtenidos en los extractos inoculados con las cepas individuales de *Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72 fueron analizados por ANOVA de una vía para caracterizar el impacto de cada cepa en el metabolismo de aminoácidos y producción de compuestos de aroma y correlacionar los resultados con sus actividades GDH y AT específicas. Finalmente, se aplicó un análisis por componentes principales para estudiar los perfiles de ácidos orgánicos y aminoácidos libres para todos los extractos en su conjunto.

## 3. Resultados

### 3.1. Recuentos microbiológicos

En los extractos control, no se detectó crecimiento microbiano durante la incubación, confirmando de esta manera que los tratamientos de filtración y calentamiento fueron efectivos para mantener la esterilidad.

En los extractos testigo y experimentales, en los cuales las cepas de lactobacilos fueron inoculadas de manera de alcanzar una concentración de  $7 \cdot 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, se observó un incremento de la población microbiana en los primeros días de incubación, alcanzando niveles de más de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a los 3 días, excepto para los extractos Stu+72 y Sta+72, en los cuales se alcanzaron niveles de alrededor  $3 \cdot 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Luego, se detectó una disminución de la población hasta niveles entre  $3 \cdot 10^5$  a  $2 \cdot 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> a los 14 días de incubación (**Tabla 4.2**). En la experiencia 1, se hallaron menores niveles finales en el caso del extracto St+90, mientras que en la experiencia 2, se observaron menores niveles finales para el caso de la inoculación de la cepa 72 en conjunto con St y Stu. En general, se observaron mayores niveles de población de lactobacilos en los extractos que contenían *Lb. paracasei* 90 durante los primeros 7 días, pero al final de la incubación, *Lb. casei* 72 ambas cepas alcanzaron valores similares.

## Capítulo 4

**Tabla 4.2.** Recuentos microbiológicos de *Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72 en los extractos durante la incubación, expresados en UFC mL<sup>-1</sup>.

		Incubación (días)		
		3	7	14
Control		<10	<10	<10
Experimental 1	90	8 10 <sup>8</sup>	2 10 <sup>7</sup>	9 10 <sup>5</sup>
	St+90	7 10 <sup>8</sup>	2 10 <sup>7</sup>	4 10 <sup>5</sup>
	Stu+90	5 10 <sup>8</sup>	1 10 <sup>7</sup>	1 10 <sup>6</sup>
	Sta+90	4 10 <sup>8</sup>	2 10 <sup>7</sup>	1 10 <sup>6</sup>
Experimental 2	72	3 10 <sup>8</sup>	1 10 <sup>6</sup>	2 10 <sup>6</sup>
	St+72	4 10 <sup>8</sup>	1 10 <sup>6</sup>	3 10 <sup>5</sup>
	Stu+72	4 10 <sup>7</sup>	4 10 <sup>6</sup>	5 10 <sup>5</sup>
	Sta+72	2 10 <sup>7</sup>	1 10 <sup>6</sup>	2 10 <sup>6</sup>

En relación a los recuentos de *S. thermophilus*, en los extractos donde se agregó dicho fermento en forma viable, a partir de los 3 días ya no se detectaron células viables mediante recuento en placa. En los extractos en que se estudió la cooperación entre células viables de lactobacilos y células permeabilizadas del cultivo primario, utilizando alcohol como agente permeabilizante, no se detectó viabilidad de *S. thermophilus* en ningún tiempo de muestreo debido al efecto del tratamiento aplicado. Sin embargo, para el caso de los extractos inoculados con células atenuadas con ondas de ultrasonido, se detectó una supervivencia hasta los 3 días de incubación, donde se obtuvieron recuentos de aproximadamente 10<sup>3</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, pero a los 7 y 14 días ya no se detectó viabilidad de dicha cepa.

### 3.2. Determinación de pH

El pH en el extracto sin inocular (control) pero incubado en las mismas condiciones que los inoculados, no mostró cambios significativos durante el período de incubación. Por el contrario, el valor de pH en los extractos inoculados con las cepas de lactobacilos o lactobacilos + *S. thermophilus* 2, disminuyó significativamente desde el valor inicial de 5,20 hasta valores entre 4,20 y 4,30 a los 3 días de incubación. Luego, el pH siguió disminuyendo lentamente, alcanzando valores finales a los 14 días de incubación entre 3,90 y 4,00, siendo levemente menores los valores en los extractos que fueron inoculados con la cepa *Lb. casei* 72 en relación a los extractos con *Lb. paracasei* 90.

## Capítulo 4

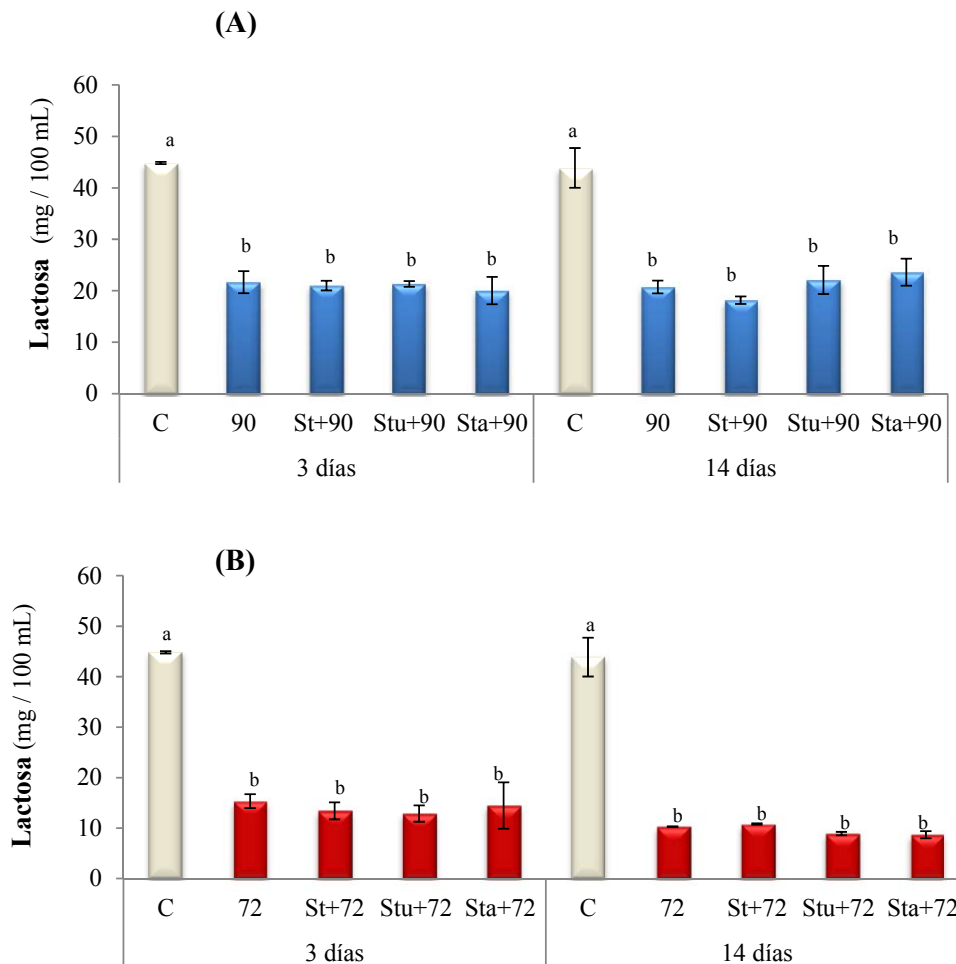
**Tabla 4.3.** Valores de pH de los extractos durante la incubación.

		Incubación (días)							
		0		3		7		14	
Control		5,20	0,01	5,20 <sup>a</sup>	0,01	5,25 <sup>a</sup>	0,01	5,15 <sup>a</sup>	0,01
Experimental 1	90	5,20	0,01	4,20 <sup>b</sup>	0,01	4,05 <sup>b</sup>	0,01	4,00 <sup>b</sup>	0,01
	St+90	5,20	0,01	4,20 <sup>b</sup>	0,01	4,05 <sup>b</sup>	0,07	4,00 <sup>b</sup>	0,01
	Stu+90	5,20	0,01	4,20 <sup>b</sup>	0,01	4,08 <sup>b</sup>	0,04	4,00 <sup>b</sup>	0,01
	Sta+90	5,20	0,01	4,20 <sup>b</sup>	0,01	4,08 <sup>b</sup>	0,04	4,00 <sup>b</sup>	0,01
Experimental 2	72	5,20	0,01	4,28 <sup>b</sup>	0,04	4,00 <sup>b</sup>	0,01	3,93 <sup>b</sup>	0,04
	St+72	5,20	0,01	4,28 <sup>b</sup>	0,04	4,00 <sup>b</sup>	0,01	3,90 <sup>b</sup>	0,01
	Stu+72	5,20	0,01	4,28 <sup>b</sup>	0,04	4,03 <sup>b</sup>	0,04	3,93 <sup>b</sup>	0,04
	Sta+72	5,20	0,01	4,30 <sup>b</sup>	0,07	4,00 <sup>b</sup>	0,01	3,93 <sup>b</sup>	0,04

Los valores representan el promedio de las dos réplicas de incubación de los extractos realizados con cultivos independientes de las cepas en estudio. La desviación estándar se indica en gris.

### 3.3. Lactosa y galactosa

La concentración de lactosa (**Figura 4.1**) en los extractos control (~ 45 mg / 100 mL) no presentó variaciones significativas durante la incubación. Por el contrario, en todos los extractos inoculados, la concentración de lactosa fue significativamente menor que en los extractos control ( $P \leq 0,05$ ). A los 3 días de incubación, la concentración de lactosa disminuyó alrededor de un 52 % en todos los extractos inoculados de ambas experiencias. En la experiencia 1, el nivel de lactosa se mantuvo sin cambios entre 3 y 14 días de incubación, mientras que, por el contrario, en los extractos de la experiencia 2, inoculados con *Lb. casei* 72, la concentración de lactosa continuó disminuyendo a los 14 días, llegando a valores finales de aproximadamente 10 mg / 100 mL. La presencia de *S. thermophilus* en los extractos experimentales no produjo modificaciones en la concentración de lactosa en ninguna de las dos experiencias. Por último, comparando la influencia de las cepas de lactobacilos, se observó una mayor hidrólisis de la lactosa por parte de la cepa *Lb. casei* 72 en comparación con *Lb. paracasei* 90, debido a que los extractos inoculados con esta última cepa a 14 días de incubación presentaron niveles significativamente ( $P \leq 0,05$ ) mayores que los inoculados con la cepa 72.



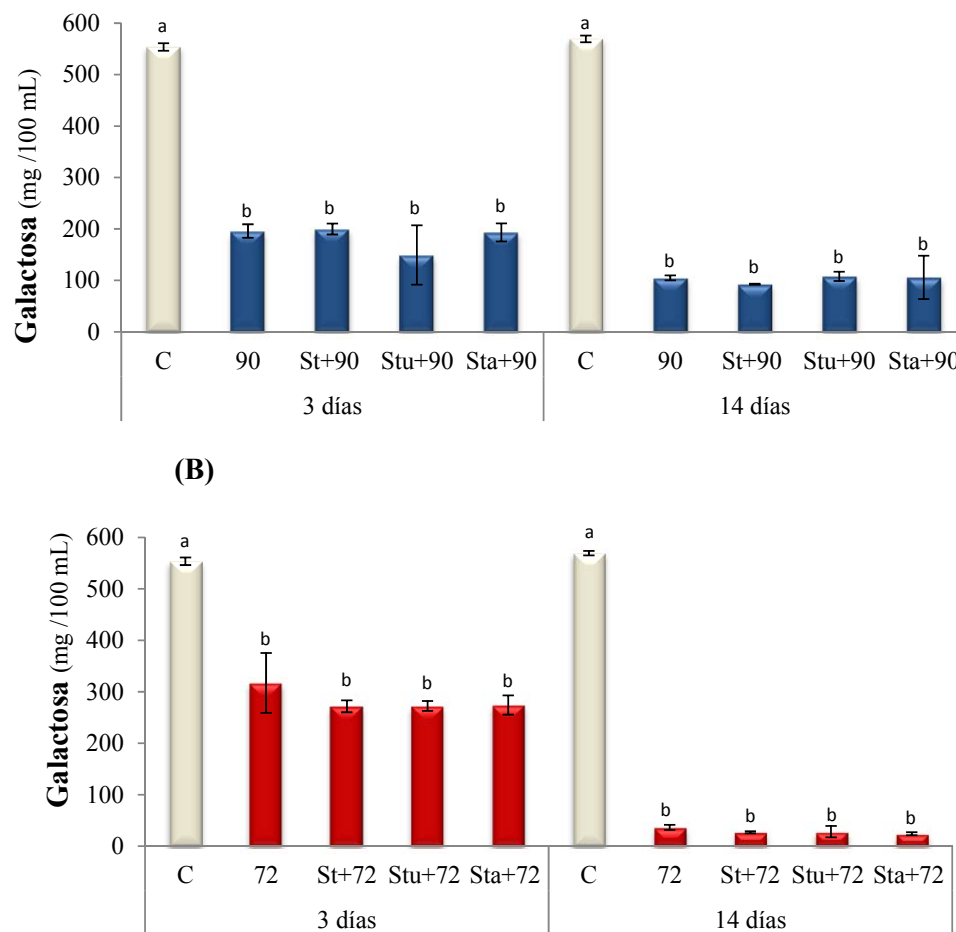
**Figura 4.1.** Concentración de lactosa en los extractos inoculados con *Lb. paracasei* 90 (A) y *Lb. casei* 72 (B) a 3 y 14 días de incubación. Diferentes letras en la parte superior de cada barra para cada tiempo de incubación indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

La concentración de galactosa (Figura 4.2), al igual que lo observado para la lactosa, permaneció sin cambios en los extractos control pero disminuyó significativamente durante el período de incubación en todos los extractos inoculados. En la experiencia 1, es decir para los extractos inoculados con *Lb. paracasei* 90, se produjo una disminución de la galactosa de aproximadamente un 57 % a los 3 días de incubación, llegando a un 69 % de reducción a los 14 días de incubación. Por otro lado, la reducción observada en la experiencia 2, es decir para los extractos inoculados con la cepa *Lb. casei* 72, fue progresiva en el tiempo, notándose una reducción de un 42 % a los 3 días, alcanzando una disminución total de aproximadamente un 80 % a los 14 días.

No se observaron diferencias en los niveles de galactosa entre los extractos con una misma cepa en ninguna de las dos experiencias. Al igual que el comportamiento observado para la lactosa, al comparar los extractos inoculados con las cepas individuales de lactobacilos, se

## Capítulo 4

observaron valores finales de galactosa significativamente ( $P \leq 0,05$ ) menores en los extractos inoculados con *Lb. casei* 72 en comparación con los extractos inoculados con *Lb. paracasei* 90.



**Figura 4.2.** Concentración de galactosa en los extractos inoculados con *Lb. paracasei* 90 (A) y *Lb. casei* 72 (B) a 3 y 14 días de incubación. Diferentes letras en la parte superior de cada barra para cada tiempo de incubación indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

Es importante destacar que los niveles iniciales de lactosa en los extractos de queso (~45 mg / 100 mL) fueron aproximadamente 100 veces menores en comparación a los niveles de galactosa (~550 mg / 100 mL).

### 3.4. Ácidos orgánicos

Durante el período de incubación fueron determinados nueve ácidos orgánicos en los extractos control e inoculados con las cepas *Lb. paracasei* 90 (**Tabla 4.4**) y *Lb. casei* 72 (**Tabla 4.5**). Entre ellos, se encuentran el  $\alpha$ -cetoglutarato y el ácido pirúvico, los cuales tienen una importancia especial para el objetivo del presente estudio, ya que ambos han demostrado ser utilizados como compuestos aceptores de grupos amino en la reacción catalizada por las transaminasas. En la **Figura 4.3** se muestran las diferencias de concentración de estos dos ácidos en los extractos inoculados de ambas experiencias en relación a los extractos control a 3 y 14 días de incubación.

En la experiencia 1, el  $\alpha$ -cetoglutarato en los extractos inoculados disminuyó a los 3 días de incubación en comparación con el control. Los resultados presentaron diferencias significativas a un nivel  $P \leq 0,10$ . A los 14 días de incubación, el  $\alpha$ -cetoglutarato en los extractos inoculados permaneció en menores valores en relación al control, aunque las diferencias no fueron significativas entre los mismos. A diferencia del comportamiento observado en la experiencia 1, la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato en todos los extractos inoculados de la experiencia 2 fue mayor que en los extractos control a los 3 días de incubación y, esta tendencia se incrementó a los 14 días. Estas diferencias fueron significativas ( $P \leq 0,05$ ) para todos los extractos inoculados, excepto para el 72+St a los 3 días que presentó similares niveles que el control, mientras que a 14 días las diferencias fueron significativas a un nivel de  $P \leq 0,10$  para todos los extractos, excepto para el Sta+72. Finalmente, al comparar la influencia individual de las dos cepas de lactobacilos, los niveles de  $\alpha$ -cetoglutarato fueron significativamente mayores en los extractos inoculados con la cepa 72, tanto a 3 como a 14 días de incubación.

Los niveles de ácido pirúvico en el extracto control no se mantuvieron constantes durante la incubación, ya que la concentración de este ácido a los 14 días fue un poco más del doble que la observada a los 3 días de incubación. Los valores de concentración de ácido pirúvico a los 3 y 14 días de incubación fueron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) superiores en la mayoría de los extractos inoculados de ambas experiencias en relación al control, observándose un incremento mayor en los extractos inoculados con *Lb. paracasei* 90 respecto a los inoculados con la *Lb. casei* 72 (**Figura 4.3**). En la experiencia 1, todos los extractos inoculados presentaron niveles significativamente ( $P \leq 0,05$ ) mayores que el control, siendo menor esta diferencia a 3 días de incubación para St+90, mientras que a 14 días, las menores diferencias se observaron para 90 y Stu+90. Para los extractos de la experiencia 2, los niveles en todos los extractos fueron significativamente mayores que el control a 3 días, mientras que a 14 días, se

## Capítulo 4

---

observaron niveles significativamente mayores sólo para los extractos St+72 y Stu+72. Al analizar la influencia individual de las cepas de lactobacilos, el nivel de ácido pirúvico resultó significativamente mayor en los extractos con la cepa 90 en comparación con la 72.

La concentración de ácido cítrico se incrementó levemente en todos los extractos testigo y experimentales en comparación con el extracto control, siendo este incremento significativo únicamente en los extractos a los 3 días de incubación.

La concentración de ácido láctico en los extractos control no mostró cambios significativos entre 3 y 14 días. Por otro lado, en todos los extractos inoculados la concentración de ácido láctico a los 3 y 14 días de incubación mostró valores significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ) con respecto al extracto control. Ninguna diferencia fue detectada en el ácido láctico debido a la presencia de *S. thermophilus* en los extractos de ambas experiencias. Por otro lado, se observaron algunas diferencias entre las cepas 90 y 72 cuando se analizaron los extractos con la inoculación individual de las mismas. En este sentido, los niveles de ácido láctico a 3 días de incubación fueron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) mayores para los extractos con la cepa *Lb. paracasei* 90, mientras que a 14 días la tendencia se invirtió, presentando los extractos con la cepa *Lb. casei* 72 mayores valores, aunque las diferencias no fueron significativas.

El ácido fórmico no mostró diferencias significativas entre los extractos control e inoculados a ambos tiempos de incubación para ninguna de las dos experiencias. Sin embargo, al analizar los extractos inoculados con las cepas individuales, el nivel de ácido fórmico fue significativamente mayor en los extractos inoculados con la cepa 72 en comparación a la 90.

En forma similar a lo observado para la mayoría de los ácidos analizados, la concentración de ácido acético no se modificó en los extractos sin inocular durante el período de incubación. Asimismo, en todos los extractos inoculados, la concentración de ácido acético fue significativamente mayor respecto al control, tanto a 3 como a 14 días de incubación. Dos excepciones se detectaron en esta tendencia: los extractos Stu+90 y Sta+72 no presentaron diferencias significativas en la concentración de ácido acético con respecto al control a los 14 días.

Para el ácido propiónico, sólo se observó un incremento significativo en relación al extracto control en uno de los extractos inoculados (Sta+72) a 3 días de incubación, mientras que a los 14 días se verificó un incremento solamente en el extracto inoculado con la cepa 72.

La concentración del ácido orótico en general no presentó diferencias significativas entre los extractos inoculados y el extracto control en cada experiencia a 3 días de incubación,

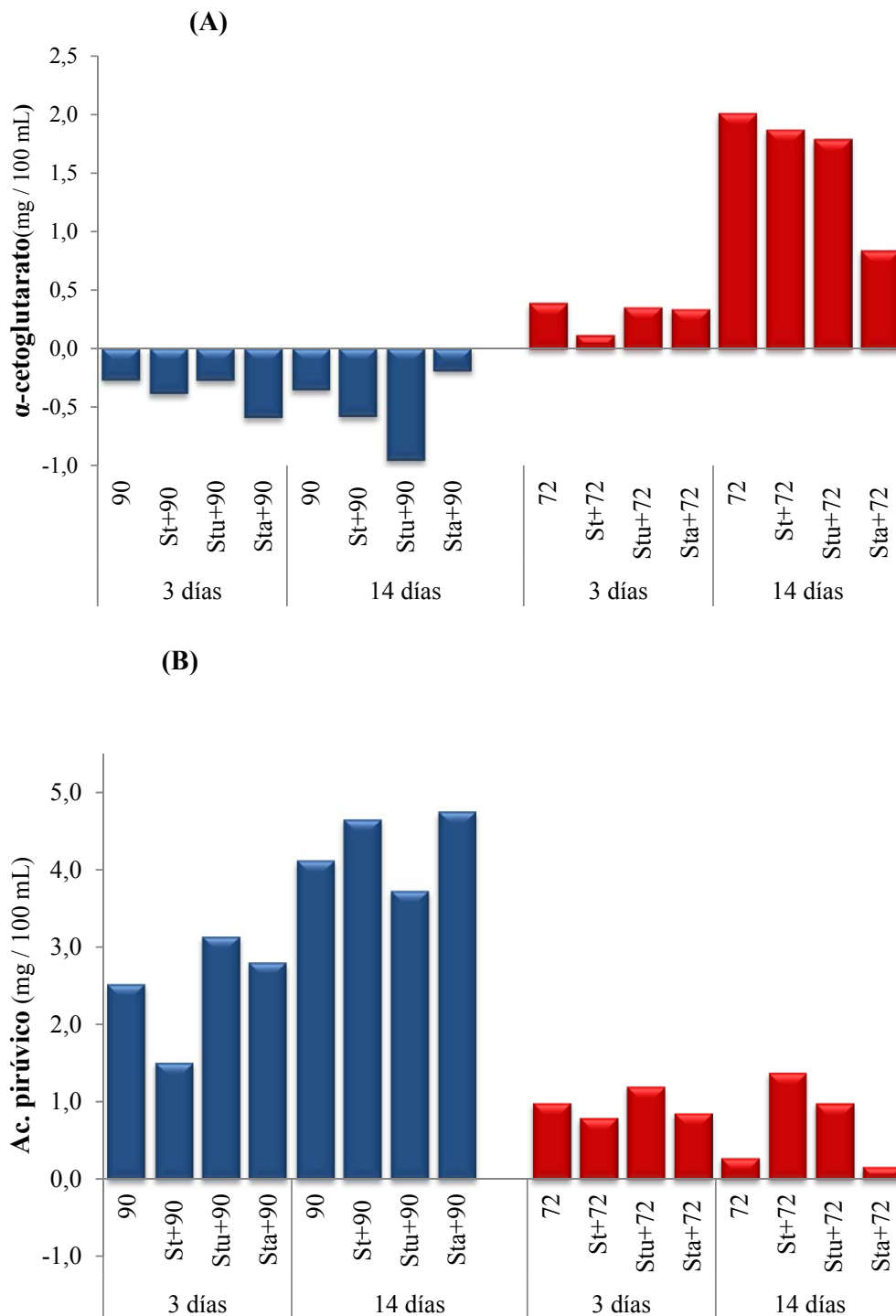
## Capítulo 4

---

excepto para los extractos experimentales St+90 y Sta+72, que presentaron niveles significativamente menores que el extracto control. A los 14 días de incubación, todos los extractos inoculados (testigo y experimentales) presentaron niveles significativamente ( $P \leq 0,05$ ) menores de ácido orótico que el extracto control. El ácido orótico se incrementó en todos los extractos entre 3 y 14 días de incubación, aunque este incremento fue más notorio en los extractos control.

El ácido úrico disminuyó en todos los extractos inoculados en comparación con los extractos control, tanto a 3 como a 14 días de incubación, resultando estas diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en todos los casos. Al analizar la influencia individual de ambas cepas de lactobacilos, se observó que los niveles en los extractos con la cepa *Lb. paracasei* 90 fueron significativamente menores respecto de los extractos inoculados con la cepa *Lb. casei* 72.





**Figura 4.3.** Variación de la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato (A) y ácido pirúvico (B) en los extractos inoculados en relación al control sin inocular a 3 y 14 días de incubación. Referencias: extractos inoculados con *Lb. paracasei* 90 (■) y extractos inoculados con *Lb. casei* 72 (■).

**Tabla 4.4.** Ácidos orgánicos (mg / 100 mL) en los extractos de quesos correspondientes a la experiencia 1.

	3 días					14 días				
	C	90	St + 90	Stu + 90	Sta + 90	C	90	St + 90	Stu + 90	Sta + 90
Ác. cítrico	130,29 <sup>a</sup> <sub>1,58</sub>	150,00 <sup>b,c</sup> <sub>1,18</sub>	148,78 <sup>b</sup> <sub>1,20</sub>	153,64 <sup>c</sup> <sub>2,31</sub>	151,64 <sup>b,c</sup> <sub>1,76</sub>	156,77 <sub>1,91</sub>	164,10 <sub>8,53</sub>	157,32 <sub>1,21</sub>	160,06 <sub>5,44</sub>	164,21 <sub>9,88</sub>
$\alpha$ -cetoglutarato	4,33 <sup>b</sup> <sub>0,04</sub>	4,06 <sup>a,b</sup> <sub>0,20</sub>	3,94 <sup>a</sup> <sub>0,03</sub>	4,05 <sup>a,b</sup> <sub>0,07</sub>	3,74 <sup>a</sup> <sub>0,22</sub>	4,58 <sub>0,76</sub>	4,22 <sub>0,32</sub>	3,99 <sub>0,01</sub>	3,62 <sub>0,47</sub>	4,38 <sub>0,02</sub>
Ác. pirúvico	1,52 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	4,05 <sup>c</sup> <sub>0,62</sub>	3,04 <sup>b</sup> <sub>0,25</sub>	4,66 <sup>c</sup> <sub>0,37</sub>	4,33 <sup>c</sup> <sub>0,23</sub>	3,65 <sup>a</sup> <sub>0,37</sub>	7,77 <sup>b,c</sup> <sub>0,16</sub>	8,30 <sup>c</sup> <sub>0,31</sub>	7,38 <sup>b</sup> <sub>0,21</sub>	8,41 <sup>c</sup> <sub>0,37</sub>
Ác. orótico	0,92 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,73 <sup>a,b</sup> <sub>0,18</sub>	0,58 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	0,95 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,87 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	1,58 <sup>c</sup> <sub>0,01</sub>	1,10 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,87 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	0,87 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	1,05 <sup>b</sup> <sub>0,05</sub>
Ác. láctico	726,47 <sup>a</sup> <sub>4,24</sub>	1136,94 <sup>b</sup> <sub>9,95</sub>	1115,25 <sup>b</sup> <sub>31,12</sub>	1138,77 <sup>b</sup> <sub>1,96</sub>	1129,78 <sup>b</sup> <sub>4,14</sub>	765,47 <sup>a</sup> <sub>0,97</sub>	1274,05 <sup>b</sup> <sub>45,9</sub>	1247,67 <sup>b</sup> <sub>19,56</sub>	1222,74 <sup>b</sup> <sub>1,54</sub>	1248,23 <sup>b</sup> <sub>7,28</sub>
Ác. fórmico	16,66 <sub>0,81</sub>	18,66 <sub>2,31</sub>	17,56 <sub>0,26</sub>	16,56 <sub>0,47</sub>	14,20 <sub>3,15</sub>	18,62 <sub>0,23</sub>	18,23 <sub>1,40</sub>	16,11 <sub>2,48</sub>	14,58 <sub>0,69</sub>	18,88 <sub>0,19</sub>
Ác. acético	51,33 <sup>a</sup> <sub>1,15</sub>	71,96 <sup>b</sup> <sub>2,22</sub>	71,42 <sup>b</sup> <sub>1,02</sub>	71,08 <sup>b</sup> <sub>2,18</sub>	66,26 <sup>b</sup> <sub>6,14</sub>	59,24 <sup>a</sup> <sub>1,08</sub>	79,79 <sup>c</sup> <sub>2,59</sub>	73,26 <sup>b,c</sup> <sub>7,81</sub>	66,61 <sup>a,b</sup> <sub>2,02</sub>	79,61 <sup>c</sup> <sub>0,44</sub>
Ác. úrico	2,47 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	0,40 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,37 <sup>b</sup> <sub>0,02</sub>	0,41 <sup>b</sup> <sub>0,02</sub>	0,41 <sup>b</sup> <sub>0,04</sub>	2,57 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	0,38 <sup>b</sup> <sub>0,03</sub>	0,38 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,32 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,41 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>
Ác. propiónico	8,95 <sub>0,56</sub>	9,11 <sub>0,48</sub>	9,74 <sub>1,08</sub>	10,48 <sub>1,96</sub>	8,79 <sub>0,65</sub>	8,81 <sub>0,52</sub>	9,70 <sub>4,06</sub>	9,07 <sub>1,37</sub>	6,87 <sub>0,25</sub>	11,11 <sub>2,26</sub>

Los valores representan el promedio (y desviación estándar en gris) de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio. Los valores que presentan diferente superíndice en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación presentan diferencias significativas a un nivel  $P \leq 0,05$ , excepto para el ácido orótico y el  $\alpha$ -cetoglutarato a los 3 días de incubación, para los cuales las diferencias significativas se presentaron a un nivel  $P \leq 0,10$ .

**Tabla 4.5.** Ácidos orgánicos (mg / 100 mL) en los extractos de quesos correspondientes a la experiencia 2.

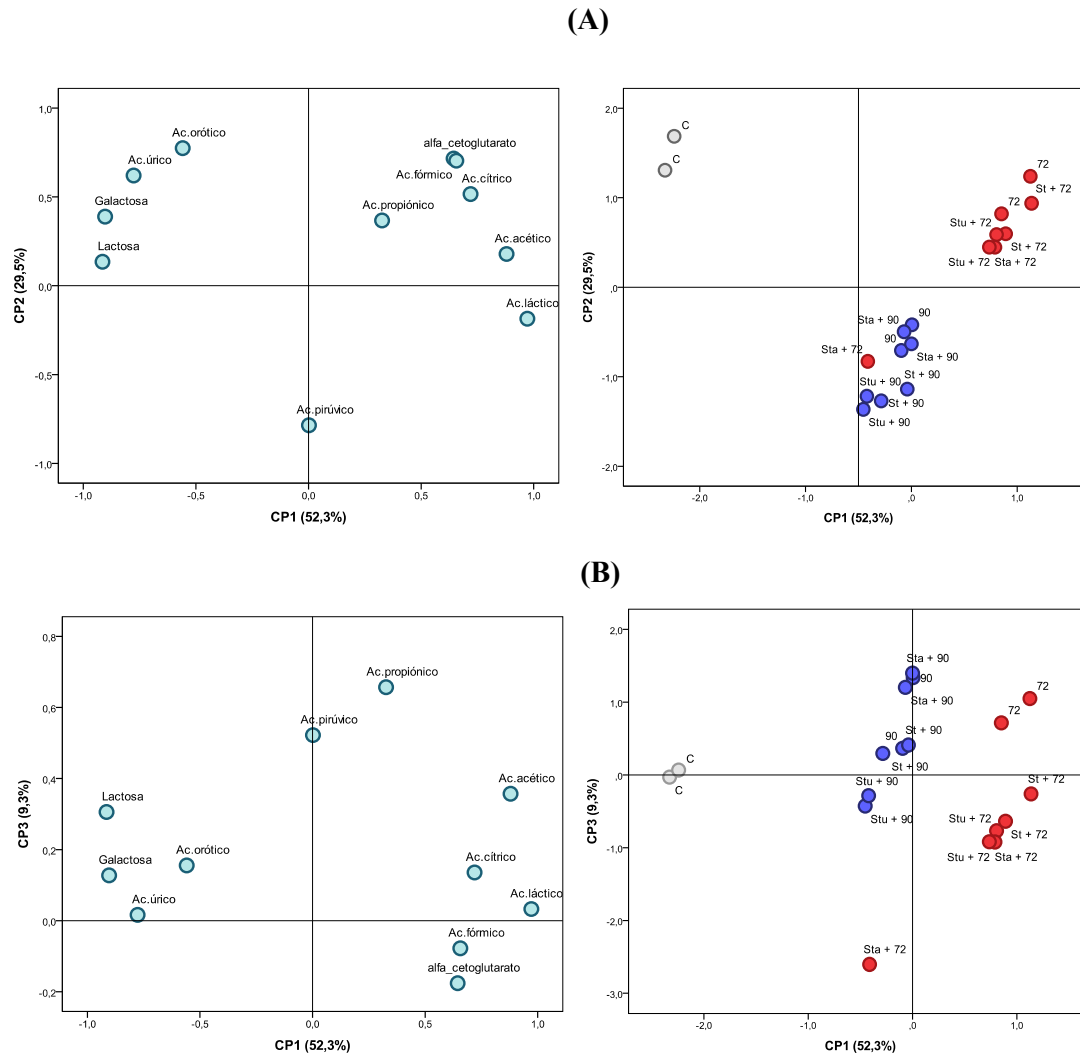
	3 días					14 días				
	C	72	St + 72	Stu + 72	Sta + 72	C	72	St + 72	Stu + 72	Sta + 72
Ác. cítrico	130,29 <sup>a</sup> <sub>1,58</sub>	159,35 <sup>b</sup> <sub>2,67</sub>	158,42 <sup>b</sup> <sub>1,71</sub>	160,29 <sup>b</sup> <sub>0,46</sub>	158,08 <sup>b</sup> <sub>0,61</sub>	156,77 <sub>1,91</sub>	180,56 <sub>6,69</sub>	185,35 <sub>4,47</sub>	175,37 <sub>0,70</sub>	159,28 <sub>21,88</sub>
$\alpha$ -cetoglutarato	4,33 <sup>a</sup> <sub>0,04</sub>	4,73 <sup>b</sup> <sub>0,08</sub>	4,46 <sup>a</sup> <sub>0,03</sub>	4,70 <sup>b</sup> <sub>0,04</sub>	4,68 <sup>b</sup> <sub>0,08</sub>	4,58 <sup>a</sup> <sub>0,76</sub>	6,60 <sup>b</sup> <sub>0,64</sub>	6,46 <sup>b</sup> <sub>0,04</sub>	6,37 <sup>b</sup> <sub>0,16</sub>	5,43 <sup>a,b</sup> <sub>0,86</sub>
Ác. pirúvico	1,52 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	2,51 <sup>b,c</sup> <sub>0,23</sub>	2,32 <sup>b</sup> <sub>0,18</sub>	2,72 <sup>c</sup> <sub>0,06</sub>	2,38 <sup>b,c</sup> <sub>0,01</sub>	3,65 <sup>a</sup> <sub>0,37</sub>	3,93 <sup>a,b</sup> <sub>0,16</sub>	5,02 <sup>c</sup> <sub>0,16</sub>	4,63 <sup>b,c</sup> <sub>0,11</sub>	3,82 <sup>a</sup> <sub>0,60</sub>
Ác. orótico	0,92 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,87 <sup>a,b</sup> <sub>0,23</sub>	0,70 <sup>a,b</sup> <sub>0,01</sub>	0,95 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,65 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	1,58 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	1,08 <sup>a</sup> <sub>0,02</sub>	1,11 <sup>a</sup> <sub>0,04</sub>	1,04 <sup>a</sup> <sub>0,04</sub>	0,97 <sup>a</sup> <sub>0,12</sub>
Ác. láctico	726,47 <sup>a</sup> <sub>4,24</sub>	1070,70 <sup>b</sup> <sub>12,79</sub>	1083,61 <sup>b</sup> <sub>3,38</sub>	1089,26 <sup>b</sup> <sub>8,42</sub>	1070,21 <sup>b</sup> <sub>5,31</sub>	765,47 <sup>a</sup> <sub>0,97</sub>	1369,51 <sup>b</sup> <sub>13,77</sub>	1435,83 <sup>b</sup> <sub>27,69</sub>	1350,68 <sup>b</sup> <sub>5,23</sub>	1247,08 <sup>b</sup> <sub>172,77</sub>
Ác. fórmico	16,66 <sub>0,81</sub>	19,21 <sub>0,18</sub>	16,96 <sub>0,58</sub>	17,84 <sub>0,92</sub>	18,47 <sub>1,21</sub>	18,62 <sub>0,23</sub>	24,48 <sub>1,03</sub>	27,40 <sub>2,62</sub>	26,07 <sub>1,14</sub>	20,54 <sub>6,14</sub>
Ác. acético	51,33 <sup>a</sup> <sub>1,15</sub>	64,95 <sup>b</sup> <sub>3,02</sub>	63,75 <sup>b</sup> <sub>0,12</sub>	65,49 <sup>b</sup> <sub>0,93</sub>	65,74 <sup>b</sup> <sub>0,94</sub>	59,24 <sup>a</sup> <sub>1,08</sub>	85,07 <sup>b</sup> <sub>1,87</sub>	85,84 <sup>b</sup> <sub>3,54</sub>	81,20 <sup>b</sup> <sub>1,99</sub>	70,55 <sup>a,b</sup> <sub>14,22</sub>
Ác. úrico	2,47 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	1,31 <sup>a</sup> <sub>0,13</sub>	1,10 <sup>a</sup> <sub>0,11</sub>	1,31 <sup>a</sup> <sub>0,06</sub>	1,17 <sup>a</sup> <sub>0,16</sub>	2,57 <sup>b</sup> <sub>0,01</sub>	0,55 <sup>a</sup> <sub>0,03</sub>	0,50 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	0,46 <sup>a</sup> <sub>0,01</sub>	0,43 <sup>a</sup> <sub>0,06</sub>
Ác. propiónico	8,95 <sup>a</sup> <sub>0,56</sub>	9,59 <sup>a</sup> <sub>1,07</sub>	8,83 <sup>a</sup> <sub>0,79</sub>	9,99 <sup>a</sup> <sub>0,58</sub>	12,17 <sup>b</sup> <sub>0,04</sub>	8,81 <sup>a</sup> <sub>0,52</sub>	16,57 <sup>b</sup> <sub>0,72</sub>	8,38 <sup>a</sup> <sub>0,26</sub>	8,71 <sup>a</sup> <sub>0,16</sub>	7,24 <sup>a</sup> <sub>1,98</sub>

Los valores representan el promedio (y desviación estándar en gris) de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio. Los valores que presentan diferente superíndice en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación presentan diferencias significativas a un nivel  $P \leq 0,05$ , excepto para el ácido orótico a 3 días de incubación y el  $\alpha$ -cetoglutarato a los 14 días de incubación, para los cuales las diferencias significativas se presentaron a un nivel  $P \leq 0,10$ .

## Capítulo 4

---

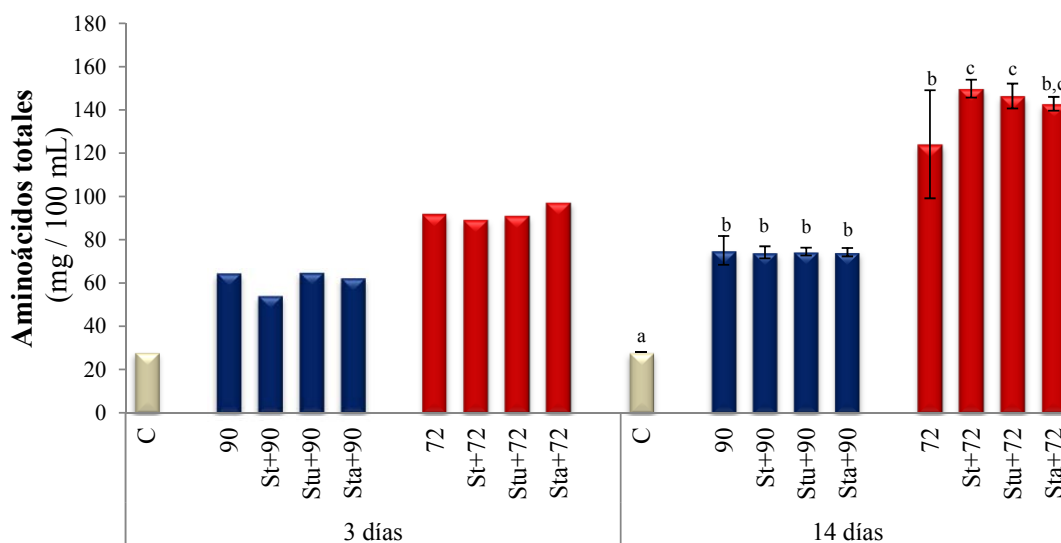
La concentración de lactosa, galactosa y ácidos orgánicos de los extractos de las dos experiencias a los 14 días de incubación fueron analizadas por componentes principales. Se extrajeron tres componentes principales, los cuales explicaron el 91,2 % de la variancia del sistema. En la **Figura 4.4**, se presentan los gráficos de scores y loading para los tres primeros CPs. En el gráfico de scores de CP1 vs. CP2 (**Figura 4.4 A**), se observa que la principal variación en las muestras se presenta entre los extractos control y los inoculados (testigo y experimentales) ya que se separan a lo largo del eje del CP1, que explica el 52,6 % de la variancia total. Las variables galactosa, lactosa, ácido úrico y ácido orótico caracterizan a los extractos control, mientras que el resto de las variables son características de los extractos inoculados. Sobre el eje del CP2, que explica el 29,4 % de la variancia total, se observa principalmente la separación de los extractos de la experiencia 1, inoculados con la cepa *Lb. paracasei* 90, de los extractos de la experiencia 2, inoculados con la cepa *Lb. casei* 72. De estos resultados, se entiende que la segunda fuente importante de variación es la cepa de lactobacilo estudiada. El ácido pirúvico caracteriza los extractos con *Lb. paracasei* 90, mientras que el  $\alpha$ -cetoglutarato, orótico, úrico y fórmico son característicos de la cepa *Lb. casei* 72. Una mínima diferenciación se observa entre los extracto testigo y experimentales de cada experiencia a lo largo del eje del CP3, que explica el 9,3 % de la variancia, sobre todo en la experiencia 2.



**Figura 4.4.** Gráficos de loading y scores para CP1 vs. CP2 **(A)**, CP1 vs. CP3 **(B)** del análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos y azúcares presentes en los extractos de queso a los 14 días de incubación. Referencias: Control (●), *Lb. paracasei* 90 (●), *Lb. casei* 72 (●).

### 3.5. Aminoácidos libres (AA)

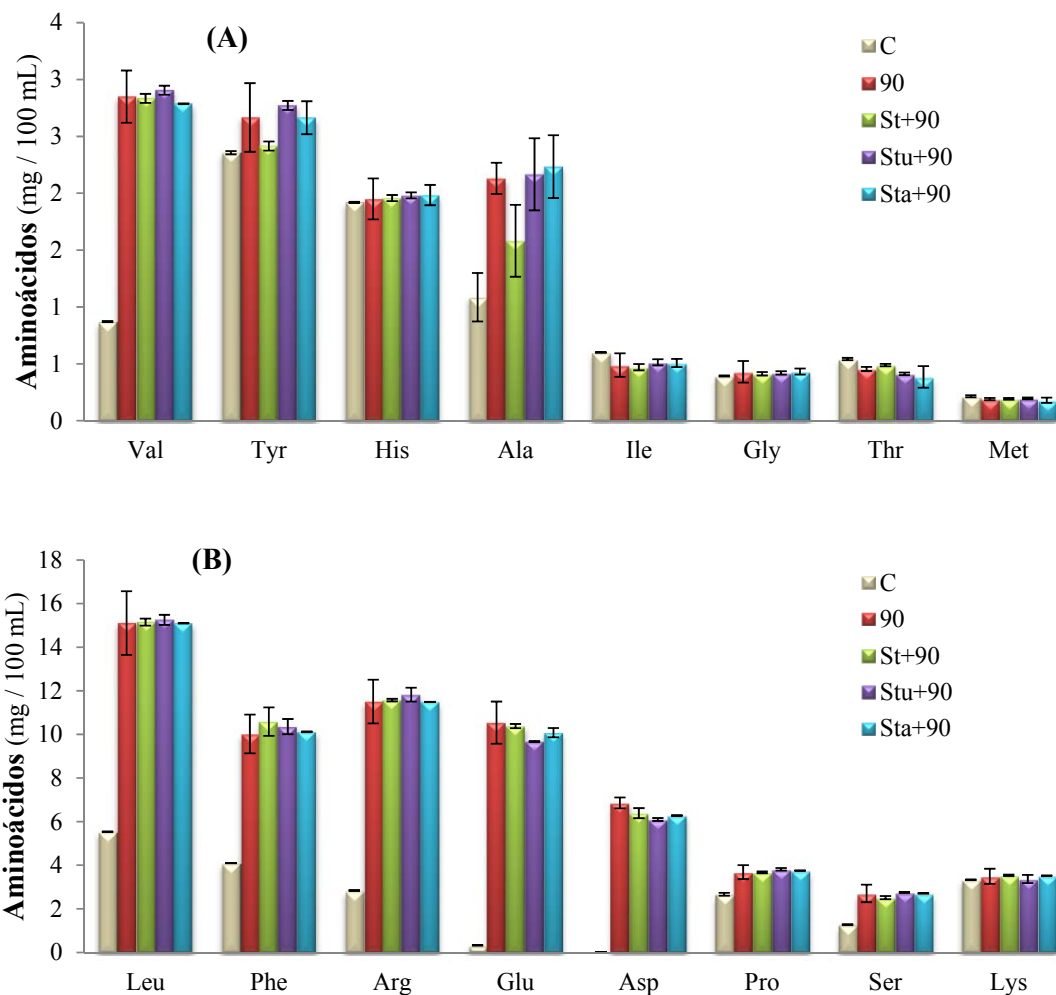
Los aminoácidos libres fueron cuantificados en las dos réplicas de la experiencia en los extractos a 14 días de incubación, mientras que fueron analizadas solamente en una de las dos réplicas a 3 días. Este criterio se adoptó, debido al elevado costo del ensayo, teniendo en cuenta la baja variabilidad observada en la concentración de la mayoría de los metabolitos para los extractos de 3 días. De esta manera, el análisis de ANOVA se aplicó a los resultados correspondientes a los extractos a los 14 días de incubación. En la **Figura 4.5** se presentan los niveles de aminoácidos libres totales en los extractos control y experimentales a 3 y 14 días de incubación.



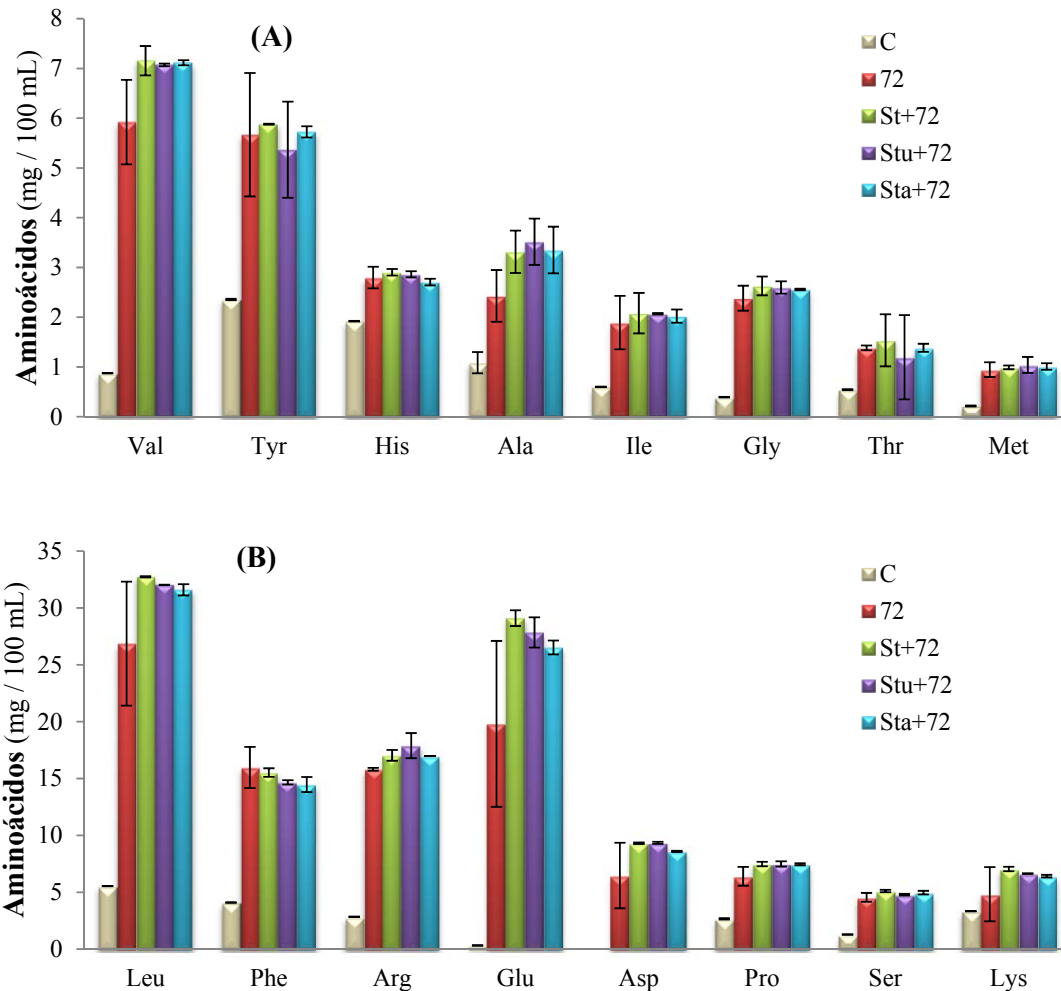
**Figura 4.5.** Niveles de AA totales en los extractos de ambas experiencias a 3 y 14 días de incubación: control (■), extractos de la experiencia 1, inoculados con *Lb. paracasei* 90 (■) y extractos de la experiencia 2, inoculados con *Lb. casei* 72 (■). Diferentes letras en la parte superior de cada barra para cada experiencia indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

En todos los extractos experimentales se observó un incremento significativo a los 14 días ( $P \leq 0,05$ ) en el nivel de AA totales en comparación con los extractos control, que fue mucho mayor para la cepa *Lb. casei* 72. El nivel de AA totales en los extractos control se mantuvo constante. Asimismo, en la experiencia 2 se encontraron diferencias significativas en los niveles de AA totales entre los diferentes extractos experimentales:  $72 = \text{Sta}+72 < \text{St}+72 = \text{Stu}+72 = \text{Sta}+72$ , mientras que en la experiencia 1, los niveles fueron similares entre todos los extractos inoculados. Los niveles de AA totales se incrementaron desde un nivel inicial de aprox. 30 mg / 100 mL hasta un nivel alrededor de 75 y 150 mg / 100 mL a los 14 días de incubación, en los extractos inoculados con la cepa *Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72, respectivamente. De esta manera, la concentración de AA totales fue casi el doble en los extractos con *Lb. casei* 72 en comparación a los extractos con la cepa *Lb. paracasei* 90. Para la cepa *Lb. paracasei* 90, el mayor incremento de los niveles de AA se observó a los 3 días de incubación, mientras que para la cepa *Lb. casei* 72 el aumento fue de aproximadamente igual magnitud en ambos tiempos de muestreo.

En las **Figuras 4.6** y **4.7** se presentan los valores de AA individuales en todos los extractos a 14 días de incubación.



**Figura 4.6.** Concentración de AA individuales en los extractos de queso de la primera experiencia a 14 días de incubación con niveles  $< 3$  mg / 100 mL (A) y  $> 3$  mg / 100 mL (B). Los valores representan el promedio y desviación estándar de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio.



**Figura 4.7.** Concentración de AA individuales en los extractos de queso de la primera experiencia a 14 días de incubación con niveles  $< 7$  mg / 100 mL (A) y  $> 7$  mg / 100 mL (B). Los valores representan el promedio y desviación estándar de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio.

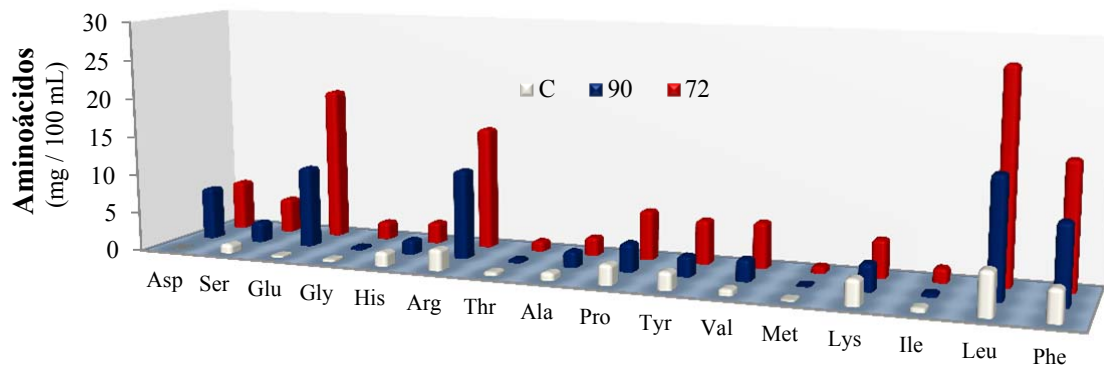
A los 14 días de incubación, en la experiencia 1, los niveles de ocho AA individuales: Asp, Ser, Glu, Arg, Pro, Val, Leu y Phe, se incrementaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en los extractos inoculados en relación al control. El Asp, además, presentó diferencias significativas entre los diferentes extractos experimentales, observándose un mayor nivel para el extracto inoculado únicamente con *Lb. paracasei* 90 en comparación a los inoculados también con *S. thermophilus*. Por otro lado, la Ala también se incrementó en los extractos inoculados, pero dicho aumento no fue significativo, mientras que otros aminoácidos se mantuvieron en similares niveles o levemente inferiores en relación a los extractos control: Gly, His, Thr, Tyr, Met, Lys e Ile.

En la experiencia 2, los niveles de la mayoría de AA se incrementaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en todos los extractos inoculados con la cepa *Lb. casei* 72 en relación al control. La concentración de Asp, Gly, Hys, Ala, Tyr, Met, Ile, Leu y Phe fue significativamente mayor en todos los extractos inoculados, y no se observaron diferencias entre los mismos. Por el contrario, los niveles de Ser, Glu, Arg, Pro y Val también fueron significativamente mayores en los extractos inoculados, pero hubo también algunas diferencias entre ellos, que se detallan a continuación: Val y Pro:  $72 < St+72 = Stu+72 = Sta+72$ ; Ser y Glu:  $72 = Stu+72 = Sta+72 < St+72 = Stu+72 = Sta+72$ ; y Arg:  $72 = St+72 = Sta+72 < St+72 = Stu+72 = Sta+72$ . Por último, los niveles de Thr y Lys también fueron mayores en los extractos inoculados pero las diferencias no fueron significativas entre extractos testigo y experimentales.

Por último, también se realizó un análisis de ANOVA de los niveles de los AA individuales y totales para los extractos inoculados únicamente con las cepas individuales de *Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72 para comparar su influencia en el nivel y perfil de AA. La mayoría de aminoácidos mostraron niveles significativamente mayores en los extractos inoculados con la cepa *Lb. casei* 72 en comparación con la cepa *Lb. paracasei* 90: Ser, Gly, Arg, Thr, Pro, Val y Met ( $P \leq 0,05$ ) y Tyr, His, Ile, Leu, Phe y totales ( $P \leq 0,10$ ). Los niveles de Asp, Glu, Ala y Lys fueron similares en ambos tipos de extractos.

Como resultado de los incrementos diferenciales de distintos AA, el perfil de los mismos en los extractos experimentales inoculados con las cepas de lactobacilos fue diferente del perfil de AA de los extractos control en las muestras a los 14 días de incubación (**Figura 4.8**). Los AA mayoritarios en los extractos control fueron  $Leu > Phe > Lys > Arg$ - Pro, mientras que los que se encontraron en los menores niveles fueron Asp, Met y Glu. Por otro lado, en los extractos experimentales de la primera experiencia los AA mayoritarios fueron  $Leu > Arg > Glu > Phe$  - Asp, mientras que en la segunda experiencia los mayoritarios fueron  $Leu > Glu > Phe > Arg$ - Asp. Finalmente, los AA minoritarios para los extractos con ambas cepas de lactobacilos fueron Met, Ile, Thr y Gly.

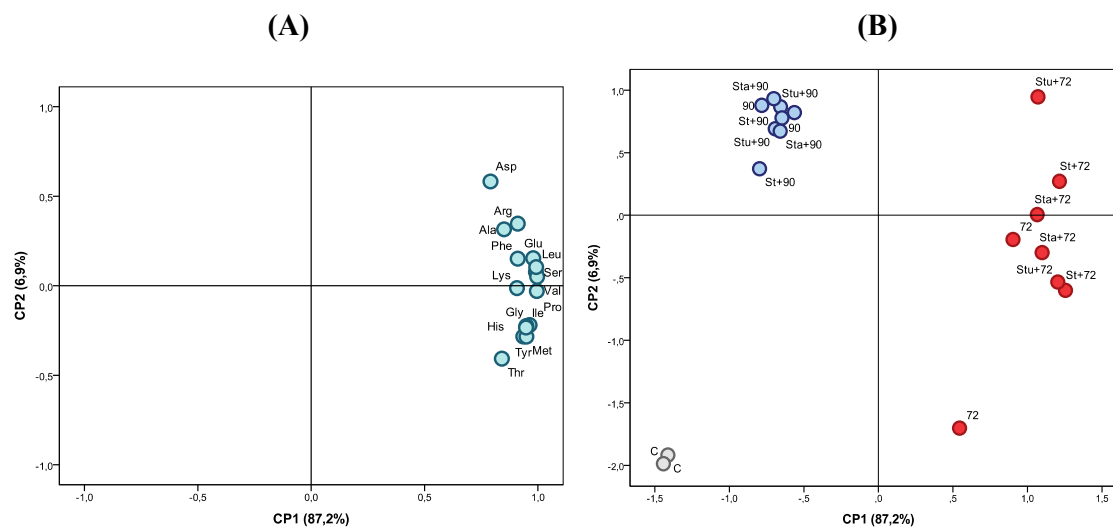




**Figura 4.8.** Perfil de AA en los extractos control (□) y testigo inoculados únicamente con las cepas individuales de *Lactobacillus paracasei* 90 (■) y *Lb. casei* 72 (■).

Un análisis multivariado de componentes principales fue aplicado a los resultados de AA para todos los extractos control y experimentales de ambas experiencias a los 14 días de incubación. Los primeros dos componentes principales explicaron el 94,1 % de la varianza total. En el gráfico de scores se observa principalmente el agrupamiento de las muestras según la cepa de lactobacilo inoculada. En efecto, a lo largo del eje del CP1, que explica el 87,2 % de la varianza del sistema, se separan los extractos inoculados del extracto control, debido al incremento de todos los AA, los cuales presentan valores de loading elevados sobre este eje. Esta separación es mucho más notoria para los extractos inoculados con la cepa *Lb. casei* 72, muestras que presentaron valores de scores elevados y positivos sobre el eje del CP1, y se correlaciona con los mayores niveles de AA observados en estos extractos. Por otro lado, también se observa una separación sobre el eje del CP2, que explica el 6,9 % de la varianza, entre los extractos control, que presentan valores altos de scores negativos, y los experimentales, que presentan valores de scores positivos (extractos de experiencia 1 y algunos de la experiencia 2) o valores bajos de scores negativos (extractos de experiencia 2). Esta separación se debe al incremento diferencial de determinados aminoácidos, tales como Asp, Ala, Arg, Glu, Phe, Val y Leu, que presentan valores de loading positivos sobre el eje del CP2. Por el contrario, los aminoácidos que presentan valores de loading negativos sobre el eje del CP1 estuvieron en general en similares niveles o levemente superiores en los extractos control en relación a los inoculados. En el gráfico de scores la única diferenciación que se observó entre los extractos inoculados para cada una de las experiencias debido a la cooperación con *S. thermophilus* en distintos estados fisiológicos, fue en la experiencia 2. En efecto, una de las réplicas de los extractos con la inoculación de la cepa *Lb. casei* 72 sola

mostraron valores de scores sobre el eje del CP1 levemente inferiores en relación a los extractos en donde también estaban presentes células de *S. thermophilus*, lo que se relaciona a un menor nivel de AA totales en dichos extractos.



**Figura 4.9.** Gráfico de loading (A) scores (B) del análisis de componentes principales de los AA presentes en los extractos de queso a los 14 días de incubación. Referencias: Control (●), extractos de la experiencia 1, inoculados con *Lb. paracasei* 90 (●), extractos de la experiencia 2, inoculados con *Lb. casei* 72 (●).

### 3.6. Compuestos volátiles.

El análisis de los compuestos volátiles por GC permitió identificar un total de 34 compuestos, que corresponden a los grupos químicos de los alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres y también el benzotiazol, compuesto de la familia de los tiazoles. La mayoría de los compuestos se identificaron por comparación de los tiempos de retención con sus respectivos estándares, y se confirmaron por GC-MS; mientras que otros como el benzotiazol y el 4-OH-benzaldehído se identificaron sólo por GC-MS. En las **Figuras 4.10** y **4.11**, se presentan a través de gráficos de barra, los compuestos volátiles más relevantes para esta tesis, ya que son los que pueden derivar de la degradación enzimática y/o química de los AA. Además, en las **Tablas 4.6** y **4.7** se presentan los valores promedios y desviación estándar de las áreas de todos los compuestos volátiles identificados en los extractos, informándose únicamente aquellos que presentaron áreas mayores a 5000 unidades arbitrarias de área.

Dentro del grupo de aldehídos fueron detectados cuatro compuestos, los cuales pueden derivar del catabolismo de aminoácidos: acetaldehído, benzaldehído, 4-OH-benzaldehído y 3-metilbutanal. El 3-metilbutanal a los 3 días de incubación fue encontrado en niveles significativamente ( $P \leq 0,10$ ) mayores en los extractos control que en los inoculados en la

## Capítulo 4

---

experiencia 1, mientras que en la experiencia 2, los valores fueron similares en todos los extractos. Por el contrario, este compuesto a los 14 días de incubación fue detectado en mayores niveles en los extractos inoculados de ambas experiencias en comparación con los extractos control. Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas, debido a la gran desviación estándar que presentaron los resultados, ya que en general la tendencia de incremento de este compuesto en los extractos inoculados fue observada principalmente en una de las réplicas realizadas. El mayor aumento de este compuesto se observó en los extractos de la experiencia 2, sobre todo en St+72 y Sta+72. El acetaldehído no presentó diferencias significativas entre los extractos control e inoculados en ninguna de las dos experiencias. Sin embargo, se observó una tendencia de disminución de las áreas de este compuesto a los 3 días para los extractos Sta+90 y Sta+72, y a los 14 días en general para todos los extractos inoculados en relación al control. El benzaldehído presentó valores significativamente ( $P \leq 0,05$ ) menores en todos los extractos inoculados a los 3 días de incubación, mientras que a 14 días, la tendencia fue la misma pero las diferencias fueron significativas únicamente en la experiencia 2. El área del 4-OH-benzaldehído fue similar entre extractos control e inoculados de ambas experiencias a los 3 días de incubación, mientras que a los 14 días de incubación se observaron mayores valores para algunos extractos experimentales, sobre todo Stu+90 en la experiencia 1 y Stu+72 y Sta+72 en la experiencia 2, aunque las diferencias no fueron significativas debido a la presencia de una variabilidad importante en los resultados de las dos réplicas realizadas.

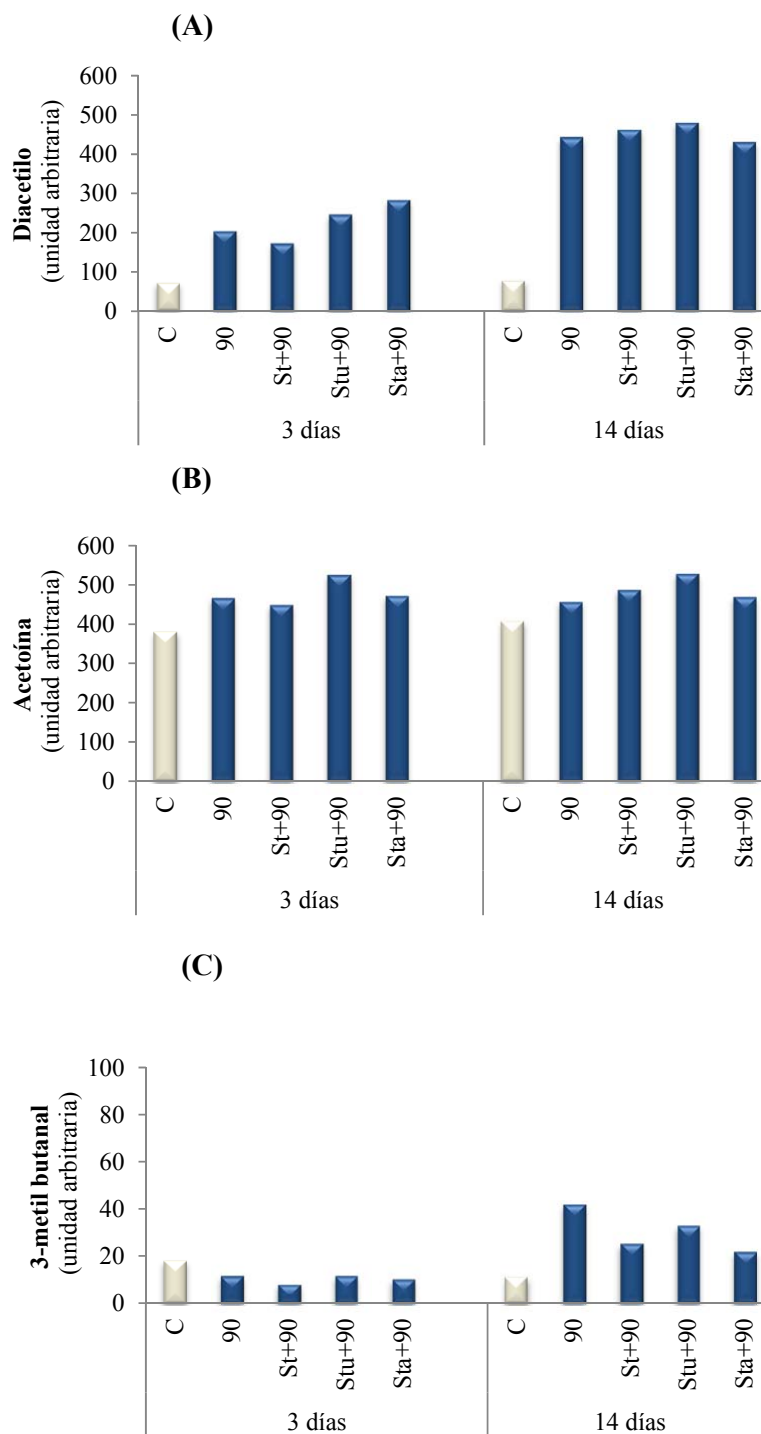
Dentro del grupo de los alcoholes, se pudieron determinar etanol, 1-propanol, 2-pentanol, 1-butanol, 2-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol, 2-etil-1-hexanol, 3-metil-1-butanol, 1,2-propanodiol, alcohol bencílico y fenol. Los alcoholes 1-heptanol y 1-octanol presentaron niveles significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ) en los extractos inoculados con respecto a los extractos sin inocular. El mismo comportamiento fue observado para el 1-propanol en los extractos de la experiencia 2, únicamente a 14 días de incubación. El etanol fue identificado en todos los extractos pero no hubo diferencias significativas entre ellos. El 3-metil-1-butanol, derivado de la Leu, fue detectado únicamente en el extracto Sta+90 a los 3 días de incubación. El 1,2-propanodiol, derivado de la Thr fue detectado únicamente en algunos de los extractos inoculados de ambas experiencias, aunque las áreas del mismo fueron muy bajas. El fenol, derivado de la Tyr, se encontró en niveles significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ) en los extractos control que en los inoculados en la experiencia 1 a 3 días de incubación, mientras que la presencia de alcohol bencílico, derivado de Phe, se observó únicamente en los extractos control de ambas experiencias a 14 días de incubación y en el extracto St+90.

El grupo de ácidos hallados en los extractos de queso incluyó: ácido acético, ácido butírico ; ácido hexanoico, ácido nonanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico y ácido isovalérico. Los ácidos acético, butírico, hexanoico, octanoico y decanoico presentaron el mismo comportamiento en los extractos de ambas experiencias, observándose niveles significativamente ( $P \leq 0,05$ ) mayores en todos los extractos inoculados respecto a los extractos control. El ácido isovalérico presentó algunas diferencias entre extractos control e inoculados a 3 días en la experiencia 2, aunque a 14 días los valores fueron similares entre todos los extractos.

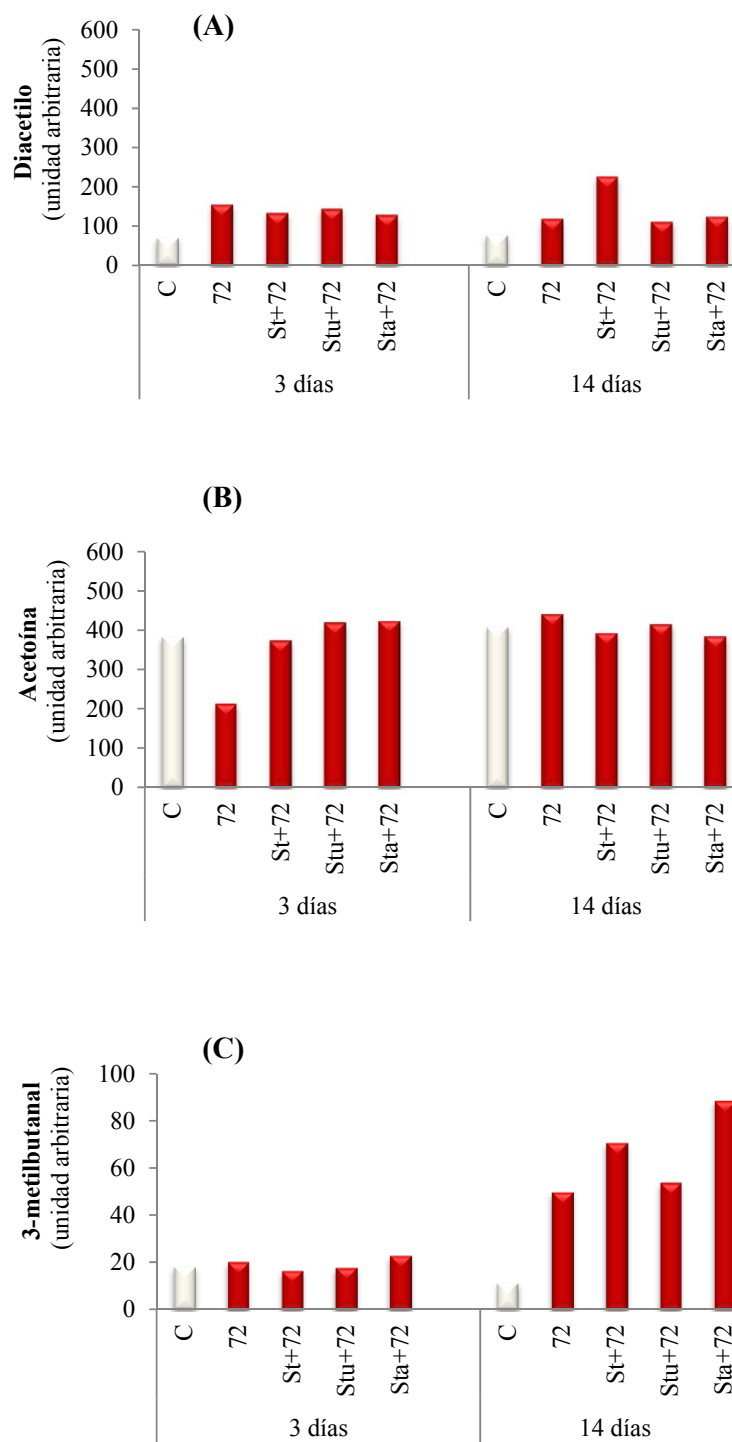
Dentro de las cetonas encontradas en los extractos, adquiere una importancia especial la 2,3 butanodiona (diacetilo), y el compuesto resultante de la reducción de uno de los dos grupos ceto, 3-OH-2-butanona (acetoína), ya que los mismos pueden ser derivados de la transaminación del Asp y son compuestos importantes en el flavour de quesos. La acetoína y diacetilo fueron identificados en todos los extractos de ambas experiencias. El área de ambos compuestos fue significativamente mayor en los extractos inoculados con la cepa *Lb. paracasei* 90 tanto a 3 como a 14 días de incubación, mientras que únicamente el diacetilo fue mayor en los extractos inoculados con *Lb. casei* 72. En la experiencia 1, el diacetilo y la acetoína presentaron algunas diferencias entre los distintos extractos inoculados, siendo en general mayores los valores de área para los extractos Stu+90 y Sta+90. Otras cetonas detectadas fueron 2-propanona, 2-butanona, delta dodecalactona, que no presentaron diferencias entre los extractos en ambas experiencias; la acetofenona que presentó mayores valores en los extractos inoculados que en los extractos control, mientras que la 2-hexanona presentó mayores valores en los extractos control que en los inoculados.

Finalmente, dos ésteres fueron identificados: acetato de isoamilo y hexanoato de etilo, cuyas áreas no presentaron diferencias significativas entre los extractos de ninguna de las dos experiencias.

Al realizar un análisis de ANOVA de los compuestos volátiles obtenidos en los extractos inoculados únicamente con las cepas de lactobacilos 90 y 72, se detectaron diferencias significativas a 3 días para acetoína y diacetilo que presentaron mayores valores para la cepa 90, y para el acetaldehído, que presentó mayores niveles en la 72. A los 14 días, se presentaron diferencias significativas únicamente para el 1-heptanol, que fue mayor para la cepa 72.



**Figura 4.10.** Área de los compuestos volátiles: diacetilo (A), acetoína (B) y 3-metilbutanal (C) en los extractos control (■) e inoculados con *Lb. paracasei* 90 (■) a 3 y 14 días de incubación. Los valores representan las áreas promedio de los compuestos volátiles afectados por un factor de  $10^{-3}$ .



**Figura 4.11.** Área relativa de los compuestos volátiles: diacetilo (A), acetoina (B) y 3-metilbutanal (C) en los extractos control (■) e inoculados con *Lb. casei* 72 (■) a 3 y 14 días de incubación. Los valores representan las áreas promedio de los compuestos volátiles afectados por un factor de  $10^{-3}$ .

## Capítulo 4

**Tabla 4.6.** Compuestos volátiles identificados en los extractos de queso control e inoculados con *Lb. paracasei* 90.

	AA precursor	3 días						14 días					
		C	90	St+90	Stu+90	Sta+90	C	90	St+90	Stu+90	Sta+90		
Acetaldehído	Asp, Thr	94 49	50 2	98 83	68 18	40 16	91 72	37 25	83 78	23 14	21 12		
2-propanona	-----	54 10	48 1	48 10	48 8	41 6	32 5	35 31	28 1	30 6	24 3		
2-butanona	-----	27 1	29 4	20 3	27 4	22 3	13 4	18 19	13 1	14 4	11 3		
3-metilbutanal*	Leu	18 <sup>b</sup> 4	12 <sup>a</sup> 3	8 <sup>a</sup> 2	12 <sup>a</sup> 1	10 <sup>a</sup> 1	11 1	42 41	26 3	33 18	22 3		
Etanol	Thr, Asp	57 10	62 10	65 14	76 3	76 24	73 11	62 4	70 7	61 36	65 1		
Diacetilo	Asp	71 <sup>a</sup> 6	205 <sup>b</sup> 9	173 <sup>b</sup> 3	247 <sup>c</sup> 55	284 <sup>c</sup> 24	79 <sup>a</sup> 11	443 <sup>b</sup> 178	463 <sup>b</sup> 72	481 <sup>b</sup> 84	431 <sup>b</sup> 41		
1-propanol	-----	7 5	11 1	11 2	5 6	8 1	7 2	11 1	11 1	10 2	9 1		
2-hexanona	-----	92 <sup>b</sup> 14	10 <sup>a</sup> 3	7 <sup>a</sup> 4	8 <sup>a</sup> 1	13 <sup>a</sup> 5	48 <sup>b</sup> 3	18 <sup>a</sup> 14	21 <sup>a</sup> 5	17 <sup>a</sup> 1	15 <sup>a</sup> 3		
2-pentanol	-----	76 12	66 23	58 5	37 33	67 1	39 2	42 19	43 11	42 21	25 4		
Acetato de isoamilo	Leu, Gly, Ser	23 2	20 0	19 0	11 8	23 3	20 3	18 1	19 1	16 7	13 1		
1-butanol	-----	45 13	38 1	38 2	23 12	32 3	45 6	37 4	41 2	36 7	31 3		
3-metil-1-butanol	Leu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
2-hexanol	-----	11 1	15 2	10 1	10 5	12 1	9 0	16 5	18 3	17 5	11 4		
Hexanoato de etilo	-----	40 10	42 13	33 6	28 17	23 1	29 13	35 1	31 13	21 10	48 30		
Acetoina†	Asp	382 <sup>a</sup> 12	466 <sup>b</sup> 1	448 <sup>b</sup> 13	525 <sup>c</sup> 18	472 <sup>b</sup> 11	408 <sup>a</sup> 11	456 <sup>a,b</sup> 51	487 <sup>b</sup> 33	528 <sup>b</sup> 26	469 <sup>a,b</sup> 37		
1-heptanol	-----	9 <sup>a</sup> 1	14 <sup>b</sup> 1	17 <sup>c</sup> 1	18 <sup>c</sup> 3	19 <sup>c</sup> 1	9 <sup>a</sup> 2	13 <sup>b</sup> 1	16 <sup>c</sup> 1	14 <sup>b</sup> 1	13 <sup>b</sup> 1		
Ác. acético	Asp, Ser, Ala, Gly	79 20	354 63	535 372	348 60	277 102	53 <sup>a</sup> 13	365 <sup>b</sup> 29	361 <sup>b</sup> 32	392 <sup>b</sup> 75	335 <sup>b</sup> 41		
2-etil-1-hexanol	-----	593 <sup>c</sup> 50	524 <sup>b,c</sup> 3	426 <sup>b</sup> 90	49 <sup>a</sup> 20	509 <sup>b,c</sup> 53	778 369	941 335	924 39	573 87	781 24		
Benzaldehído	Phe, Trp	198 <sup>b</sup> 20	74 <sup>a</sup> 8	70 <sup>a</sup> 2	63 <sup>a</sup> 9	86 <sup>a</sup> 9	206 5	107 15	123 2	96 2	86 7		
1-octanol	-----	10 <sup>a</sup> 1	17 <sup>b</sup> 1	20 <sup>b</sup> 2	19 <sup>b</sup> 5	20 <sup>b</sup> 1	12 <sup>a</sup> 2	18 <sup>b,c</sup> 3	19 <sup>c</sup> 1	15 <sup>a,b</sup> 1	18 <sup>b,c</sup> 1		
1,2- propanodiol	Thr	n.d.	8 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8 1		
Ác. butírico	-----	38 <sup>a</sup> 13	187 <sup>b</sup> 7	218 <sup>b</sup> 32	213 <sup>b</sup> 5	184 <sup>b</sup> 7	44 <sup>a</sup> 8	202 <sup>b</sup> 9	200 <sup>b</sup> 28	205 <sup>b</sup> 9	200 <sup>b</sup> 1		
Acetofenona	Phe	n.d.	10 1	19 11	14 2	16 1	n.d.	11 2	13 0	12 1	13 1		
Ác. isovalérico	Leu	70 <sup>b</sup> 18	24 <sup>a</sup> 22	19 <sup>a</sup> 2	n.d.	57 <sup>a</sup> 22	52 58	66 55	81 9	80 7	35 18		
4-OH-benzaldehído	Tyr	62 6	31 15	63 6	87 40	65 24	122 54	112 58	133 1	200 107	113 1		
Ác. hexanoico	-----	44 <sup>a</sup> 8	336 <sup>b</sup> 9	371 <sup>b,c</sup> 28	403 <sup>c</sup> 20	353 <sup>b</sup> 19	77 <sup>a</sup> 16	401 <sup>b</sup> 31	379 <sup>b</sup> 63	381 <sup>b</sup> 34	389 <sup>b</sup> 1		
Alcohol bencílico	Phe	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5 1	n.d.	5 1	n.d.	n.d.		
Benzotiazol	Cys, Met	15 2	12 4	23 7	18 2	11 a	57 15	48 10	36 6	31 3	61 4		
Fenol	Tyr	498 <sup>d</sup> 10	258 <sup>b</sup> 20	389 <sup>c</sup> 87	165 <sup>a</sup> 17	456 <sup>c,d</sup> 19	1040 122	1420 982	1310 223	1202 723	1118 113		
Ác. octanoico	-----	43 <sup>a</sup> 6	210 <sup>b</sup> 12	229 <sup>b</sup> 16	241 <sup>b</sup> 17	235 <sup>b</sup> 41	64 <sup>a</sup> 12	242 <sup>b</sup> 24	219 <sup>b</sup> 22	220 <sup>b</sup> 13	227 <sup>b</sup> 8		
Ác. nonanoico	-----	n.d.	11 3	18 11	19 15	76 82	6 7	51 54	12 9	18 11	17 13		
Ác. decanoico	-----	33 <sup>a</sup> 2	68 <sup>b</sup> 7	74 <sup>b</sup> 2	77 <sup>b</sup> 7	81 <sup>b</sup> 13	41 <sup>a</sup> 4	92 <sup>b</sup> 23	78 <sup>b</sup> 6	72 <sup>b</sup> 10	77 <sup>b</sup> 1		
Delta dodecalactona	-----	8 1	18 1	20 9	36 6	24 1	9 3	38 23	39 24	40 17	50 3		
Ác. dodecanoico	-----	9 1	10 1	10 1	11 2	11 2	9 1	17 7	12 2	10 3	11 1		

Los valores representan el área promedio y la desviación estándar (en gris) de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio. Diferentes superíndices en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación indican la presencia de diferencias significativas. \* y †: Presencia de diferencias significativas a un nivel  $P \leq 0,10$  a 3 y 14 días, respectivamente. En caso que no se indique se refiere a diferencias a un nivel  $P \leq 0,05$ .

## Capítulo 4

**Tabla 4.7.** Compuestos volátiles identificados en los extractos de queso control e inoculados con *Lb. casei* 72

	AA precursor	3 días						14 días													
		C	72	St+72	Stu+72	Sta+72	C	72	St+72	Stu+72	Sta+72										
Acetaldehído	Asp, Thr	94	49	83	5	59	10	128	150	39	6	91	72	78	24	18	14	41	24	10	4
2-propanona	-----	54	10	48	6	51	1	44	7	48	2	32	5	27	8	40	22	25	8	46	22
2-butanona	-----	27	1	26	4	27	2	26	1	26	1	13	4	14	1	20	14	14	1	26	16
3-metilbutanal	Leu	18	4	20	4	17	1	18	3	23	6	11	1	50	14	71	60	54	14	89	43
Etanol	Thr, Asp	57	10	84	6	68	1	64	6	91	31	73	11	63	17	75	1	56	17	94	20
Diacetilo	Asp	71 <sup>a</sup>	6	156 <sup>b</sup>	7	134 <sup>b</sup>	3	145 <sup>b</sup>	17	130 <sup>b</sup>	30	79 <sup>a</sup>	11	120 <sup>a</sup>	7	227 <sup>b</sup>	66	112 <sup>a</sup>	7	126 <sup>a</sup>	3
1-propanol†	-----	7	5	12	3	11	1	10	4	10	1	7 <sup>a</sup>	2	11 <sup>b</sup>	1	12 <sup>b</sup>	1	11 <sup>b</sup>	1	10 <sup>b</sup>	1
2-hexanona	-----	92 <sup>b</sup>	14	10 <sup>a</sup>	5	8 <sup>a</sup>	1	11 <sup>a</sup>	2	13 <sup>a</sup>	8	48 <sup>b</sup>	3	20 <sup>a</sup>	7	17 <sup>a</sup>	8	21 <sup>a</sup>	7	13 <sup>a</sup>	1
2-pentanol	-----	76	12	52	40	79	26	64	1	70	6	39	2	32	10	48	30	32	10	40	24
Acetato de isoamilo	Leu, Gly, Ser	23	2	20	2	19	2	20	2	22	1	20	3	18	4	19	6	17	4	19	5
1-butanol	-----	45	13	35	1	32	2	33	1	38	2	45	6	40	4	37	1	39	4	34	1
3-metil-1-butanol	Leu	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
2-hexanol	-----	11	1	10	2	11	1	13	2	14	2	9 <sup>a</sup>	1	18 <sup>c</sup>	3	13 <sup>b</sup>	1	13 <sup>b</sup>	3	14 <sup>b,c</sup>	1
Hexanoato de etilo	-----	40	10	34	5	36	2	28	3	23	10	29	13	26	5	28	3	26	5	17	2
Acetoína	Asp	382	12	361	21	374	6	419	9	424	61	408	11	441	57	393	33	415	57	385	75
1-heptanol	-----	9 <sup>a</sup>	0	17 <sup>a,b</sup>	5	27 <sup>b,c</sup>	3	25 <sup>b,c</sup>	6	28 <sup>c</sup>	1	9 <sup>a</sup>	2	18 <sup>b</sup>	4	22 <sup>b</sup>	2	18 <sup>b</sup>	4	24 <sup>b</sup>	4
Ác. acético	Asp, Ser, Ala, Gly	79	20	200	3	188	1	227	41	208	101	53 <sup>a</sup>	13	321 <sup>b</sup>	19	296 <sup>b</sup>	11	286 <sup>b</sup>	19	286 <sup>b</sup>	106
2-etil-1-hexanol	-----	593	50	487	94	507	30	455	24	561	11	778	369	862	398	925	505	453	398	1048	211
Benzaldehído	Phe, Trp	198 <sup>b</sup>	20	90 <sup>a</sup>	5	80 <sup>a</sup>	21	96 <sup>a</sup>	3	86 <sup>a</sup>	5	206 <sup>c</sup>	5	96 <sup>a,b</sup>	23	88 <sup>a,b</sup>	12	68 <sup>a</sup>	23	112 <sup>b</sup>	6
1-octanol	-----	10a	1	21b	2	27b	5	26b	6	30 <sup>b</sup>	1	12 <sup>a</sup>	2	24b <sup>c</sup>	4	25 <sup>b,c</sup>	0	20 <sup>b</sup>	4	27 <sup>c</sup>	3
1,2-propanodiol	Thr	n.d.		n.d.		n.d.		6	1	n.d.		n.d.		6	6	11	7	5	6	n.d.	
Ác. butírico	-----	38 <sup>a</sup>	13	193 <sup>b</sup>	38	210 <sup>b</sup>	40	181 <sup>b</sup>	4	178 <sup>b</sup>	59	44 <sup>a</sup>	8	228 <sup>b</sup>	17	198 <sup>b</sup>	12	218 <sup>b</sup>	17	193 <sup>b</sup>	35
Acetofenona	Phe	n.d.		13	2	18	2	19	6	21	1	n.d.		16	1	13	3	14	1	15	4
Ác. isovalérico	Leu	70	18	43	17	24	33	67	2	27	9	52	58	77	91	70	14	68	91	187	124
4-OH-benzaldehído	Tyr	62	6	58	4	57	17	67	12	72	14	122	54	192	31	122	23	264	31	261	157
Ác. hexanoico	-----	44 <sup>a</sup>	8	290 <sup>b</sup>	22	344 <sup>b</sup>	4	340 <sup>b</sup>	11	326 <sup>b</sup>	88	77 <sup>a</sup>	16	435 <sup>b</sup>	38	375 <sup>b</sup>	27	407 <sup>b</sup>	38	370 <sup>b</sup>	51
Alcohol bencílico†	Phe	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		5	0	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
Benzotiazol	Cys, Met	15	2	21	11	20	8	13	2	10	3	57	15	76	12	30	12	47	12	46	1
Fenol	Tyr	498	10	409	80	394	157	545	18	404	29	1040	122	1570	464	1083	272	1052	464	1474	45
Ác. octanoico	-----	43 <sup>a</sup>	6	207 <sup>b</sup>	13	218 <sup>b</sup>	9	215 <sup>b</sup>	3	222 <sup>b</sup>	11	64 <sup>a</sup>	12	259 <sup>b</sup>	26	218 <sup>b</sup>	14	231 <sup>b</sup>	26	245 <sup>b</sup>	6
Ác. nonanoico	-----	n.d.		76	86	14	7	20	14	62	74	6	7	46	15	11	5	36	15	107	100
Ác. decanoico	-----	33 <sup>a</sup>	2	70 <sup>b</sup>	10	70 <sup>b</sup>	6	69 <sup>b</sup>	3	76 <sup>b</sup>	2	41 <sup>a</sup>	4	88 <sup>b</sup>	14	72 <sup>b</sup>	2	77 <sup>b</sup>	14	93 <sup>b</sup>	15
Delta dodecalactona	-----	8	1	15	1	22	6	20	2	28	17	9	3	47	6	31	13	46	6	30	20
Ác. dodecanoico	-----	9	1	11	2	10	2	10	1	12	1	9	1	14	4	11	1	12	4	14	3

Los valores representan el área promedio y la desviación estándar (en gris) de dos réplicas de la experiencia llevadas a cabo con cultivos independientes de las cepas en estudio.

Diferentes superíndices en una misma hilera para un mismo tiempo de incubación indican la presencia de diferencias significativas. \* y †: Presencia de diferencias significativas a un nivel  $P \leq 0,10$  a 3 y 14 días, respectivamente. En caso que no se indique se refiere a diferencias a un nivel  $P \leq 0,05$ .



#### **4. Discusión**

La ausencia de crecimiento microbiano en los extractos sin inocular confirmó la efectividad de los tratamientos aplicados para la esterilización de dicho medio, lo que permitió abordar el estudio del catabolismo de los compuestos presentes y producción de metabolitos y relacionarlo con la actividad de los microorganismos inoculados, en un medio válido y reproducible.

Ambas cepas de lactobacilos demostraron crecimiento y mantenimiento de la población en el medio utilizado para los ensayos hasta el final de la incubación. Estos resultados indican que las mismas presentan una buena resistencia y adaptación al ambiente adverso del queso, lo que se correlaciona con el origen NSLAB de las mismas (Bude Ugarte y col., 2006) y con ensayos previos sobre sus características tecnológicas (Briggiler-Marcó y col., 2007). En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación sobre extractos de queso duro de pasta cocida tipo Reggianito, se observó un crecimiento de *Lb. plantarum* 91 y *Lb. paracasei* 90 hasta valores similares a los encontrados en el presente trabajo, es decir  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Milesi, 2009). Por el contrario, y en relación a los resultados obtenidos de recuentos microbiológicos de *S. thermophilus*, la falta de crecimiento y aún la disminución del recuento de células viables, probablemente se deba a la baja tolerancia de este fermento al bajo pH inicial del extracto (~ 5), ya que como se mencionó en el capítulo 3, *Streptococcus* sp. es sensible a la acidez del medio (Hutkins y Nannen, 1993). Bender y col. (1986) observaron que en tres cepas de *Streptococcus*: *Streptococcus mutans* GS-5, *Streptococcus sanguis* NCTC10904 y *Streptococcus thermophilus* ATCC 13419 se produjo un daño en la célula a un pH alrededor de 4. En cambio, *Lactobacillus casei* ATCC 4646 tuvo mayor resistencia al medio ácido e inclusive hasta un pH más bajo (pH 3). Por otro lado, se sabe que diversas actividades enzimáticas son afectadas por el pH. Por ejemplo, para la cepa *L. lactis* ssp. *lactis* ML3 se ha informado disminución de la actividad específica hexoquinasa y la actividad glicolítica a pH < 5 (Harvey, 1965). La disminución de la actividad hexoquinasa reduciría la capacidad de metabolizar la glucosa, impidiendo que la célula pueda obtener energía.

La disminución del pH en los extractos inoculados con las cepas de lactobacilos se debe a la producción de ácido láctico formado por el metabolismo de la lactosa y galactosa a través de la vía Embden-Meyerhof. A pesar de que en las experiencias incluidas en el capítulo 2, encontramos una mayor actividad β-galactosidasa en los cultivos de *S. thermophilus* atenuados con tratamientos de alcohol u ondas de ultrasonido, dicha actividad no se tradujo en un metabolismo incrementado de la lactosa en los extractos estudiados en el presente capítulo.

En efecto, la incorporación de los cultivos de *S. thermophilus* en distintos estados metabólicos no produjo ningún cambio en el pH, ni en la concentración de lactosa y de ácido láctico de los extractos. Es probable que este resultado se deba a la baja concentración inicial de lactosa y al valor comparativamente elevado de galactosa. En efecto, la cepa estudiada, al igual que la mayoría de las cepas de *S. thermophilus*, es incapaz de metabolizar la galactosa (Poolman, 2002; Høier y col., 2010). Tanto en los quesos elaborados con *S. thermophilus*, como los extractos obtenidos a partir de ellos, en ausencia de otras BAL capaces de fermentar la galactosa, se acumula este monosacárido (Capítulo 3). De esta manera, la disminución de pH e incremento de ácido láctico en los extractos se puede atribuir principalmente a la fermentación de galactosa por los lactobacilos inoculados, la cual estaba en concentraciones muy superiores a la lactosa y disminuyó significativamente durante la incubación.

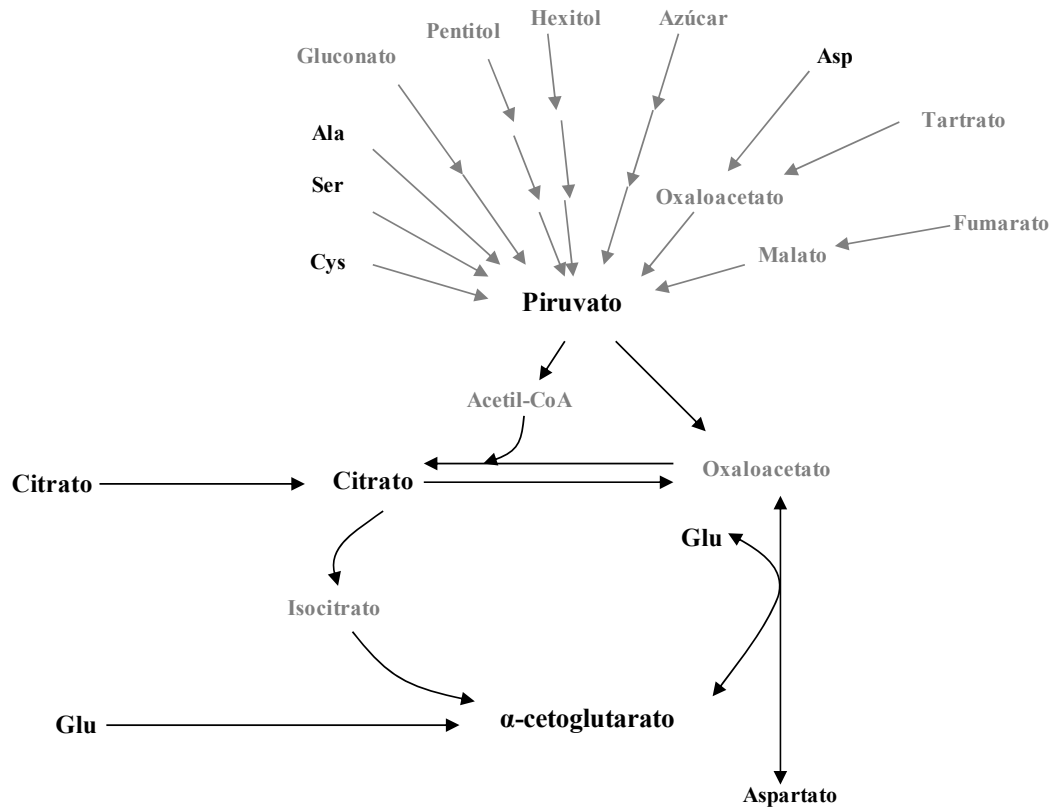
La estabilidad de la lactosa y galactosa durante los 14 días de incubación en los extractos control es otro indicio de ausencia de contaminaciones. Además, estos resultados confirman: i) la ausencia de una posible actividad  $\beta$ -galactosidasa remanente del cultivo iniciador (*S. thermophilus*) utilizado en la elaboración del queso y ii) la ausencia de reacciones químicas de degradación de estos azúcares.

En relación a los ácidos orgánicos, el ácido pirúvico es un metabolito intermediario de una gran cantidad de vías metabólicas, por lo que es difícil correlacionar su concentración con algunas de estas vías en particular, especialmente en un medio complejo como los extractos de queso utilizados en esta tesis (Liu, 2003; Park, 2009). En la **Figura 4.12**, se presentan las diversas vías metabólicas que pueden dar lugar a la formación de ácido pirúvico a partir de aminoácidos (Asp, Ala, Ser, Cys), azúcares, alcoholes y ácidos (Liu, 2003). En particular, a partir de la Ala se puede formar ácido pirúvico en un solo paso por la acción de la alanina aminotransferasa (Le Bars y Yvon, 2008), y desde la Cys por la acción de la cisteína desulfhidrasa que libera los grupos sulfuros, también se puede generar pirúvico (Shay y col., 1998). Por otro lado, la disminución de su concentración puede atribuirse al uso del mismo como aceptor de grupo amino en las reacciones de transaminación (Ardö, 2006; Fernández y Zúñiga, 2006; Yvon, 2006) entre las numerosas vías metabólicas en las que se halla implicado

Una de las posibles causas del aumento de ácido pirúvico en el extracto control entre 3 y 14 días, es la decarboxilación espontánea de oxaloacetato presente en el medio, ya que el mismo es inestable en solución acuosa (Krebs, 1942; Pudlik y col., 2011). Los incrementos en los niveles de ácido pirúvico en los extractos inoculados de ambas experiencias en relación al extracto control son difíciles de correlacionar con caminos metabólicos determinados o

incluso conjuntos sencillos de éstos, debido a la participación de este ácido como intermediario en una gran cantidad de vías metabólicas, como fue mencionado anteriormente.

Las tres posibles vías metabólicas para la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato en BAL sugeridas por Tanous y col. (2005) fueron incluidas en la **Figura 4.12**. La primera de las vías es la producción del  $\alpha$ -cetoglutarato directamente por desaminación oxidativa del glutámico, a través de la GDH, utilizando NAD o NADP como cofactores. La segunda vía es la citrato-oxaloacetato, que produce el  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del citrato ingresado a la célula por una citrato permeasa. Una vez dentro del interior celular, el citrato es transformado en oxaloacetato por la actividad de la enzima citrato liasa, y este último será transformado a  $\alpha$ -cetoglutarato y aspartato, por la actividad de la aspartato aminotransferasa. Por último, la tercera vía es la citrato-isocitrato, que utiliza la rama oxidativa del ciclo del ácido tricarboxílico y conduce a la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato ya sea del piruvato o del citrato. La producción desde el piruvato requiere la acción de la piruvato dehidrogenasa, la piruvato carboxilasa, la citrato sintasa, la aconitasa y por último la isocitrato dehidrogenasa. Para la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del citrato, sólo requiere la citrato permeasa y la actividad de la aconitasa e isocitrato dehidrogenasa. Por otro lado, la disminución del  $\alpha$ -cetoglutarato puede ser debido al uso como aceptor de grupo amino (Yvon, 2006). De esta manera, la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato en los extractos es el resultado del balance entre su producción y consumo (Tanous y col., 2005; Ardö, 2006). En los extractos inoculados con la cepa *Lb. paracasei* 90, hubo un mayor consumo o una baja producción del mismo debido a que su concentración fue menor que la del extracto control, mientras que el incremento de este ácido observado en los extractos inoculados con *Lb. casei* 72 indican un desbalance a favor de su producción. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad que la cepa *Lb. casei* 72 haya utilizado el  $\alpha$ -cetoglutarato como aceptor de grupo amino en las reacciones de transaminación, sino que en el balance neto de producción / degradación de  $\alpha$ -cetoglutarato está favorecida la producción.



**Figura 4.12.** Posibles vías metabólicas del ácido pirúvico en bacterias lácticas, relacionada con la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato. Adaptado de: Liu, 2003; Tanous y col., 2005.

En relación a la posible producción de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del glutámico por actividad GDH, en el capítulo 1 se observó que los lactobacilos presentaron una muy baja actividad, mientras que *S. thermophilus* mostró una actividad muy elevada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en el presente trabajo se determinó la actividad GDH-NAD dependiente, y es posible que los lactobacilos ensayados también presenten actividad GDH-NADP dependiente (Williams y col., 2006; De Angelis y col., 2010a,b). En este sentido y como se mencionó en el capítulo 1, se ha informado que algunas cepas de lactobacilos pueden tener actividad GDH específica para NAD, o NADP, e inclusive pueden tener ambas actividades (Williams y col., 2006). En el último caso, por lo general no está muy claro si es una misma enzima con la capacidad de usar ambos cofactores o bien si existen dos enzimas con actividades específicas para cada cofactor (Williams y col., 2006). Tanous y col. (2002) observaron que de 24 cepas de lactobacilos estudiadas (*Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* y *Lb. casei*) 17 cepas presentaron actividad GDH NADP-dependiente y ninguna de las cepas presentó actividad GDH NAD-dependiente. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre la dependencia de uno u otro cofactor de la enzima GDH.

De los resultados obtenidos en la experiencia 2, se podría inferir que la cepa *Lb. casei* 72 puede tener actividad GDH-NADP dependiente, debido al incremento significativo observado en la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato en relación al extracto control. Sin embargo, esto debería ser confirmado estudiando esta actividad específica.

Por otro lado, debido a la alta actividad GDH demostrada para la cepa de *S. thermophilus* utilizada en los ensayos del presente capítulo, era esperable que la incorporación de la misma produzca un incremento de  $\alpha$ -cetoglutarato en los extractos y mayores niveles de volátiles producidos por transaminación. Sin embargo, la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato se vio influenciada principalmente por la cepa de lactobacilo mesófilo ensayada. Los únicos cambios significativos en los niveles de este ácido debido a la presencia de *S. thermophilus* fue en el extracto St+72 a 3 días y en el extracto Sta+72 a los 14 días de incubación, que presentaron menores niveles del mismo en comparación con los otros extractos inoculados, indicando un posible mayor consumo del mismo en reacciones de transaminación.

Como se enunció previamente en el capítulo 3, se pueden plantear diversas hipótesis para justificar la falta de influencia de *S. thermophilus* en los niveles de  $\alpha$ -cetoglutarato en las experiencias realizadas, que van desde las condiciones subóptimas de crecimiento y su impacto en la expresión de las enzimas de interés, la influencia de las condiciones ambientales en la actividad enzimática, el tipo y disponibilidad de cofactores (ver capítulo 3). Sin embargo, para elucidar las mismas, se requiere profundizar mediante nuevos estudios. En primer lugar, aparece como deseable utilizar medios simples de reacción para evaluar el o los pasos limitantes en las reacciones de formación de compuestos volátiles a partir de la transaminación de aminoácidos por parte de *S. thermophilus*, ya que el complejo background del extracto de queso hace imposible el seguimiento de reacciones sobre sustratos individuales. Posteriormente, una vez dilucidadas estas cuestiones se podrían volver a extender y verificar los resultados o las hipótesis planteadas en modelos de quesos o directamente en la matriz alimentaria real.

Por otro lado, el ácido cítrico es un compuesto que se encuentra naturalmente presente en la leche, siendo el ácido mayoritario en la misma (Tormo y Izco, 2004). La mayoría de este ácido se pierde en el suero durante la elaboración de quesos (McSweeney, 2011). Sin embargo, cierta cantidad residual de ácido cítrico queda retenida en la cuajada, concentrándose en la misma y resultando de esta manera el segundo ácido mayoritario luego del láctico en varios tipos de quesos (Izco y col., 2002; Milesi y col., 2010). La fermentación del ácido cítrico por BAL citrato (+) da origen a compuestos volátiles importantes como acetoína, diacetilo, 2,3-butanodiol (McSweeney, 2011). El ácido cítrico presente en los

extractos se incrementó levemente en los extractos inoculados. Estos resultados demuestran la incapacidad de las cepas utilizadas de fermentar este ácido, e indican que los compuestos volátiles nombrados, para los cuales se detectó un incremento en los extractos inoculados no derivan del metabolismo del citrato. Por otro lado, un incremento del ácido cítrico puede deberse a la síntesis del mismo. En este sentido, Morishita y Yajima (1995) observaron alta actividad citrato sintasa en cuatro cepas de *Lactobacillus*, enzima que participa en la síntesis de ácido cítrico.

La disminución de la concentración de ácido orótico en todos los extractos inoculados podría ser atribuida a la utilización de este ácido en la biosíntesis de pirimidinas necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos; y además ha sido reportado como un factor de crecimiento para algunas BAL (Suzuki y col., 1986; González de Llano y col., 1996; Upreti y col., 2006; Kilstrup y col., 2005; Smeianov y col., 2007).

El ácido láctico ya se encontraba presente desde el inicio de la incubación en los extractos, debido a que los mismos se obtuvieron a partir de quesos en los que ya tuvo lugar la fermentación de la lactosa por el fermento primario utilizado con la consecuente producción de este ácido. Sin embargo, el ácido láctico se incrementó a valores superiores en los extractos inoculados durante la incubación debido a la fermentación de la lactosa, que se encontraba en muy bajos niveles (~ 45 mg / 100 mL), y sobre todo de la galactosa, cuyos niveles iniciales eran muy superiores (~ 550 mg / 100 mL). La alta concentración de galactosa en los extractos de queso es debido al tipo de fermento primario utilizado en la elaboración de los quesos, que consistió de la cepa de *S. thermophilus* 2. En general, las cepas de esta especie hidrolizan la lactosa generando los monosacáridos constituyentes: glucosa y galactosa, y posteriormente producen ácido láctico únicamente a partir de la glucosa, ya que no son capaces de metabolizar la galactosa. Este último azúcar es excretado al medio, y por ello su concentración inicial en los extractos resultó muy elevada en comparación con la lactosa (Høier, 2010). La gran disminución de la galactosa en los extractos inoculados durante la incubación indica la capacidad de las cepas de lactobacilos de fermentarla y producir ácido láctico. La capacidad de metabolizar este monosacárido es una característica favorable en cepas utilizadas como fermento adjunto en quesos, debido a que la acumulación de galactosa en este producto puede conducir a algunos efectos indeseables. En este sentido, una alta concentración de galactosa en queso Mozzarella conduce a un pardeamiento elevado del mismo por reacciones de Maillard cuando es utilizado para gratinar (Matzdorf y col., 1994). Asimismo, una alta concentración de este azúcar puede favorecer el desarrollo de bacterias NSLAB, que pueden dar origen a defectos, tal como la aparición de aberturas debido a la

producción de CO<sub>2</sub> (Anbukkarasi y col., 2013). Finalmente, la presencia de una cantidad excesiva de galactosa en los productos lácteos también puede afectar negativamente a individuos con galactosemia (Novelli y Reichardt, 2000).

La mayor cantidad de ácido acético en los extractos inoculados puede estar relacionada con la degradación de algunos aminoácidos, tales como Asp, Ser, Ala y Gly (Crow 1986; Urbach, 1995; Chaves y col., 2002; Liu y col., 2003a,b; Yvon, 2006). Además, parte del acético puede derivar de acetaldehído, ya que en varias cepas de lactobacilos se ha demostrado esta capacidad (Nosova y col., 2000).

Los bajos niveles de ácido úrico comparados con la mayoría del resto de los ácidos orgánicos y la disminución observada en los extractos de queso inoculados, también ha sido informada en quesos elaborados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* (Buffa y col., 2004).

Por otro lado, el extracto utilizado en los ensayos, que fue preparado a partir de un queso blando de 20 días de maduración, contiene péptidos provenientes de la hidrólisis de las caseínas durante la elaboración y maduración por la acción de diversas actividades enzimáticas (Milesi, 2009). El sistema peptidolítico de los lactobacilos ha sido estudiado en detalle y se sabe que estos microorganismos poseen un sistema complejo de peptidasas que les permite hidrolizar péptidos de diferentes tamaños con la consecuente liberación de aminoácidos (Christensen y col., 1999; Smit y col., 2005). En este sentido, varios autores han observado la presencia de una amplia variedad de peptidasas en cepas del grupo de *Lb. casei*, e incluso se han observado variaciones cepa-dependientes (Arora y Lee, 1990; Peterson y col., 1990; Habibi-Najabi y Lee, 1994; Macedo y col., 2000; Di Cagno y col., 2006). Las dos cepas de lactobacilos ensayadas demostraron la capacidad para hidrolizar péptidos presentes en el extracto incrementando de esta manera el nivel de AA libres (Milesi y col., 2010; Burns y col., 2012). Sin embargo, también hay que tener en cuenta que los aminoácidos pueden ser metabolizados por las BAL mediante diferentes vías, principalmente la transaminación, lo que da lugar a una disminución de su concentración en el medio (Ardö, 2006). En particular, las cepas de lactobacilos ensayadas demostraron niveles importantes de actividad ATs, mientras que *S. thermophilus* demostró elevadas actividades GDH y AT. En diversos estudios destinados a la evaluación de la capacidad de distintas BAL para metabolizar aminoácidos y producir compuestos volátiles derivados de los mismos mediante reacciones iniciadas en la transaminación, se han utilizado medios simples consistentes de buffer fosfato con el agregado de aminoácidos individuales o mezcla, del cosustrato  $\alpha$ -cetoglutarato y el cofactor piridoxal fosfato (PLP), necesario para la actividad de las AT (Kieronczyk y col., 2001 y

2003). En estos medios simples, resulta más fácil identificar y correlacionar el consumo de un aminoácido con los compuestos volátiles producidos, en comparación con estudios similares llevados a cabo en matrices reales o modelos de queso (Pawliszyn, 1999; Liu, 2003; Kieronczyk y col., 2004; Williams y col., 2004; Kourkoutas y col., 2006). En estos últimos casos, como en la experiencia realizada en el presente capítulo, la concentración de aminoácidos en los extractos de queso es el resultado del balance entre la producción a partir de los péptidos presentes debido a la actividad peptidasa y su degradación mediante la actividad enzimática específica de los cultivos inoculados.

En base a los resultados obtenidos, se puede observar que la actividad peptidasa de las cepas inoculadas, principalmente los lactobacilos, fue mayor que la actividad involucrada en el catabolismo de aminoácidos, debido al incremento observado en los AA totales e individuales en los extractos inoculados en relación a los extractos control. Sin embargo, la ocurrencia de reacciones catabólicas de aminoácidos iniciadas por transaminación es evidente debido a la presencia de compuestos volátiles derivados de dichas vías. En relación a la actividad peptidasa, *Lb. casei* 72 fue la cepa que demostró la mayor actividad peptidolítica, ya que los valores de aminoácidos en los extractos inoculados con la misma fueron aproximadamente el doble que en aquellos inoculados con la cepa *Lb. paracasei* 90. Esta propiedad de *Lb. casei* 72 la convierte en una cepa interesante para su utilización como fermento adjunto en quesos con el objetivo de lograr una aceleración de la maduración. Además del incremento de los AA, también se produjeron cambios en el perfil de los mismos, debido principalmente a la inoculación de los lactobacilos (Upadhyay y McSweeney, 2003). En este sentido, es importante recalcar que aminoácidos minoritarios en los extractos control, como Asp y Glu, pasaron a estar entre los mayoritarios en los extractos experimentales debido a la actividad peptidolítica específica de las cepas. Sin embargo, también es importante considerar que un incremento de Asp y Glu también puede deberse al uso de oxaloacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato como aceptores de grupo amino en las reacciones de transaminación. En efecto, la transferencia del grupo amino desde un aminoácido a estos  $\alpha$ -cetoácidos aceptores, genera Asp y Glu, respectivamente (Dudley y Steele, 2001; Ardö y col., 2002; Ardö, 2006, Holland, 2011; Pudlik y Lolkema, 2012). Asimismo, el Glu puede ser producido a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamina por la glutamato sintasa (Lapujade y col., 1998), o directamente de la glutamina por la acción de la glutaminasa (Vermeulen y col., 2007). Por otro lado, Leu fue el AA mayoritario tanto en extractos control como inoculados, aunque en estos últimos su concentración fue marcadamente superior. Ardö y col. (2002) han establecido que la composición de AA en un queso refleja sólo parcialmente la composición de AA de las



caseínas ya que los AA presentes en dicho producto son el resultado de actividades metabólicas microbianas que pueden dar lugar a un consumo o a una producción o liberación de los mismos. Asimismo, es importante tener en cuenta que no todas las partes de las caseínas son hidrolizadas de igual manera y esto depende principalmente de la variedad de queso. Los cambios observados en el perfil de AA libres en los extractos debido a la actividad de los microorganismos inoculados son de relevancia en las posibles reacciones de transaminación que puedan llevarse a cabo en dichos extractos, ya que el Glu es el precursor a partir del cual, por actividad GDH, se produce el  $\alpha$ -cetoglutarato, que es el aceptor de grupo amino más utilizado por las BAL en esta reacción. Además, tanto el Asp como la Leu son aminoácidos precursores de importantes compuestos volátiles producidos en reacciones posteriores a su transaminación, que han sido asociados a características aromáticas deseables en queso Cremoso, tales como diacetilo, acetoína, 3-metilbutanal y 3-metil-1-butanol (Milesi y col., 2010).

Es necesario considerar que la composición del medio de crecimiento puede tener un efecto negativo o positivo en la expresión de diferentes enzimas en BAL. En este sentido, en un estudio llevado a cabo con la cepa *Lactococcus lactis* IFPL730, se ha detectado que en condiciones de privación de Ile y Val en un medio definido químicamente pH 7,2, se obtuvo un incremento de la expresión de enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y un consecuente incremento de la formación de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol. Por el contrario, estos compuestos no fueron producidos en condiciones de privación de Leu, que es el aminoácido precursor de estos compuestos (García-Cayuela y col., 2012). Por otro lado, Yvon y col. (2000) reportaron una inhibición del gen de la AT de aminoácidos ramificados frente a altas concentraciones de los mismos o Met. Asimismo, Jensen y Ardö (2010) verificaron una influencia del medio de crecimiento (MRS o leche en polvo descremada) sobre el perfil de AT de seis cepas de *Lb. helveticus*; la actividad AT hacia algunos AA fue mayor luego del crecimiento en MRS, lo que concuerda con resultados de estudios previos de evaluación de la inducción de los genes que codifican dichas enzimas (Smeianov y col., 2007). Pedersen y col. (2013) han detectado una gran variación en la actividad y especificidad de AT para cepas de *Leuconostoc* y *Lb. danicus* según el medio de crecimiento (MRS y un extracto de queso).

En estudios anteriores llevados a cabo en el INLAIN, la adición de *Lb. paracasei* 90 como fermento adjunto en quesos blandos demostró un aumento de los AA libres totales a 60 días de maduración, incrementándose sobre todo las concentraciones de Asp, Ser, Arg, Leu y Phe en los quesos en comparación con quesos control sin fermento adjunto (Milesi y col., 2010).

Estos resultados son coincidentes con los observados en el presente trabajo en relación a la influencia de la cepa 90, indicando similar comportamiento en una matriz real de un queso blando y en el modelo de queso utilizado en la presente tesis, en donde además de los aminoácidos mencionados, también se incrementaron Glu, Pro y Val.

En general, la mayoría de los AA se incrementaron de igual manera en todos los extractos inoculados de cada experiencia, indicando que los lactobacilos son los que tuvieron la mayor influencia en la liberación de AA a partir de los péptidos presentes. Únicamente en la experiencia 2, se observó que para algunos aminoácidos: Val, Pro, Ser, Glu y Arg, hubo una influencia de la adición conjunta de *S. thermophilus*, detectándose menores niveles para los extractos inoculados únicamente con *Lb. casei* 72 y mayores niveles en todos los otros tratamientos o en algunos de ellos. De esta manera, estos resultados indican un mínimo aporte de la actividad de peptidasas de *S. thermophilus* en la liberación de ciertos AA. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos resultados también pueden ser debido a un mayor consumo de AA en los extractos inoculados únicamente con *Lb. casei* 72. Por otro lado, entre los fermentos termófilos, la actividad proteolítica y peptidolítica de cepas de *S. thermophilus* ha demostrado ser mucho menor que dicha actividad en cepas de lactobacilos termófilos como *Lactobacillus delbrueckii* y *Lb. helveticus* (Rajagopal y Sandine, 1990; Shahbal y col., 1993).

En la literatura se sugiere que el perfil de actividad AT hacia distintos aminoácidos es importante en la definición de los aminoácidos que serán mayormente metabolizados en las reacciones de transaminación y los compuestos volátiles producidos, debido a que las mismas compiten por el cosustrato ( $\alpha$ -cetoglutarato) presente en el medio para utilizarlo como aceptor de grupo amino en dicha reacción (Kieronczyk y col., 2004; Thage y col., 2005; Yvon, 2006). Por otro lado, además de la importancia del perfil de ATs, es posible que el perfil de aminoácidos presente en el medio tenga una influencia significativa en los compuestos volátiles producidos. Es decir, un mayor pool de un determinado aminoácido y una mayor especificidad del perfil de ATs para dicho aminoácido podrían ser importantes en el catabolismo y producción de compuestos volátiles asociados al mismo. En este sentido, en distintos tipos de quesos se ha observado una relación entre el nivel de aldehídos y las concentraciones de los aminoácidos precursores (Bintsis y Robinson, 2004; Hannon y col., 2007; Irigoyen y col., 2007; Bergamini y col., 2010). Por otro lado, se ha comprobado que el perfil de aminoácidos no es el único factor importante a tener en cuenta en la maduración, ya que se ha informado diferentes perfiles de compuestos aromáticos a pesar de que tenían el mismo perfil de AA lo que se explica por la distinta capacidad de dicha microbiota (McSweeney y Sousa, 2000).

La acetoína y diacetilo, dos de los compuestos volátiles más importantes en el aroma de quesos como el Cheddar (Dacremont y Vickers, 1994; Christensen y Reineccius, 1995) y que también han sido caracterizados como compuestos de flavour típicos de variedades de quesos fresco y blandos, son caracterizados por notas aromáticas a “manteca” (McSweeney y Sousa, 2000). Estos compuestos derivan principalmente del catabolismo del ácido cítrico por cepas Cit (+) (Starrenburg y Hugenholtz, 1991; Kleerebezem y col., 2000; Hutkins, 2001; Curioni y Bosset, 2002). Sin embargo, también ha sido sugerido que otra de las vías posibles de formación de estos compuestos es el catabolismo del Asp, mediante reacciones iniciadas en la transaminación (Kieronczyk y col., 2004; Le Bars y Yvon, 2008; Skeie y col., 2008a). Kocaoglu-Vurma y col. (2008) no encontraron una correlación entre los niveles de citrato y diacetilo en quesos suizos con la adición de lactobacilos adjuntos, lo que fue atribuido a que no se conocen exactamente los mecanismos por los cuales el diacetilo se forma en dichos quesos. Por otro lado, Yvon (2006) plantea que la formación de diacetilo a partir del citrato en quesos ocurre a estados muy tempranos de la maduración (durante el crecimiento de las BAL) y luego desaparece, por lo que la formación de diacetilo en quesos madurados es más probable que provenga del Asp mediante transaminación. Como fue mencionado anteriormente, ninguna de las dos cepas de lactobacilos tuvo la capacidad de metabolizar el ácido cítrico, ya que el mismo se mantuvo estable e incluso su concentración aumentó levemente en los extractos. Por otro lado, tal como se describió en el capítulo 1 de esta tesis, la cepa *Lb. paracasei* 90 mostró una mayor actividad aminotransferasa hacia el Asp que la cepa *Lb. casei* 72. Asimismo, la especificidad de actividad AT para *Lb. paracasei* 90 fue principalmente hacia este aminoácido, mientras que la cepa *Lb. casei* 72 mostró similares niveles de actividad para todos los aminoácidos ensayados. En base a lo mencionado, se podría inferir que el diacetilo y la acetoína producidas en los extractos durante la incubación son producto del metabolismo del Asp. Además, las diferencias en los niveles de especificidad de actividad AT hacia Asp entre las dos cepas de lactobacilos, se correlacionan con los niveles de diacetilo y acetoína detectados en los extractos, resultando mayores en aquéllos inoculados con *Lb. paracasei* 90. En efecto, en la experiencia 1, el diacetilo aumentó en los extractos inoculados en relación al control a 3 días y un mayor incremento se observó a 14 días. En relación a la acetoína, la misma se incrementó a los 3 días y se mantuvo en dichos niveles a los 14 días. Por el contrario, en la experiencia 2, únicamente se observaron diferencias significativas para el diacetilo, que se incrementó a 3 días en los extractos inoculados en relación al control y se mantuvo en dichos niveles a los 14 días. Se ha postulado que la formación de acetoína en quesos es más fácil que la de diacetilo, debido a

que la producción de este último a partir de  $\alpha$ -acetolactato por decarboxilación oxidativa es limitado en el medioambiente del queso que presenta bajo potencial redox (McSweeney y Sousa, 2000; Skeie y col., 2008 a y b). En las experiencias de este capítulo, se observó que el diacetilo fue el compuesto que mayor variación presentó por la actividad de los lactobacilos inoculados. La producción de diacetilo y acetoína por bacterias con actividad AspAT ha sido demostrada en medios de reacción conteniendo  $\alpha$ -cetoglutarato como aceptor de grupo amino (Le Bars y Yvon, 2008) así como también en modelos de quesos (Kieronczyk y col., 2004; Milesi y col., 2010). La incorporación de un cultivo de *S. thermophilus* atenuado con alcohol o ultrasonido produjo cierto incremento en los niveles de estos compuestos volátiles en la experiencia 1, lo que sugeriría un aporte de estas bacterias a la producción de los mismos a través de su actividad AspAT, que resultó elevada (Capítulo 1). En la experiencia 2, un mayor incremento de diacetilo se observó para la inoculación conjunta de *Lb. casei* 72 y *S. thermophilus* viable.

La producción de aldehídos a partir de los  $\alpha$ -cetoácidos mediante la actividad  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa es poco frecuente en BAL, aunque el gen que codifica la enzima ha sido identificado en algunas cepas. Esta actividad enzimática ha sido señalada como de relevancia para la producción de compuestos de flavour (Smit y col., 2004b; Yvon, 2006). En las experiencias realizadas, se detectó la presencia de 3-metilbutanal en mayores concentraciones en los extractos inoculados de ambas experiencias a 14 días de incubación. Las mayores diferencias se observaron para la experiencia con *Lb. casei* 72, lo que se podría correlacionar con su perfil similar de actividad AT para todos los AA y altos niveles de Leu en el extracto. Es importante tener en cuenta que éste fue el aminoácido mayoritario en todos los extractos. La presencia de 3-metilbutanal y 3-metil-1-butanol ha sido relacionada al aroma placentero del queso fresco, aportando una nota floral alcohólica (Curioni y Bosset, 2002; Bintsis y Robinson, 2004). Smit y col. (2004b) estudiaron el potencial de producir 3-metilbutanal a partir de Leu en varios microorganismos pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Arthrobacter*, que son utilizados como fermentos en elaboraciones de queso. Estos autores encontraron una gran variación de la actividad de las enzimas que participan en este camino metabólico. En particular, la actividad  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa que cataliza la transformación del  $\alpha$ -cetoisocaproico ( $\alpha$ -cetoácido derivado de la Leu) en 3-metilbutanal, fue encontrada solamente en dos cepas. Afzal y col. (2012) confirmaron la producción directa del 3-metilbutanal a partir de  $\alpha$ -cetoisocaproato como así también indirectamente del isovaleril-CoA en *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28, la

cual fue incrementada en presencia de mayores concentraciones de oxígeno disuelto. Estos autores sugieren que parámetros externos tales como el oxígeno o potencial redox pueden ser modificados para controlar la formación de este compuesto volátil (Afzal y col., 2013). Kieronczyk y col. (2006) también observaron la producción de 3-metilbutanal a partir del catabolismo de la Leu por *L. lactis*, y además observaron que cuando el medio era oxidativo, es decir con un potencial alto y positivo (+300 mV), se estimulaba la producción de aldehídos, a diferencia de cuando era negativo (-200 mV), cuando prevalecía la formación de ácidos carboxílicos e hidroxiácidos. Por otro lado, Fernández de Palencia y col. (2004) observaron que el aumento de la lisis en *Lactococcus lactis* generada por una bacteriocina, produjo un incremento de 2-metilbutanal debido a la mayor degradación de la Ile.

El acetaldehído, que puede derivar de la Thr y Asp, estaba presente en el extracto control, en el cual permaneció constante durante la incubación, pero disminuyó levemente en los extractos inoculados. El acetaldehído puede ser metabolizado a etanol por una alcohol dehidrogenasa, o a ácido acético por la aldehído dehidrogenasa (Chaves y col., 2002).

Los mayores valores de área del benzaldehído en el extracto control respecto a los extractos inoculados indican una posible metabolización de este compuesto por los lactobacilos. Como ya fue mencionado en la presente tesis, este compuesto cíclico puede derivar del catabolismo de la Phe o del Trp. La auto-oxidación del benzaldehído, ha sido propuesta como una de las posibles vías de formación de ácido benzoico en quesos por ciertas BAL (Sieber, 1995), como así también en vino por la actividad de levaduras (Delfi y col., 1991).

El 4-OH-benzaldehído, compuesto derivado de la Tyr (Singh y col., 2003; Curtin y McSweeney, 2004), se incrementó en algunos de los extractos inoculados, lo que puede correlacionarse con la presencia de actividad AT hacia la Tyr en las cepas ensayadas. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas.

La acetofenona, derivada de la Phe por una vía diferente a la transaminación (Sieber, 1995), fue encontrada únicamente en los extractos inoculados indicando de esta manera la capacidad de los lactobacilos de producir este compuesto, probablemente debido a la mayor cantidad de Phe presente en dichos extractos. El benzotiazol, es un compuesto que ha sido identificado en quesos Parmesano (Meinhart y Schreier, 1986) y Gruyère (Bosset y col., 1994) como así también en leche (Boelrijk y col., 2005). El origen de este compuesto en los extractos de quesos posiblemente esté relacionado con el tratamiento térmico llevado a cabo en la preparación de los extractos de queso, ya que ha sido comprobado que puede formarse

por degradación térmica de algunos aminoácidos tales como Cys (Zhang y col., 1988) y Met (Barbieri y col., 1994).

En general se observó una tendencia a la formación de alcoholes y ácidos en los extractos inoculados, atribuible principalmente a las cepas de *Lactobacillus*. Helinck y col. (2004) también observaron esta característica en una cepa de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*.

En la actualidad, varios estudios se llevan a cabo sobre las maquinarias enzimáticas de las BAL implicadas en la biogeneración de flavour en el queso, pero en la mayoría de ellos se estudiaron cepas de lactococos, y un número menor de estudios han sido conducidos sobre lactobacilos, mientras que la capacidad de formación de flavour por estreptococos ha sido abordado en un muy escaso número de trabajos y quedan muchos interrogantes no resueltos aún. Ellos apuntan tanto a la disponibilidad de las enzimas, su presencia en los genomas, como a las condiciones celulares y ambientales que permiten la efectiva realización de las reacciones y el flujo hacia uno u otro camino metabólico (Ganesan y col., 2007; Chambellon y col., 2009; Budinich y col., 2011; Hayes y col., 2011). Por otro lado, el impacto de cultivos adjuntos formados por mezcla de dos o más cepas en la formación de compuestos de aroma no necesariamente es la suma de los compuestos producidos por los cultivos individuales, ya que las interacciones metabólicas pueden tener un rol muy importante. En este sentido, como ya se indicó en este capítulo, ha sido planteada la posibilidad de combinar cepas con vías metabólicas complementarias para conducir a un aumento de compuestos volátiles (Ayad y col., 2001; Chaves y col., 2002; Fernández de Palencia y col., 2004). Hynes y col. (2003) estudiaron la influencia de los lactobacilos como cultivos adjuntos en quesos elaborados con cepas de lactococos. Observaron que se produjo una modificación del flavour del queso por la adición de lactobacilos; siendo esta influencia variable según la cepa de lactococo usada. Kieronczyk y col. (2003) verificaron una cooperación entre una cepa de lactobacilo GDH (+) que produjo los  $\alpha$ -cetoácidos de diferentes AA, y una cepa de lactococo GDH (-) que metabolizó estos compuestos produciendo ácidos carboxílicos e intensificando de esta manera el aroma. Por su parte, Ayad y col. (2001) han complementado dos cepas de lactococos: *L. lactis* SK110, altamente proteolítica, con actividad AT pero sin actividad  $\alpha$ -cetoácido decarboxilasa, con *L. lactis* B1157, no proteolítica, con actividad AT y  $\alpha$ -cetoisocaproico decarboxilasa, logrando estos cultivos en forma conjunta una mayor producción de 3-metilbutanal, debido a la complementación de la proteólisis de las caseínas, incremento de AA y catabolismo de los mismos.

De los resultados obtenidos en las experiencias detalladas en el presente capítulo, observamos en general que la fermentación, peptidólisis y producción de compuestos volátiles

fue dominada por la actividad de las dos cepas de lactobacilos inoculadas, mientras que se observaron mínimos cambios por la inoculación conjunta con la cepa de *S. thermophilus* en distintos estados fisiológicos. De esta manera, con las cepas utilizadas y en las condiciones ensayadas en nuestro trabajo no detectamos una cooperación significativa entre las cepas utilizadas. El uso de cepas con alta actividad GDH ha sido establecido como una estrategia alternativa al agregado directo de  $\alpha$ -cetoglutarato al queso. Entre los estudios llevados a cabo por grupos de investigación líderes en la temática, se ha observado que el uso de cepas de lactococos o lactobacilos con alta actividad GDH produjo un incremento en la formación de compuestos de aroma derivados del catabolismo de aminoácidos (Rijnen y col., 2000; Williams y col., 2006; De Angelis y col., 2010b). Por otro lado, la adición de glutámico incrementó la degradación de aminoácidos por cepas de lactobacilos GDH positivas, que produjeron el  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del glutámico (Tanous y col., 2002). Asimismo, la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato en quesos, produjo un incremento en la formación de volátiles cuando se utilizó un fermento adjunto de *Lb. plantarum* con baja actividad GDH (De Angelis y col., 2010a). En nuestro trabajo, utilizamos una cepa de *S. thermophilus* con alta actividad GDH, y la combinamos con cepas de lactobacilos, esperando un incremento en la formación de volátiles por la inoculación conjunta debido a una complementación de las vías metabólicas. En este sentido, *S. thermophilus* aportaría mayores concentraciones de  $\alpha$ -cetoglutarato por su actividad GDH, eliminando de esta manera este factor como paso limitante en el catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, la cepa utilizada ya sea en forma viable o sometida a distintos tratamientos de atenuación no fue capaz de favorecer la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato o de incrementar la bioformación de compuestos volátiles en los extractos ensayados.

## 5. Conclusiones

En general, el perfil de aminotransferasas de las cepas *Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72 se correlacionó con los compuestos volátiles producidos por las mismas en los extractos. La cepa *Lb. paracasei* 90, que mostró una mayor especificidad hacia el Asp, presentó mayores niveles de diacetilo y acetoína, compuestos derivados de este aminoácido. Por su parte, la cepa *Lb. casei* 72, que presentó niveles similares de AT hacia todos los aminoácidos estudiados, se diferenció principalmente de los extractos sin inocular por un incremento de 3-metilbutanal, compuesto derivado de la Leu. Estos resultados indican que el estudio de las enzimas involucradas en las vías metabólicas del catabolismo de aminoácidos es una herramienta muy

importante al momento de seleccionar un fermento para ser utilizado en la elaboración de un queso con determinadas notas aromáticas. Sin embargo, esta correlación no fue encontrada para el caso de *S. thermophilus* que, a pesar de sus altas actividades GDH y AT en las pruebas *in vitro*, no tuvo una gran influencia en la bioformación de flavour en los ensayos realizados. Por un lado, estos resultados plantean interrogantes acerca de las etapas limitantes en la actuación de estas enzimas clave sobre los sustratos de interés en los fermentos de *S. thermophilus*, una especie que tradicionalmente se considera acidificante pero poco productora de aroma, característica cuyas causas resta dilucidar. Por otro lado, pueden plantearse los inconvenientes de las condiciones ambientales en el alimento para que estas enzimas puedan concretar su acción bioformadora de flavour; sin embargo tales impedimentos no se han verificado de manera tan contundente para enzimas similares de lactobacilos o de lactococos.

Sin duda, para correlacionar mejor las actividades enzimáticas con su influencia en el catabolismo de AA y producción de volátiles en alimentos, el estudio de las actividades enzimáticas debería validarse en un medio similar al de su aplicación, pero en el caso de *S. thermophilus* restan importantes interrogantes sobre los caminos metabólicos implicados y sus pasos limitantes. En este sentido, para centrarnos en el estudio de la formación de volátiles a través de una vía metabólica en particular, en el futuro recurriremos a medios más simples que la matriz del queso, como aquellos consistentes en mezclas de reacción: buffer con el agregado del aminoácido de interés.

La cooperación esperada entre *Lb. paracasei* 90 y *Lb. casei* 72 con *Streptococcus thermophilus* no resultó significativa, debido sobre todo a la falta de producción de  $\alpha$ -cetoglutarato por *S. thermophilus* en los extractos. Se detectaron solamente cambios mínimos atribuibles a la inoculación conjunta de lactobacilos y estreptococos en algunos compuestos volátiles, que reforzaron la influencia observada para los lactobacilos.



# *Conclusiones finales*

## Conclusiones finales

---

El presente trabajo de tesis permitió demostrar, a través del análisis bioinformático, que las cepas cuya información se encuentra disponible y se analizó, tanto del género *Lactobacillus* como de la especie *Streptococcus thermophilus* poseen genes que codifican enzimas clave implicadas en la formación de compuestos de aroma a partir del catabolismo de los aminoácidos. Asimismo, se han comprobado mediante ensayos bioquímicos diferentes niveles de actividad glutamato dehidrogenasa y se han caracterizado los perfiles de aminotransferasas en las cepas de BAL estudiadas, que incluyeron cepas de estreptococos termófilos y lactobacilos mesófilos y termófilos, fermentos de gran interés para su uso como cultivos primarios y adjuntos en queso. La caracterización de fermentos en cuanto a las actividades enzimáticas implicadas en la formación de compuestos de flavour posibilita la selección de los mismos en vistas a potenciar o direccionar la producción de volátiles hacia determinadas notas de aroma en quesos.

Por otro lado, en experiencias llevadas a cabo en medios simples, se ha verificado la efectividad de algunos de los tratamientos de atenuación aplicados a dos cepas de *S. thermophilus* en cuanto al incremento en la accesibilidad de enzimas intracelulares, aunque el efecto fue variable entre los tratamientos. De hecho, se pudieron clasificar los métodos de atenuación en dos grupos: i) los tratamientos con SDS y etanol resultaron ser estrategias adecuadas para obtener cultivos no viables, con sus membranas celulares parcialmente permeabilizadas, y con su maquinaria enzimática activa; mientras que ii) la aplicación de mutanolisina, disrupción mecánica y ultrasonido resultaron ser tratamientos adecuados para producir la lisis celular, con la consecuente obtención de un extracto celular con enzimas intracelulares liberadas al medio de tratamiento. En la segunda etapa de este estudio, se valoró la influencia de algunos de los tratamientos de atenuación ensayados en una de las cepas de *S. thermophilus* con el objetivo de lograr una influencia en el aroma de quesos. En los dos modelos estudiados, queso Cremoso miniatura y extracto de queso estéril, se pudieron verificar muy pocos cambios en la bioquímica de la maduración que pudieran atribuirse a los tratamientos de atenuación aplicados; esto fue comprobado a través de una gran gama de indicadores: lactosa, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos volátiles. Sin embargo, merece destacarse que aunque de reducida magnitud, algunos de los cambios se produjeron en compuestos claves implicados en la formación de compuestos de aroma, tales como el  $\alpha$ -cetoglutarato y el ácido pirúvico, así como también en algunos compuestos volátiles derivados de los aminoácidos. Los resultados obtenidos dejan en evidencia que la integridad celular de la cepa ensayada de *S. thermophilus* no es la principal causa de la baja producción de aroma en este tipo de quesos.

## *Conclusiones finales*

---

En la última etapa del trabajo de tesis, se pudo verificar una correlación entre el perfil de compuestos volátiles producidos por las cepas de lactobacilos con su perfil de actividad AT y el perfil de aminoácidos libres de la matriz. Estos resultados recalcan la importancia de aplicar el criterio del perfil de AT para la selección de cultivos adjuntos de lactobacilos, con el objetivo de intensificar el aroma e influir y direccionar la producción de compuestos volátiles derivados de los aminoácidos hacia un determinado perfil de aroma en el queso. En las experiencias realizadas para el estudio de una posible cooperación de cepas de lactobacilos y estreptococos, se observó que los cambios en los compuestos analizados fueron producidos principalmente por la actividad de las cepas de lactobacilos ensayadas, mientras que la influencia de *S. thermophilus* fue insignificante o reforzó mínimamente la tendencia marcada por los lactobacilos. Estos resultados refuerzan la importancia de las BAL no fermento o de los cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos en el aroma y la calidad de quesos elaborados únicamente con *S. thermophilus*.

Los resultados del presente trabajo destacan la complejidad del proceso de formación de aroma en el queso y reafirman la necesidad de profundizar la investigación dirigida al diseño racional de fermentos lácticos

# *Referencias*

## Referencias

---

- Adamberg, K.; Kask, S.; Laht, T. M. y Paalme, T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology* 85: 171-183.
- Afzal, M. I.; Boulahya, M. I.; Paris, C.; Delaunay, S. y Cailliez-Grimal, C. (2013). Effect of oxygen on the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism during batch culture in *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. *Journal of Dairy Science* 96: 352-359.
- Afzal, M. I.; Delaunay, S.; Paris, C.; Borges, F.; Revol-Junelles, A. M. y Cailliez-Grimal, C. (2012). Identification of metabolic pathways involved in the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism by *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. *International Journal of Food Microbiology* 157: 332-339.
- Agerkvist, I. y Enfors, S. -O. (1990). Characterization of *E. coli* cell disintegrates from a bead mill and high pressure homogenizers. *Biotechnology and Bioengineering* 36: 1083-1089.
- Aly, M. E. (1990). Utilization of freeze-shocked lactobacilli for enhancing flavour development of Ras cheese. *Die Nahrung* 34: 329-335.
- Aly, M. E. (1994). Flavour-enhancement of low-fat Kashkaval cheese using heat or freeze - shocked *Lactobacillus delbrueckii* var. *helveticus* cultures. *Die Nahrung* 38: 504-510.
- Amárita, F.; de la Plaza, M.; Fernandez de Palencia, P.; Requena, T. y Peláez, C. (2006). Cooperation between wild lactococcal strains for cheese aroma formation. *Food Chemistry* 94: 240-246.
- Amárita, F.; Requena, T.; Taborda, G.; Amigo, L. y Peláez, C. (2001). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. *Journal of Applied Microbiology* 90: 971-978.
- Anbukkarasi, K.; UmaMaheswari, T.; Hemalatha, T.; Nanda, D.; Singh, P.; Rashmi, H. M. y Singh, R. (2013). Production of low browning Mozzarella cheese: Screening and characterization of wild galactose fermenting *Streptococcus thermophilus* strains. *International Journal of Advanced Research* 1: 83-96.
- ANMAT (2013). Código Alimentario Argentino. Cap. VIII: Alimentos lácteos. En vigencia. <http://www.anmat.gov.ar>.

## Referencias

---

- Ardö, Y. (1999). Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. En: Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation Part 2. Ed. (Ardö, Y). Bulletin. IDF/FIL. N° 337. p 4-9.
- Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* 24: 238-242.
- Ardö, Y. M. y Varming, C. (2010). Bacterial influence on characteristic flavour of cheeses made with mesophilic DL-starter. *Australian Journal of Dairy Technology* 65: 153-158.
- Arora, G. y Lee, B. H. (1990). Comparative studies on peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. *Journal of Dairy Science* 73: 274-279.
- Atilas, M. W.; Dudley, E. G. y Steele, J. L. (2000). Gene cloning, sequencing, and inactivation of the branched-chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2325-2329.
- Axelsson, L.T. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En: Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Eds. (Salminen S., von Wright A., Ouwehand, A.). New York: Marcel Dekker, p 1.
- Ayad, E. H. E.; Verheul, A.; Wouters, J. T. M. y Smit, G. (2000). Application of wild starter cultures for favour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal* 10: 169-179.
- Ayad, E. H.; Verheul, A.; Engels, W. J.; Wouters, J. T. y Smit, G. (2001). Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology* 90: 59-67.
- Azarnia, S.; Lee, B. H.; St-Gelais, D.; Champagne, C. P. y Kilcawley, K. N. (2010). Effect of free or encapsulated recombinant aminopeptidase of *Lactobacillus rhamnosus* S93 on acceleration of cheddar cheese ripening. *Food Biotechnology* 24: 135-149.
- Azarnia, S.; Robert, N. y Lee, B. H. (2006). Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. *Critical Review of Biotechnology* 26: 121-143.
- Azizan, K. A.; Baharum, S. N.; Mohd Noor, N. (2012). Metabolic profiling of *Lactococcus lactis* under different culture conditions. *Molecules* 17: 8022-8036.
- Baldwin, C. V. y Robinson, W. R. (1994). Enhanced Disruption of *Candida utilis* Using Enzymatic Pretreatment and High-pressure Homogenization. *Biotechnology and Bioengineering* 43: 46-56

## Referencias

---

- Bandell, M.; Lhotte, M. E.; Marty-Teyssset, C.; Veyrat, A.; Prévost, H.; Dartois, V.; Diviès, C.; Konings, W. N. y Lolkema, J. S. (1998) Mechanism of citrate transporters in carbohydrate and citrate catabolism in *Lactococcus* and *Leuconostocs* species. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 159-1600.
- Banks, J. M.; Yvon, M.; Gripon, J. C.; de la Fuentea, M. A.; Brechanya, E. Y.; Williams, A. G. y Donald Muir, D. (2001). Enhancement of amino acid catabolism in Cheddar cheese using  $\alpha$ -ketoglutarate: amino acid degradation in relation to volatile compounds and aroma character. *International Dairy Journal* 11: 235-243.
- Barbieri, G.; Bolzoni, L.; Careri, M.; Mangia, A.; Parolari, G.; Spagnoli, S. y Virgili, R.(1994). Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1170-1176.
- Bartels, H. J., Johnson, M. E., y Olson, N. F. (1987). Accelerated ripening of Gouda cheese. II. Efect of freeze shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and favour development. *Milchwissenschaft* 42: 139-144.
- Beck, H. C. (2005). Branched-chain fatty acid biosynthesis in a branched-chain amino acid aminotransferase mutant of *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiology Letters* 243: 37-44.
- Beebyaanda, N.; Abrlova, M. y Kilcawley, K. N. (2013). Encapsulation of a lactic acid bacteria cell-free extract in liposomes and use in Cheddar cheese ripening. *Foods* 2: 100-119.
- Bender, G. R.; Sutton, S. V. y Marquis, R. E. (1986). Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infection and Immunity* 53: 331-338.
- Beresford, T. P. (2003). Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality, En: Dairy processing – Improving quality, Ed. (Smit G.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 448–469.
- Beresford, T. P. (2011). Citrate fermentation by lactic acid bacteria. En: Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3 Eds. (Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p 166-172.
- Beresford, T. P.; Fitzsimons, N. A.; Brennan, N. L. y Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11: 259-274.
- Bergamini, C. V. (2007). Influencia de la adición de bacterias probióticas sobre el perfil de proteólisis de quesos semiduros. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

## Referencias

---

- Bergamini, C. V. Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2006). Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal* 16: 856-866.
- Bergamini, C. V.; Peralta, G. H.; Milesi, M. M. y Hynes, E. R. (2013). Growth, survival and peptidolytic activity of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model. *Journal of Dairy Science* 96: 5465-5476.
- Bergamini, C. V.; Wolf, I. V.; Perotti, M. C. y Zalazar, C. A. (2010). Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research* 94: 79-89.
- Bernard, N.; Johnsen, K.; Gelpi, J. L.; Alvarez, J. A.; Ferain, T.; Garmyn, D.; Hols, P.; Cortes, A.; Clarke, A. R.; Holbrook, J. J. y Delcour, J. (1997). D-2-hydroxy-4-methylvalerate dehydrogenase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. II. Mutagenic analysis of catalytically important residues. *European Journal of Biochemistry* 244: 213-219.
- Bernard, N.; Johnson, K.; Ferain, T.; Garmyn, D.; Hols, P.; Holbrook, J. J. y Delcour, J. (1994). NAD-dependent D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Gene cloning and enzyme characterization. *European Journal of Biochemistry* 224: 439-446.
- Bertazzoni Minelli, E.; Benini, A.; Marzotto, M.; Sbarbati, A.; Ruzzenente, O.; Ferrario, R.; Hendriks, H. y Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* 14: 723-736.
- Bhandari, V. y Singh, H. (2011). Physical methods. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol.1 Eds. (Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p 248-255.
- Bintsis, T. y Robinson, R. K., (2004). A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry* 88: 435-441.
- Bintsis, T.; Vafopoulou-Mastrojiannaki, A.; Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R. K. (2003). Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from feta cheese brine. *Journal of Applied Microbiology* 95: 68-77.
- Bockelmann, W. (2010). Secondary cheese starter cultures. En: *Technology of cheesemaking*. Eds (Law, B. y Tamime, A. Y.), Blackwell Publishing Ltd. p 192-230.
- Boelrijk, A. E. M.; de Jong, C. y Smit, G. (2003). Flavour generation in dairy products. En: *Dairy processing improving quality*. Ed (Smit, G) CRC Press, Cambridge, Inglaterra, p 130-154.



## Referencias

---

- Bonnarme, P.; Psoni, L. y Spinnler, H. E. (2000). Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5514-5517.
- Bosset, J. O.; Collomb, M.; Sieber, R. y Liardon, R. (1994). The aroma composition of Swiss Gruyère cheese *FAM-Information* 280:1-34.
- Bourdat-Deschamps, M.; Le Bars, D.; Yvon, M. y Chapot-Chartier, M. -P. (2004). Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *International Dairy Journal* 14: 791-800.
- Boutrou, R.; Sepulchre, A.; Pitel, G.; Durier, C.; Vassal, L.; Gripon, J. C. y Monnet, V. (2008). Lactococcal lysis and curd proteolysis: two predictable events important for the development of cheese flavour. *International Dairy Journal* 8:609-616.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bradley, R. L.; Arnold, E.; Barbano, D. M.; Semerad, R. G.; Smith, D. E. y Vines, B. K. (1993). Chemical and physical methods. En: Standard methods for the examination of dairy product. Cap. 15. Ed. (Marshall, R.). American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos. p 433-531.
- Brandsma, J. B.; Floris, E.; Dijkstra, A. R. D.; Rijnen L.; Wouters, J. A. y Meijer, W. C. (2008). Natural diversity of aminotransferases and dehydrogenase activity in a large collection of *Lactococcus lactis* strains. *International Dairy Journal* 18: 1103-1108.
- Brasca, M.; Morandi, S.; Lodi, R. y Tamburini, A. (2007). Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 103 1516-1524.
- Briggiler-Marcó, M.; Capra, M. L.; Quiberoni, A.; Vinderola, G.; Reinheimer, J. A. y Hynes, E. (2007). Nonstarter *Lactobacillus* Strains as Adjunct Cultures for Cheese Making: In Vitro Characterization and Performance in Two Model Cheeses. *Journal of Dairy Science* 90: 4532-4542.
- Broadbent, J. R.; Budinich, M. F. y Steele, J. L. (2011). Non-Starter Lactic Acid Bacteria. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Eds. (Fuquay J., Fox P. F., McSweeney P. L. H.). Academic Press, UK. p 639-644.
- Broadbent, J. R.; Gummalla, S.; Hughes, J. E.; Johnson, M. E.; Rankin, S. A. y Drake, M. A. (2004). Overexpression of *Lactobacillus casei* D-hydroxyisocaproic acid

## Referencias

---

- dehydrogenase in cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4814-4820.
- Broadbent, J. R.; Hughes, J. E.; Welker, D. L.; Tompkins, T. A.; Steele, J. L. (2013). Complete genome sequence for *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, an industrial cheese starter and cheese flavor adjunct. *Genome Announcements* 1: doi:10.1128/genomeA.00590-13.
- Bude Ugarte, M.; Guglielmotti, D.; Giraffa, G.; Reinheimer, J. y Hynes, E. (2006). Nonstarter Lactobacilli Isolated from Soft and Semihard Argentinean Cheeses: Genetic Characterization and Resistance to Biological Barriers. *Journal of Food Protection* 69: 2983-2991
- Budinich M. F., Perez-Díaz I., Cai H., Rankin S. A., Broadbent J. R., Steele J. L. (2011). Growth of *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 in a cheese model system: A biochemical approach. *Journal of Dairy Science* 94: 5263-5277.
- Buffa, M.; Guamis, B.; Salado, J. y Trujillo A.J. (2004). Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *LWT - Food Science and Technology* 37: 247-253.
- Bunthof, C. J.; van den Braak, S.; Breeuwer, P.; Rombouts, F. M. y Abee, T (1999). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3681-3689.
- Bunthof, C. J.; van Schalkwijk, S.; Meijer, W.; Abee, T. y Hugenholtz, J. (2001). Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. *Applied and Environmental Microbiology*.67: 4264-4271.
- Burns, P.; Cuffia, F.; Milesi, M.; Vinderola, G.; Meinardi, C.; Sabbag, N. y Hynes, E. (2012). Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiology* 30: 45-50.
- Bury, D.; Jelen, P. y Kaláb, M. (2001). Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2: 23-29.
- Calandra, G. B. y Cole, R. M. (1980). Lysis and protoplast formation of group B Streptococci by Mutanolysin. *Infection and Immunity* 28: 1033-1037.
- Caldeo V. y McSweeney P.L.H. (2012) Changes in oxidation-reduction potential during the simulated manufacture of different cheese varieties. *International Dairy Journal* 25: 16-20.

## Referencias

---

- Carlson; A.; Singns, M.; Liermann, L.; Boor, R. y Jem K. J. (1995). Mechanical disruption of *Escherichia coli* for plasmid recovery. *Biotechnology and Bioengineering* 48: 303-315.
- Carunchia Whetstine, M. E.; Drake, M. A.; Broadbent, J. R. y McMahon, D. (2006). Enhanced nutty flavor formation in Cheddar cheese made with a malty *Lactococcus lactis* adjunct culture. *Journal of Dairy Science* 89: 3277-3284.
- Casey M. G.; Bosset, J. O.; Bütikofer, U. y Fröhlich-Wyder M. -T. (2004). Effect of  $\alpha$ -keto acids on the development of flavour in Swiss Gruyere-type cheese. *LWT-Food Science and Technology* 37: 269-273.
- Castillo, I.; Requena, T.; Fernandez de Palencia, P.; Fontecha, J. y Gobbetti, M. (1999). Isolation and characterization of an intracellular esterase from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731. *Journal of Applied Microbiology* 86: 653-659.
- Chambellon, E.; Rijnen, L.; Lorquet, F.; Gitton, C.; van Hylekama Vlieg, J. E.; Wouters, J. A. y Yvon, M. (2009). The D-2-Hydroxyacid Dehydrogenase Incorrectly Annotated PanE Is the Sole Reduction System for Branched-Chain 2-Keto Acids in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 191: 873-881.
- Champagne, C. P.; Gagnon, D.; St-Gelais, D. y Vuilleumard, J. C. (2009). Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. *International Dairy Journal* 19: 669-674.
- Champagne, C. P.; Ross, P. R.; Saarela, M.; Hansen, K. F. y Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology* 149: 185-193.
- Chapman, H. R. (1978). Direct vat inoculation of milk with freeze-dried starters for making Cheddar cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology* 31: 99-101.
- Chapot-Chartier, M. P.; Deniel, C.; Rousseau, M.; Vassal, L. y Gripon, J. C. (1994). Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *International Dairy Journal* 4: 251-269.
- Chavagnat, F.; Casey, M. G. y Meyer, J. (1999). Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3001-3007.
- Chaves, A. C. S. D.; Fernandez, M.; Lerayer, A. L. S.; Mierau, I.; Kleerebezem, M. y Hugenholtz J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5656-5662.

## Referencias

---

- Chen, Y. S.; Christensen, J. E.; Broadbent, J. R. y Steele, J. L. (2003). Identification and Characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an Endopeptidase with Post-Proline Specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1276-1282.
- Chisti, Y. y Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 194-204.
- Choi, Y. J.; Miguez, C. B. y Lee, B. H. (2004). Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3213-3221.
- Choonia, H. S. y Lele, S. S (2011).  $\beta$ -Galactosidase release kinetics during ultrasonic disruption of *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented Eleusine coracana. *Food and Bioproducts Processing* 89: 288-293.
- Christensen, J. E. Johnson, M. E. y Steele, J. L. (1995). Production of Cheddar Cheese Using a *Lactococcus lactis* ssp. cremoris SK11 Derivative with Enhanced Aminopeptidase Activity. *International Dairy Journal* 5: 361-319.
- Christensen, J. E.; Dudley, E. G.; Pederson, J. A. y Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 217-246.
- Christensen, J. E.; Johnson, M. E. y Steele, J. L. (1995). Production of cheddar cheese using a *Lactococcus lactis* ssp. cremoris SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *International Dairy Journal* 5: 367-379.
- Christensen, K. R. y Reineccius, G. A. (1995). Aroma extract dilution analysis of aged Cheddar cheese. *Journal of Food Science* 60: 218-220.
- Cocaign-Bousquet, M.; Garrigues, C.; Loubiere, P. y Lindley, N. D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 253-267.
- Cogan T. M. y Beresford T.P. (2002). Microbiology of Hard Cheese. En: Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products. Ed (Robinso, R. K.). New York, NY: John Wiley & Sons Inc. p 516-560.
- Cogan, T. M. (2011). Microbiology of Cheese. En: Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol.1 Eds. (Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p 625-631.
- Collins, Y. F.; McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2003a). Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Research* 70: 105-113.
- Collins, Y. F.; McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2003b). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13: 841-866.

## Referencias

---

- Collins, Y. F.; McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2004). Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology, Vol. 1: General aspects Eds. (Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T.) Academic Press, Estados Unidos, p. 377-390.
- Coolbear, T.; Pillidge, C. J. y Crow, V. L. (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starter bacteria. 1. Resistance to cell lysis and levels and cellular distribution of proteinase activities. *International Dairy Journal* 4: 697-721.
- Corrêa Lelles Nogueira, M.; Lubachevsky, G. y Rankin, S. A. (2005). A study of the volatile composition of Minas cheese. *LWT-Food Science and Technology* 38: 555-563.
- Corrieu, G. y Luquet, F. -M. (2007). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Courtin, P.; Monnet, V. y Rul, F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*. 148:3413-3421.
- Crow, V. L. (1986). Metabolism of aspartate by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*: effect on lactate fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 359-365.
- Crow, V. L.; Coolbear, T.; Gopal, P. K.; Martley, F. G.; McKay, L. L. y Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal* 5: 855-875.
- Crow, V. L.; Coolbear, T.; Holland, R.; Pritchard, G. G. y Martley, F. G., (1993a). Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *International Dairy Journal* 3: 423-446.
- Crow, V. L.; Holland R. y Coolbear, T. (1993b). Comparison of subcellular fractionation methods for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. *International Dairy Journal* 3: 599-611.
- Crow, V.; Curry, B. y Hayes, M. (2001). The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int. Dairy J.* 11:275-283.
- Curic, M.; Stuer-Lauridsen, B.; Renault, P. y Nilsson, D. (1999). A general method for selection of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase-deficient *Lactococcus lactis* mutants to improve diacetyl formation. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1202-1206.

## Referencias

---

- Curioni, P. M. G. y Bosset, J. O. (2002). Review: key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography- olfactometry. *International Dairy Journal* 12: 959-984.
- Curtin A. C. y McSweeney P. L. H. (2004). Catabolism of amino acids in cheese during ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects, 3rd edn, pp 435–454. Fox P F, McSweeney P L H, Cogan T M and Guinee T P, eds. London: Elsevier.
- Curtin, Á. C. y McSweeney, P. L. H. (2003). Catabolism of aromatic amino acids in cheese-related bacteria: aminotransferase and decarboxylase activities. *Journal of Dairy Research* 70: 249-252.
- Curtin, A. C.; De Angelis, M.; Cipriani, M.; Corbo, M. R.; McSweeney, P. L. H. y Gobbetti, M. (2001). Amino acid catabolism in cheese-related bacteria: selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology* 91: 312-321.
- Dacremont. C. y Vickers, Z. (1994). Concept matching technique for assessing importance of volatile compounds for Cheddar cheese aroma. *Journal of food science* 59: 981-985.
- Dako, E.; El Soda, M.; Vuilleumard, J. -C. y Simard, R. E. (1995). Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food Research International*. 28: 503-509.
- Dalié, D. K. D.; Deschamps, A. M. y Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21: 370-380.
- Dandoy, D.; Fremaux, C.; de Frahan, M. H; Horvath, P. Boyaval, P.; Hols, P. y Fontaine, L. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microbial cell Factories* 10:1-9.
- Daryaei, H.; Coventry, J.; Versteeg, C. y Sherkat, F. (2010). Effects of high pressure treatment on glycolytic enzymes of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11: 245-249.
- De Angelis, M.; Calasso, M.; Di Cagno, R.; Siragusa, S.; Minervini, F. y Gobbetti, M. (2010a). NADP-glutamate dehydrogenase activity in nonstarter lactic acid bacteria: effects of temperature, pH and NaCl on enzyme activity and expression. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1763-1774.

## Referencias

---

- De Angelis, M.; Siragusa, S.; Fontana, C.; Cappa, F.; Di Cagno, R.; Cocconcelli, P. y Gobbetti, (2010b). Glutamate dehydrogenase in non-starter lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* 65:185-188.
- de la Fuente, M. A.; Fontecha, J. y Juárez, M. (1993). Fatty acid composition of the triglyceride and free fatty acid fractions in different cows-, ewes-and goats-milk cheeses. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* 196: 155-158.
- de la Plaza, M.; Fernández de Palencia, P.; Peláez, C.; Requena, T., (2004). Biochemical and molecular characterization of  $\alpha$ -ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters* 238: 367-374.
- de Vin, F.; Rådström, P.; Herman, L. y De Vuyst, L. (2005). Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3659-3667.
- Deegan, L. H.; Cotter, P. D.; Hill, C. y Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16: 1058-1071.
- Delfini, C.; Gaia, P.; Bardi, L.; Mariscalco, G.; Contiero, M. y Pagliara, A. (1991). Production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzoic acid by yeasts and *Botrytis cinerea* isolated from grape musts and wines. *Vitis* 30: 253-263.
- Depouilly, A.; Dufrene, F.; Beuvier, É. y Berthier, F. (2004). Genotypic characterisation of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Le Lait* 84: 155-167.
- Desfossés-Foucault, E.; Dussault-Lepage, V.; Le Boucher, C.; Savard, P.; Lapointe, G. y Roy, D. (2012). Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. *Frontiers in Microbiology* 3: 1-11.
- Desmazeaud, M. (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait* 63: 267-316.
- Deutsch, S. -M. Ferain, T.; Delcour, J. y Lortal, S. (2002). Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* in Swiss cheeses and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. *International Dairy Journal* 12: 591-600.
- Deutsch, S.-M.; Mollé, D.; Gagnaire, V.; Piot, M.; Atlan, D. y Lortal, S. (2000). Hydrolysis of sequenced  $\beta$ -casein peptides provides new insight into peptidase activity from

## Referencias

---

- thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5360-5367.
- Di Cagno, R.; Quinto, M.; Corsetti, A.; Minervini, F.; Gobbetti, M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal* 16: 119-130.
- Ding, W. K. y Shah, N. P. (2009). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Food Microbiology and Safety* 74: M53-M61.
- Doolan, I. A. y Wilkinson, M. G. (2009). Comparison of the effects of various attenuation methods on cell permeability and accessibility of intracellular enzymes in *Lactococcus lactis* strains. *International Dairy Journal* 19: 215-221.
- Doolan, I. A. y Wilkinson, M. G. (2009). Comparison of the effects of various attenuation methods on cell permeability and accessibility of intracellular enzymes in *Lactococcus lactis* strains. *International Dairy Journal* 19: 215-221.
- Dudley, E. y Steele, J. L. (2001). *Lactococcus lactis* LM0230 contains a single aminotransferase involved in aspartate biosynthesis, which is essential for growth in milk. *Microbiology* 147: 215-224.
- Dupuis, C.; Corre, C. y Boyaval, P. (1993). Lipase and esterase activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4004-4009.
- El Abboudi, M.; Pandian, S.; Trepanier, G.; Simard, R. y Lee, B. (1991). Heat-shocked lactobacilli for acceleration of Cheddar cheese ripening. *Journal of Food Science* 56: 948-949.
- El Soda, M. A.; Hantira, A. A.; Ezzat, N. I. y El-Shafei, H. K. (1992). Accelerated ripening of Ras cheese using freeze-shocked mutant strains of *Lactobacillus casei*. *Food Chemistry* 44: 179-184.
- El-Din, B. B.; El-Soda, M. y Ezzat, N. (2002). Proteolytic, lipolytic and autolytic activities of enterococci strains isolated from Egyptian dairy products. *Le Lait* 82: 289-304.
- El-Kholy, W.; El-Soda, M.; Ezzat, N. y El shafei, H. (1998). Autolysis and intracellular enzyme release from cheese related dairy lactobacilli. *Le Lait* 78: 439-452.
- El-Shafei, H. (1994). Accelerated ripening of Ras cheese using cell free extract, freeze- and heat-shocked *Leuconostoc* spp. cultures. *Die Nahrung* 38: 599-605.



## Referencias

---

- El-Soda, M. A.; Hantira, A. A.; Ezzat, N. I. y El-Shafei, H. K. (1992). Accelerated ripening of Ras cheese using freeze-shocked mutant strains of *Lactobacillus casei*. *Food Chemistry* 44: 179-184.
- El-Soda, M.; El-Wahab, H. A.; Ezzat, N.; Desmazeaud, M. J. y Ismail, A. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of the Lactobacilli. II. Detection of the esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Le Lait* 66 431-443.
- El-Soda, M.; Madkor, S. A. y Tong, P. S. (2000). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: comparison between attenuated and not attenuated lactobacilli. *Milchwissenschaft* 55: 260-293.
- Engels, W. J. M. (1997) Volatile and non-volatile compounds in ripened cheese: Their formation and their contribution to flavour. Tesis Doctoral Wageningen, Landbouwniversiteit Wageningen.
- Engels, W. J. M.; Alting, A. C.; Arntz, M. M. T. G.; Gruppen, H.; Voragen, A. G. J.; Smit, G.; Visser, S. (2000). Partial purification and characterization of two aminotransferases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 involved in the catabolism of methionine and branched-chain amino acids. *International Dairy Journal* 10: 443-452.
- Exterkate, F. A. (2006). Controlled permeabilization of *Lactococcus lactis* cells as a means to study and influence cheese ripening processes. *International Dairy Journal* 16: 788-796.
- Exterkate, F. A.; Slangen, C. M. y Siezen, R. J. (2001). Effect of genetically modified *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinases with altered specificity on the course of casein degradation under cheese conditions. *International Dairy Journal* 11: 363-371.
- Faijes, M.; Mars, A. E. y Smid, E. J. (2007). Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories* 6: 1-8.
- FAO, (2013). FAO Statistical yearbook. World food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farkye, N. Y.; Madkor, S. A. y Atkins, H. G. (1995). Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *International Dairy Journal* 5: 115-725.
- Fennema, O. R. (1996). Food Chemistry. Ed 3°.

## Referencias

---

- Fenster, K. M.; Parkin, k. L. y Steele, J. L. (2000). Characterization of an arylesterase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Applied Microbiology* 88: 572-583.
- Fenton, D. M. (1982). Solvent treatment for  $\beta$ -D-galactosidase release from yeast cells. *Enzyme and Microbial Technology* 4: 229-232.
- Fernández de Palencia, P.; de la Plaza, M.; Amárita, F.; Requena T. y Peláez, C. (2006). Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 88-93.
- Fernández de Palencia, P.; de la Plaza, M.; Mohedano, M. L.; Martínez-Cuesta, M. C.; Requena T.; López, P. y Peláez, C. (2004). Enhancement of 2-methylbutanal formation in cheese by using a fluorescently tagged lactacin 3147 producing *Lactococcus lactis* strain. *International Journal of Food Microbiology* 93: 335-347.
- Fernández de Palencia, P.; Peláez, C.; Requena, T. y Martín-Hernández, M. C. (1995). Release and partial characterization of cell-envelope proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IFPL 359 and *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 isolated from raw goat's-milk cheese. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* 201: 87-90.
- Fernández Murga, M. L.; Pesce de Ruiz Holgado, A.; de Valdez, G. F. (2008). Influence of the incubation temperature on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 426-429.
- Fernández, M. y Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 32: 155-183.
- Fernandez-Espla, M. D. y Rul, F. (1999). PepS from *Streptococcus thermophilus*. A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *European Journal of Biochemistry* 263: 502-510.
- Fernandez-Espla, M. D.; Garault, P.; Monnet, V. y Rul, F. (2000). *Streptococcus thermophilus* Cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4772-4778.
- FIL-IDF (1982). Formaggio e formaggio fuso. determinazione della materia secca. Metodo di riferimento. N° 4:A. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, p 184-188.
- FIL-IDF (1993). Latte. determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento. N° 20:B. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, p 74-107.

## Referencias

---

- FIL-IDF (1997). Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en matière grasse. Guide de directives générales appliquées aux méthodes butyrométriques. Norme FIL Internationale 152:A 1997, Bruselas, Bélgica.
- Flint, S. H.; Brooks, J.; Bremer, P.; Walker, K. y Hausman, E. (2002). The resistance to heat of thermo-resistant streptococci attached to stainless steel in the presence of milk. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28: 134-136.
- Folkertsma, B.; Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal* 6: 1117-1134.
- Fornasari, M. E.; Rossetti, L.; Carminati, D. y Giraffa, G. (2006). Cultivability of *Streptococcus thermophilus* in Grana Padano cheese whey starters. *FEMS Microbiology Letters* 257: 139-144.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese. Manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* 72: 1379-1400.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2004). Cap. 1: Cheese: an overview. En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects Eds. (Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T.), Academic Press, Estados Unidos. p 1-18.
- Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M. y McSweeney, P. L. H. (2000). Fundamentals of Cheese Science; Cap. 11: Biochemistry of cheese ripening. Ed. (Fox, P. F.). Aspen publishers, Maryland, Estados Unidos. p 236-281.
- Franciosi, E.; Settanni, N.; Carlin, S.; Cavazza, A. y Poznanski, E. (2008). A factory-scale application of secondary adjunct cultures selected from lactic acid bacteria during Puzzone di Moena cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 91: 2981-2991.
- Ganesan, B.; Stuart, M. R. y Weimer, B. C. (2007). Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2498-2512.
- Gao, S. y Steele, J. L. (1998). Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. *Journal of Food Biochemistry* 22: 197-211.
- Gao, S.; Lewis, G. D.; Ashokkumar, M. y Hemar, Y. (2014). Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry* 21: 446-53.
- Gao, S.; Mooberry, E. S. y Steele, J. L. (1998). Use of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by lactococci. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4670-4675.

## Referencias

---

- Gao, S.; Oh, D. H.; Broadbent, I. R. Johnson, M. E. y Weimer, B. C. y Steele, J. L. (1997). Aromatic amino acid catabolism by lactococci. *Lait* 77: 371-381.
- Garault, P.; Le Bars, D.; Besset, C. y Monnet V. (2002). Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* 277:32-39.
- García-Cayuela, T.; Gómez de Cadiñanos, L. P.; Peláez, C. y Requena, T. (2012). Expression in *Lactococcus lactis* of functional genes related to amino acid catabolism and cheese aroma formation is influenced by branched chain amino acids. *International Journal of Food Microbiology* 159: 207-213.
- Garrido, F.; Banerjee, U. C.; Chisti, Y. y Moo-Young, M. (1994). Disruption of a recombinant yeast for the release of  $\beta$ -galactosidase. *Bioseparation* 4: 319-328.
- Garvie, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological Reviews* 44: 106-139.
- Gatti, M.; Trivisano, C.; Fabrizi, E.; Neviani, E. y Gardini, F. (2004). Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 182-190.
- Geciova, J.; Bury, D. y Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. *International Dairy Journal* 12: 541-553.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215-222.
- Giraffa, G.; Gatti, M.; Rossetti, L.; Senini, L. y Neviani, E. (2000). Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1259-1265.
- Gobbetti, M.; Smacchi, E. y Corsetti, A. (1997). Purification and characterization of a cell surface-associated esterase from *Lactobacillus fermentum* DT41. *International Dairy Journal* 7: 13-21.
- Gómez de Cadiñanos, L. P.; García-Cayuela, T.; Yvon, M.; Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C. y Requena, T. (2013). Inactivation of the panE Gene in *Lactococcus lactis* enhances formation of cheese aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 3503-3506.
- González de Llano, D. G.; Rodríguez, A. y Cuesta, P. (1996). Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 570-576.

## Referencias

---

- Gougedranche, H.; Ducruet, P.; Vachot, J. -C.; Pannetier, R. y Maubois, J. -L. (1986). Utilisation du lysozyme en tant qu'agent régulateur de l'affinage en fromagerie MMV. *Le Lait* 66: 189-206.
- Grappin, R. y Beuvier E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal* 7: 751-761.
- Griffith, R. y Hammond, G. (1989). Generation of Swiss cheese flavor components by the reaction of amino acids with carbonyl compounds. *Journal of Dairy Science* 72: 604-613.
- Griffiths, M. W. y Tellez, A. M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology* 4: 1-9.
- Gripon, J. C.; Desmazeaud, M. J.; Le Bars, D. y Bergère, J. L. (1975). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. – Influence de la présure commerciale. *Le Lait* 55: 502-516.
- Groot, M. N. N. y de Bont, J. A. M. (1998). Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3009-3013.
- Guerlava, P.; Izac, V. y Tholozan, J. -L. (1998). Comparison of different methods of cell lysis and protein measurements in *Clostridium perfringens*: application to the cell volume determination. *Current Microbiology* 36: 131-135.
- Guldfeldt, L. U.; Sørensen, K. L. Strøman, P.; Behrndt, H.; Williams, D. y Johansen, E. (2001). Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* 11: 373-382.
- Gummalla, S. y Broadbent, J. R. (2001). Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *Journal of Dairy Science* 84: 1011-1019.
- Gummalla, S. y Broadnet, J. R. (1999). Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavor adjuncts. *Journal of Dairy Science* 82: 2070-2077.
- Habibi-Najafi, M. B. y Lee, B. H. (1994). Proline-specific peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. *Journal of Dairy Science* 77: 385-392.
- Hamada, S.; Torii, M.; Kotani, S.; Masuda, N.; Ooshima, T.; Yokogawa, K. y Kawat, S. (1978). Lysis of *Streptococcus mutans* cells with mutanolysin, a lytic enzyme prepared from a culture liquor of *Streptomyces globisporus* 1829. *Archives of Oral Biology* 23: 543-549.

## Referencias

---

- Hammes, W. P. y Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: The prokaryotes, vol 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Eds. (Dworkin, M.F.S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H. y Stackebrandt, E.), Springer-Verlag, New York, NY. p 320-403.
- Hanniffy, S. B.; Peláez, C.; Martínez-Bartolomé, M. A.; Requena, T. y Martínez-Cuesta, M. C. (2009). Key enzymes involved in methionine catabolism by cheese lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 135: 223-230.
- Hannon, J. A.; Deutsch, S.-M.; Madec, M.-N.; Gassi, J.-Y.; Chapot-Chartier, M. -P. y Lortal, S. (2006a). Lysis of starters in UF cheeses: behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *International Dairy Journal* 16: 324-334.
- Hannon, J. A.; Kilcawley, K. N.; Wilkinson, M. G.; Delahunty, C. M. y Beresford, T. P. (2007). Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal* 17: 316-327.
- Hannon, J. A.; Lopez, C.; Madec, M. -N. y Lortal, S. (2006b). Altering renneting pH changes microstructure, cell distribution, and lysis of *Lactococcus lactis* AM2 in cheese made from ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science* 89: 812-823.
- Hannon, J. A.; Wilkinson, M. G.; Delahunty, C. M.; Wallace, J. M.; Morrissey, P. A. y Beresford, T. P. (2003). Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 13: 313-323.
- Hansen, B. V.; Houlberg, U. y Ardö, Y. (2001). Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal* 11: 225-233.
- Harvey, R. J. (1965). Damage to *Streptococcus Lactis* resulting from growth at low pH (1965). *Journal of Bacteriology* 60: 1330-1336.
- Hassan, A. N. y Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. En: Applied Dairy Microbiology. Eds (Marth, E. y Steele, J.). New York, Marcel Dekker. p 165.
- Hayes, C. M.; Yarlagadda, A. B.; Healy, C. S.; Hannon, J. A.; Doolan, I. A.; Wilkinson, M. G., McSweeney, P. L. H. y Kilcawley, K. N.(2011). Microfluidization as a mechanism to create attenuated LAB with enhanced metabolic and enzymatic activity. The Eighth Cheese Symposium Co. Cork, Ireland. 28 th & 29 th September, Moorepark, Fermoy.

## Referencias

---

- Helinck, S.; Le Bars, D.; Moreau, D. y Yvon, M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3855-3861.
- Hickey, D. K.; Kilcawley, K. N.; Beresford T. P.; Sheehan, E. M. y Wilkinson, M. G. (2007). Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 1: 9-17.
- Hickey, D. K.; Kilcawley, K. N.; Beresford, T. P.; Wilkinson, M. G. (2006). Starter bacteria are the prime agents of lipolysis in cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8229-8235.
- Hinks, E. T.; Daneo-Moore, L. y Braverman, S. (1978). Effects of temperature on the autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 136: 491-496.
- Høier, E.; Janzen, T.; Rattray, F.; Sørensen, K.; Børsting, M. W.; Brockmann, E. y Johansen, E. (1010). The Production, Application and Action of Lactic Cheese Starter Cultures. En: *Technology of Cheesemaking*. Eds (Law, B. y Tamime, A. Y.), Blackwell Publishing Ltd. p.166-189.
- Holland, R. (2011). *Leuconostoc* spp. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol.3 Eds. (Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p.138-142.
- Holland, R.; Liu, S. -Q.; Crow, V. L.; Delabre, M. -L.; Lubbers, M.; Bennet, M. y Norris, G. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour. *International Dairy Journal* 15: 711-718.
- Hols, P.; Hancy, F.; Fontaine, L.; Grossiord, B.; Prozzi, D.; Leblond-Bourget, N.; Decaris, B.; Bolotin, A.; Delorme, C.; Ehrlich, S. D.; Guédon, E.; Monnet, W.; Renault, P. y Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 435-463.
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 165-78.
- Hummel, W. y Kula, M. -R. (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *European Journal of Biochemistry* 184: 1-13.
- Hummel, W.; Schütte, H. y Kula, M. -R. (1985). D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. A new enzyme suitable for stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21: 7-15.

## Referencias

---

- Husson-Kao, C., Mengaud, J. Gripon, J. -C.; Benbadis, L. y Chapot-Chartier, M. -P. (1999). The autolysis of *S. thermophilus* DN-001065 is triggered by several food-grade environmental signals. *International Dairy Journal* 9: 715-723.
- Husson-Kao, C.; Mengaud, J.; Cesselin, B.; van Sinderen, D.; Benbadis, L. y Chapot-Chartier, M. -P. (2000). The *Streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from a leaky prophage. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 558-565.
- Hutkins, R. W. (2001). Metabolism of starter cultures. En: Applied Dairy Microbiology. Eds (Marth, E. y Steele, J.), New York, Marcel Dekker. p 207-242.
- Hutkins, R. W. (2006). Microorganisms and metabolism. En: Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing. Cap 2. p 15-66.
- Hutkins, R. W. y Nannen, N. L. (1993). pH Homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 76: 2354-2365.
- Hynes, E. R.; Meinardi, C. A.; Sabbag, N.; Cattaneo, T.; Candiotti, M. C.; y Zalazar, C. A. (2001). Influence of milk-clotting enzyme concentration on the  $\alpha$ S1-casein hydrolysis during Soft cheeses ripening. *Journal of Dairy Science* 84: 1335-1340.
- Hynes, E.; Bach, C.; Lamberet, G.; Ogier, J. -C.; Son, O. y Delacroix-Buchet, A. (2003). Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese. *Le Lait* 83: 31-43.
- Hynes, E.; Ogier, J. C. Lamberet, G. y Delacroix-Buchet, A. (2002). Influence of starter and adjunct lactobacilli culture on ripening of miniature washed-curd cheeses. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19: 397-402.
- Hynes, E.; Ogier, J. C. y Delacroix-Buchet, A. (2000). Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal* 10: 733-737.
- Irigoyen, A.; Ortigosa, M.; Juansaras, I.; Oneca, M. y Torre, P. (2007). Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewes-milk cheese. *Food Chemistry* 100: 71-80.
- Ismail, B. y Nielsen, S. S. (2011). Plasmin System in Milk. En: Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 2 Eds. (Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.), Academic Press, Reino Unido. p. 308-313.
- Izco, J. M.; Tormo, M. y Jiménez-Flores, R. (2002). Development of a CE method to analyze organic acids in dairy products: Application to study the metabolism of heat-shocked spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1765-1773.



## Referencias

---

- Jelén, H. (2011). Food flavors: chemical, sensory and technological properties. CRC Press. p 125.
- Jem, K. M. (2002). Mechanical disruption of bacterial cell for plasmid recovery. Patente US 6455287 B1.
- Jensen, M. P. y Ardö, Y. (2010). Variation in aminopeptidase and aminotransferase activities of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *International Dairy Journal* 20: 149-155.
- Johnston K.A.; Barclay A. B. y Honoré C. (2010) A brief history of innovation in New Zealand cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology* Special issue: Cheese science 2010 Proceedings, 65: 122-127.
- Joutsjoki, V.; Luoma, S.; Tamminen, M.; Kilpi, M.; Johansen, R. y Palva. A, (2002). Recombinant *Lactococcus* starters as a potential source of additional peptidolytic activity in cheese ripening. *Journal of Applied Microbiology* 92:1159-1166.
- Kailasapathy, K. y Lam, S. H. (2005). Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journa* 15: 929-939.
- Kaminarides, S.; Stamou, P. y Massouras, T. (2007). Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. *Food Chemistry* 100: 219-225.
- Kämpfer, P. (1995). An efficient method for preparation of extracts from Gram-positive bacteria for comparison of cellular protein patterns. *Journal of Microbiological Methods* 21: 55-60.
- Kananen, S. y Ardö, Y. (2011). Hydroxy acid dehydrogenase activities of cheese relevant *Lactobacillus helveticus* strains. 8th Cheese Symposium, Cork.
- Kandarakis, Y. G. y Moschopoulou, E. E. (1998). Effect of starters on gross and microbiological composition and organoleptic characteristics of Graviera Kritis cheese. *Le Lait*. 78: 557-568.
- Kang, O. J.; Vézinz, L. -P.; Laberge, S. y Simard, R. E. (1998). Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science* 81: 639-646.
- Keব্য, K. M. K.; Salem, O. M.; Hamed, A. I. y El-Sisi, A. S. (1997). Flavour enhancement of direct acidified Kareish cheese using attenuated lactic acid bacteria. *Food Research International* 30: 265-272.

## Referencias

---

- Kenny, O.; FitzGerald, R. J.; O’Cuinn, G.; Beresford, T y Jordan, K. (2006). Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* 16: 797-804.
- Khalid, N. M. y Marth, E. H. (1990). Proteolytic activity by Strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science* 73: 3068-3076.
- Khalid, N. M.; El Soda, M. y Marth, E. H. (1990). Esterases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus. *Journal of Dairy Science* 73: 2711-2719.
- Kheadr-Ehab, E.; Vuillemand, J. C. y El-Deeb, S. A. (2000). Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. *International Journal of Food Science and Technology* 35: 483-495.
- Kiani, H.; Sun, D. -W.; Zhang, Z.; Al-Rubeai, M. y Naciri, M. (2013). Ultrasound-assisted freezing of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*: the freezing process and cell viability. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 18: 138-144.
- Kiernan, R. C.; Beresford, T. P.; O’Cuinn, G y Jordan, K. N. (2000). Autolysis of lactobacilli during cheeddar cheese ripening. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 39: 95-106.
- Kieronczyk, A., S. Skeie, T. Langsrud, and M. Yvon. (2003). Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 734-739.
- Kieronczyk, A.; Cachon, R.; Feron, G. y Yvon, M. (2006). Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1114-1122.
- Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Langsrud, T.; Le Bars, D. y Yvon, M. (2004). The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *International Dairy Journal* 14: 227-235.
- Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Olsen, K. y Langsrud, T. (2001). Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. *International Dairy Journal* 11: 217-224.
- Kilcawley, K. N.; Nongonierma , A. B.; Hannon,J. A.; Doolan, I. A. y Wilkinson, M. G. (2012). Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* 26: 50-57.
- Kilstrup, M.; Hammer, K.; Jensen, P. R. y Martinussen, J. (2005). Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 555-590.

## Referencias

---

- Kleerebezema, J.; Hols, P. y Hugenholtz, J. (2000). Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology* 26:840-848.
- Klein, N. y Lortal, S. (1999). Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening - a review. *International Dairy Journal* 9: 751-762.
- Klein, N.; Maillard, M.-B.; Thierry, A. y Lortal, S. (2001). Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Applied Microbiology* 91: 404-411.
- Kobayashi, J.; Shimizu, Y. ; Mutaguchi, Y.; Doi, K. y Ohshima, T. (2013). Characterization of d-amino acid aminotransferase from *Lactobacillus salivarius*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 94: 15-22.
- Kocaoglu-Vurma, N. A.; Harper, W. J.; Drake, M. A. y Courtney, P. D. (2008). Microbiological, chemical, and sensory characteristics of Swiss cheese manufactured with adjunct *Lactobacillus* strains using a low cooking temperature. *Journal of Dairy Science* 91: 2947-2959.
- Kolthoff, I. M.; Sandell, E. B.; Meehan, E. J. y Bruckenstein, S. (1988). Análisis químico cuantitativo; Cap. 40: Titulaciones por precipitación. Argentimetría. NIGAR, Buenos Aires, Argentina, p 823-830.
- Kourkoutas, Y.; Kandylis, P.; Panas, P.; Dooley, J. S. G.; Nigam, P. y Koutinas, A. A. (2006). Evaluation of freeze-dried kefir coculture as starter in feta-type cheese production. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6124-6135.
- Krebs, H. A. (1942). The effect of inorganic salts on the ketone decomposition of oxaloacetic acid. *Biochemical Journal* 36: 303-305.
- Kreft, M. E. y Jelen, P.; (2000). Stability and activity of  $\beta$ -galactosidase in sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 as affected by temperature and ionic environments. *Journal of Food Science* 65: 1364-1368.
- Kreft, M. E.; Roth, L. y Jelen P. (2001). Lactose hydrolysing ability of sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842. *Le Lait* 81: 355-364.
- Krueger, J. M.; Pabst, M. J.; Cyuela, C.; Degivry, M. -C. y Hartley, D. (2002). Administering bacteria to improve sleep. Patente US006444203B2.
- Lahtvee, P. J.; Adamberg, K.; Arike, L.; Nahku, R.; Aller, K. y Vilu, R. (2011). Multi-omics approach to study the growth efficiency and amino acid metabolism in *Lactococcus lactis* at various specific growth rates. *Microbial Cell Factories* 10: 1-12.

## Referencias

---

- Langsrud, T.; Landaas, A. y Castberg, H. B. (1987). Autolytic properties of different strains of group N streptococci. *Milchwissenschaft* 42: 556-560.
- Lapujade, P.; Coccain-Bousquet, M. y Loubiere, P. (1998). Glutamate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2485-2489.
- Larroure, C.; Ardaillon, V.; Pépin M. y Montel, M. C. (2000). Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology* 17: 563-570.
- Law, B. A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *International Dairy Journal* 11: 383-398.
- Law, B. A. (2010). Cheese-ripening and cheese flavour technology. En: Technology of Cheesemaking. Eds (Law, B. y Tamime, A. Y.), Blackwell Publishing Ltd. p. 231-259.
- Law, J.; Fitzgerald, G. F.; Uniacke-Lowe, T.; Daly, C. y Fox, P. F. (1993). The contribution of lactococcal starter proteinases to proteolysis in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 79: 2455-2467.
- Le Bars, D. y Yvon, M. (2008). Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *Journal of Applied Microbiology* 104: 171-177.
- Leclercq-Perlat, M. N.; Picque, D.; Riahi, H. y Corrieu, G. (2006). Microbiological and biochemical aspects of Camembert-type cheeses depend on atmospheric composition in the ripening chamber. *Journal of Dairy Science* 89: 3260-3273.
- Lee, B. H.; Kilcawley, K. N.; Hannon, J. A.; Park, S. Y.; Wilkinson, M.G. y Beresford, T. P. (2007). The use of viable and heat-shocked *Lactobacillus helveticus* DPC 4571 in enzyme-modified cheese production. *Food Biotechnology* 21: 129-143.
- Lees G. J. y Jago G. R. (1978). Role of acetaldehyde in metabolism: a review 2. the metabolism of acetaldehyde in cultured dairy products. *Journal of Dairy Science* 61: 1216-1224.
- Lemee, R.; Lortal, S.; Cesselin, B. y van Heijenoort, J. (1994). Involvement of an N-cetylglucosaminidase in autolysis of *propionibacterium freudenreichii* CNRZ 725. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4351-4358.
- Lerch, H.-P.; Blocker, H.; Kallwass, H.; Hoppe, J.; Tsai, H. y Collins, J. (1989). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase gene of *Lactobacillus casei*. *Gene* 78: 47-57.

## Referencias

---

- Letort, C.; Nardi, M.; Garault, P.; Monnet, V. y Juillard, V. (2002). Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3162-3165.
- Liu, M.; Bayjanov, J.R.; Renckens, B.; Nauta, A., y Siezen, R.J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* 11: 1-15
- Liu, M.; Nauta, A.; Francke, C. y Siezen, R. J. (2008). Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4590-4600.
- Liu, S. -Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 83: 115-131.
- Liu, S. -Q., Baker, K.; Bennett, M.; Holland, R. Norris, G. y Crow, V. L. (2004). Characterisation of esterases of *Streptococcus thermophilus* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. *International Dairy Journal* 14: 865-870.
- Liu, S. -Q.; Holland, R y Crow, V. L. (2003a). The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *International Journal of Food Microbiology* 86: 257-269.
- Liu, S. -Q.; Holland, R. y Crow, V. L. (2001). Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus* ST1", *International Dairy Journal* 11: 27-35.
- Liu, S. -Q.; Holland, R.; McJarrow, P.; Crow, V. L. (2003b). Serine metabolism in *Lactobacillus plantarum*, tienen en general los genes necesarios para formar compuestos aromáticos a partir del catabolismo de los aminoácidos. *International Journal of Food Microbiology* 89: 265-273.
- Lortal, S.; Lemée, R. y Valence, F. (1997). Autolysis of thermophilic lactobacilli and dairy propionibacteria: a review. *Le Lait* 77: 135-150.
- Lues, J. F. R. y Bekker, A. C. M. (2002). Mathematical expressions for organic acids in early ripening of a Cheddar cheese. *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 11-17.
- Lynch C. M.; McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1997). Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Le Lait* 77: 441-459.

## Referencias

---

- Macedo, A. C.; Vieira, M.; Pocas, R.; Malcata, X. F. (2000). Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* 10: 769-774.
- Malone, A. S.; Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2002). Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4357-4363.
- Malone, A. S.; Wick, C.; Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2003). High pressure effects on proteolytic and glycolytic enzymes involved in cheese manufacturing. *Journal of Dairy Science* 86: 1139-1146.
- Marilley, L. y Casey M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90: 139-159.
- Martínez-Cuesta C, Peláez C, Requena T. (2003). Lacticin 3147 favours isoleucine transamination by *Lactococcus lactis* IFPL359 in a cheese-model system. *Biotechnology Letters* 25: 599-602.
- Martínez-Cuesta, C.; Requena, T. y Peláez, C. (2002). Effect of bacteriocin-induced cell damage on the branched-chain amino acid transamination by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters* 217: 109-113.
- Martínez-Cuesta, M. C.; Fernández de Palencia, P.; Requena, T.; Peláez, C. (1998). Enhancement of proteolysis by a *Lactococcus lactis* bacteriocin producer in a cheese model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3863-3867.
- Martínez-Cuesta, M. C.; Requena, T.; Peláez, C. (2006a). Cell membrane damage induced by lacticin 3147 enhances aldehyde formation in *Lactococcus lactis* IFPL730. *International Journal of Food Microbiology* 109: 198-204.
- Martínez-Cuesta, M. C.; Requena, T.; Peláez, C. (2006b). Permeabilization and lysis induced by bacteriocins and its effect on aldehyde formation by *Lactococcus lactis*. *Biotechnology Letters* 28: 1573-1580.
- Martínez-Cuesta, M.; Peláez, C. y Requena, T. (2011). Formación de aroma en queso por bacterias lácticas. Principales rutas metabólicas. Ed. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC). <http://digital.csic.es/handle/10261/63995>.
- Martínez-Cuesta, M.; Peláez, C. y Requena, T. (2013). Methionine metabolism: major pathways and enzymes involved and strategies for control and diversification of volatile sulfur compounds in cheese. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53: 366-385

## Referencias

---

- Marty-Teyssset, C.; Lolkema, J. S.; Schmitt, P.; Diviès, C. y Konings, W. N. (1996). The citrate metabolic pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: expression, amino acid synthesis, and alpha-ketocarboxylate transport. *Journal of Bacteriology* 178: 6209-6215.
- Matzdorf, B.; Cuppett, S. L.; Keeler, L. J.; Hutkins, R. W. (1994). Browning of Mozzarella cheese during high temperature pizza baking. *Journal of Dairy Science* 77: 2850-2853.
- Mayerhoff, Z., Franco, T. T. y Roberto, I. C. (2008). A study of cell disruption of *Candida mogii* by glass bead mill for the recovery of xylose reductase. *Separation and Purification Technology* 63: 706-709.
- Mazé, A.; Boël, G.; Zúñiga, M.; Bourand, A.; Loux, V.; Yebra, M. J.; Monedero, V.; Correia, K.; Jacques, N.; Beaufils, S.; Poncet, S.; Joyet, P.; Milohanic, E.; Casarégola, S.; Auffray, Y.; Pérez-Martínez, G.; Gibrat, J. F.; Zagorec, M.; Francke, C.; Hartke, A. y Deutscher, J. (2005). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of Bacteriology* 193: 3160-3161.
- McDonnell, G. y Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 147-179.
- McGarry, A.; Law, J.; Coffey, A.; Daly, C.; Fox, P. F. y Fitzgerald, G. F. (1994). Effect of genetically modifying the lactococcal proteolytic system on ripening and flavor development in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4226-4233.
- McGregor, J. U. y White, C. H. (1990). Effect of enzyme treatment and ultrafiltration on the quality of lowfat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 73: 571-578.
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57:127-144,
- McSweeney, P. L. H. (2011). Biochemistry of Cheese Ripening. En: Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol.1 Eds. (Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p 667-675.
- McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects; Cap. 14.2: Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate Eds. (Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. y Guinee, T.). Academic Press, Estados Unidos, p 361-371.
- McSweeney, P. L. H. y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Le Lait*. 80: 293-324.

## Referencias

---

- Mena, B. y Aryana, L. J. (2012). Influence of ethanol on probiotic and culture bacteria *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* within a therapeutic product. *Open Journal of Medical Microbiology* 2: 70-76.
- MGAP, (2013). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Michel, V. y Martley, F. G. (2001). *Streptococcus thermophilus* in cheddar cheese--production and fate of galactose. *Journal of Dairy Research* 68: 317-25.
- Middelberg, A. P. J (1955). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotchenology Advances* 13: 491-551.
- Milesi, M. M. (2009). Desarrollo de fermentos adjuntos para quesería a partir de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Milesi, M. M. Bergamini, C. V. y Hynes, E. (2011). Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses. *Food Research International* 44: 765-773.
- Milesi, M. M.; Candiotti, M. y Hynes, E. (2007). Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheesemaking and ripening. *LWT- Food Science and Technology* 40: 1427-1433.
- Milesi, M. M.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V. y Hynes, E. R. (2010). Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *Journal of Dairy Science* 93: 5020-5031.
- Miller, J. H. (1972). Assay of  $\beta$ -galactosidase. En: Experiments in molecular genetics Ed. (Miller, J. H.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory. p 352-355.
- Milo, C. y Reineccius, G. A. (1997) Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3590–3594.
- Misono, H.; Goto, N. y Nagazaki, S. (1985). Purification, crystallisation, and properties of NADP<sup>+</sup>-specific glutamate dehydrogenase from *Lactobacillus fermentum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 117-123.
- Molloy, E. M.; Hill, C.; Cotter, P. D. y Ross, R. P. (2011). Bacteriocins. En: Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1 Eds. (Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p 420-429.



## Referencias

---

- Moncada, M. y Aryana, K. J. (2012). Influence of “mild” sonication conditions on the characteristics of *Streptococcus thermophilus* ST-M5. *Advances in Microbiology* 2: 8-16.
- Moncada, M.; Aryana, K. J. y Boeneke, C. (2012). Effect of mild sonication conditions on the attributes of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12. *Advances in Microbiology* 2: 104-111.
- Monnet, V.; Nardi, M.; Chopin, A.; Chopin, M. C. y Gripon, J. C. (1994). Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 32070-32076.
- Morgan, M. E.; O’Sullivan, L.; Ross, R. P.; y Hill, C. (2002). The design of a three strain starter system for Cheddar cheese manufacture exploiting bacteriocin-induced starter lysis. *International Dairy Journal* 12: 985-993.
- Morgan, S., Ross, R. P., Hill, C. (1997). Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *Journal of Dairy Science* 80: 1-10.
- Morishita, T. y Yajima, M. (1995). Incomplete operation of biosynthetic and bioenergetic functions of the citric acid cycle in multiple auxotrophic lactobacilli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 251-255.
- Morita, H.; Yoshikawa, H.; Sakata, R.; Nagata, Y. y Tanaka, H. (1997). Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology* 179: 7812-7815.
- Mukhopadhyay, S. N. (2012). Cell biology and microbiology. En: *Process Biotechnology: theory and practice*. Cap 3. p 95-128.
- Mukhurjee, K. K. y Hutkins, R. W. (1994). Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 77: 2839-2849
- Nannen, N. L. y Hutkins, R. W. (1993). Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 74: 741-746.
- Nantet, B. (1994). *Le goût du fromage*. Ramma- rion, París.
- Nardi, M.; Fiez-Vandal, C.; Tailliez, P. y Monnet, V. (2002). The EstA esterase is responsible for the main capacity of *Lactococcus lactis* to synthesize short chain fatty acid esters in vitro. *Journal of Applied Microbiology* 93:994-1002.
- Niven, G. W. y Mulholland, F. (1998). Cell membrane integrity and lysis in *Lactococcus lactis*: the detection of a population of permeable cells in post logarithmic phase cultures. *Journal of Applied Microbiology* 84: 90-96.

## Referencias

---

- Nongonierma, A. B.; Abrlova, M.; Kilcawley, K. N. (2013). Encapsulation of a lactic acid bacteria cell-free extract in liposomes and use in Cheddar cheese ripening. *Foods* 2: 100-119.
- Nosova, T; Joisimies-Somer, H.; Jokelainen, K.; Heine, R., y Salaspuro (2000). *Alcohol & Alcoholism* 35: 561-568.
- Novak, L.; Cocaign-Bousquet, M.; Lindley, N. D. y Loubiere, P. (1997). Metabolism and energetics of *Lactococcus lactis* during growth in complex or synthetic media. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2665-2670.
- Novelli, G. y Reichardt, J. K. V. (2000). Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism* 71: 62-65.
- O'Donovan, C. M.; Wilkinson, M. G.; Guinee T. P. y Fox, P. F. (1996). An investigation of the autolytic properties of three lactococcal strains during cheese ripening. *International Dairy Journal* 6: 1149-1165.
- O'Reilly C. E.; O'Connor, P. M.; Murphy, P. M. y Kelly, A. L. (2002). Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 12: 915-922.
- O'Sullivan, L.; Ross, R. P. y Hill, C. (2003). A lacticin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. *Journal of Applied Microbiology* 95: 1235-1241.
- Olsen, M. J. y Pérez-Díaz, I. M. (2009). Influence of microbial growth on the redox potential of fermented cucumbers. *Journal of Food Science* 74: 149-153.
- Osborne; J. P.; Mira de Ordunña, R.; Pilone, G. J. y Liu, S.-Q. (2000). Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 191: 51-55
- Østdal, H.; Andersen, H. J. y Nielsen, J. H. (2000). Antioxidative activity of urate in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5588-5592.
- Ouvry, A.; Waché, Y.; Tourdot-Maréchal, R.; Diviès, C. y Cachon, R. (2002). Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* 214: 257-261.
- Palomino, M. M. (2011). Modificaciones en la envoltura de *Lactobacillus casei* durante el crecimiento bajo estrés osmótico. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

## Referencias

---

- Park, Y. W. (2009). Bioactive components in goat milk. En: Bioactive components in milk and dairy products. John Wiley & Sons, Ltd. P 43-81.
- Pastink, M. I., Sieuwerts, S.; de Bok, F. A. M.; Janssen, P. W. M.; Teusink, B.; van Hylckama Vlieg, J. E. T. y Hugenholtz, J. (2008). Genomics and high-throughput screening approaches for optimal flavour production in dairy fermentation. *International Dairy Journal* 18: 781-789.
- Pawliszyn, J (1999). Applications of Solid Phase Microextraction. RSC, Cambridge, U.K., p 375.
- Pedersen, T. B.; Ristagno, D.; McSweeney, P. L. H.; Vogensen, F. K. y Ardö, Y. (2013). Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *International Dairy Journal* 33: 112-119.
- Peralta, G. H.; Wolf, I.V.; Bergamini, C. V. y Perotti, M. C. y Hynes, E. R. (2014). Evaluation of volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* I90 in a hard-cooked cheese model using solid-phase microextraction. *Dairy Science & Technology* 94: 73-81.
- Perotti, M. C.; Bernal, S. M.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (2005). Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal* 15: 1150-1155.
- Pertsemlidis, A. y Fondon, J. W. (2001). Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy) Alexander Pertsemlidis and John W Fondon III. *Genome Biology* 2: 1-10.
- Peterson, S. D.; Marshall, R. T.; Heymann, H. (1990). Peptidase profiling of lactobacilli associated with cheddar cheese and its application to identification and selection of strains for cheese-ripening studies. *Journal of Dairy Science* 73: 1454-1464.
- Petterson, H.-E., y Sjöström, G. (1975). Accelerated cheese ripening: a method for increasing the number of lactic starter bacteria in cheese without detrimental effect to the cheese-making process, and its effect on the cheese ripening. *Journal of Dairy Research* 42:313-326.
- Picque, D.; Leclercq-Perlat; M. N.; Guillemin, H.; Perret, B.; Cattenoz, T. Provost, J. J. y Corrieu, G. (2010). Camembert-type cheese ripening dynamics are changed by the properties of wrapping films. *Journal of Dairy Science* 93: 5601-5612.
- Pieterse, B.; Leer, R. J. Schuren, F. H. J. y van der Werf M. J. (2005). Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* 151: 3881-3894.

## Referencias

---

- Piuri, M.; Sanchez-Rivas, C. y Ruzal, S. M. (2005). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology* 98: 84-95.
- Poolman, B. (2002). Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 147-164.
- Portnoi, P. A. y MacDonald, A. (2009). Determination of the lactose and galactose content of cheese for use in the galactosaemia diet. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 22: 400-408.
- Prasad, J.; McJarrow, P. y Gopal, P. (2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 917-925.
- Preedy, V. R.; Watson, R. R. y Pate, V. B. (2013). Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences. Wageningen Academic Publishers, Netherlands p 309.
- Pudlik, A. M. y Lolkema, J. S. (2011). Mechanism of citrate metabolism by an oxaloacetate decarboxylase-deficient mutant of *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of Bacteriology* 193: 4049-4056.
- Pudlik, A. M. y Lolkema, J. S. (2012). Rerouting citrate metabolism in *Lactococcus lactis* to citrate-driven transamination. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6665–6673.
- Quiberoni, A.; Candiotti, M. C.; Meinardi, C. A.; Palma, S. y Reinheimer, J., (1997). Selección y utilización de mutantes espontáneos fagorresistentes de *Lactobacillus helveticus* en quesería. *Revista Argentina de Lactología* 15: 13-34.
- Quiberoni, A.; Stiefel, J. I. y Reinheimer, J. A. (2000). Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol. *Journal of Applied Microbiology* 89: 1059-1065.
- Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. y Reinheimer, J. (2005). Nuevas y clásicas bacterias causantes de defectos gasógenos en quesos blandos y semiduros argentinos. *Revista Argentina de Lactología*. 23:19.32.
- Quintans, N. G.; Blancato, V.; Repizo, G., Magni C. y López, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. En: Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications, Eds (Mayo, M.; López, P. y Pérez-Martínez, G. p.65-88.

## Referencias

---

- Raddadi, N.; Cherif, A.; Mora, D.; Ouzari, H.; Boudabous, A.; Molinari, F. y Daffonchio, D. (2004). The autolytic phenotype of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 97: 158-168.
- Rajagopal, S. N. y Sandine W. E. (1990). Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science* 73: 894-899.
- Rastogi, S. C.; Mendiratta, N. y Rastogi, P. (2008). Bioinformatics methods and applications: genomics proteomics and drug discovery. PHI Learning Private Limited, New Delhi. p 5.
- Reinheimer, J. A., Binetti, A. G., Quiberoni, A., Bailo, N. B., Rubiolo, A., Giraffa, G., (1997). Natural milk cultures for the production of Argentinian cheeses. *Journal of Food Protection* 60: 59-63.
- Reinheimer, J., Suárez, V.; Bailo, N.; y Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinean hard cheese production. *Journal of Food Protection* 54: 796-799.
- Reinheimer, J.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. y Suárez, V. (1996). The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina on hard cheese production. *International Dairy Journal* 6:869-879.
- Ricci-Silva, M. E.; Vitolo, M. y Abrahao-Neto, J. A. (2000). Protein and glucose 6-phosphate dehydrogenase releasing from baker's yeast cells disrupted by a vertical bead mill. *Process Biochemistry* 35: 831-835.
- Riebel, B. y Hummel, W. (2001). Antibody-supported screening of alcohol dehydrogenases. *Biotechnology Letters* 23: 231-234.
- Rijnen, L.; Bonneau, S.; y Yvon, M. (1999). Genetic characterization of the major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4873-4880.
- Rijnen, L.; Courtin, P.; Gripon, J. C. y Yvon, M. (2000). Expression of a heterologous glutamate dehydrogenase gene in *Lactococcus lactis* highly improves the conversion of amino acids to aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1354-1359.
- Rijnen, L.; Yvon, M.; van Kranenburg, R.; Courtina, P.; Verheul, A.; Chambellon, E. y Smit, G.(2003). Lactococcal aminotransferases AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. *International Dairy Journal* 13: 805-812.

## Referencias

---

- Roudot-Algaron, F. y Yvon, M. (1998). Le catabolisme des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée chez *Lactococcus lactis*. *Le Lait* 78: 23-30.
- Rul, F. y Monnet, V. (1997) Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology* 82: 695-704.
- Ruysen, T. (2012). Quality control of sodium-reduced Gouda-type cheese production through the addition of adjunct cultures. IDF Cheese Ripening & Technology Symposium.
- Sable, S. y Cottenceau, G. (1999). Current knowledge of soft cheeses flavor and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4825-4836.
- Sakakibara, M.; Wang, D.; Ikeda, K. y Suzuki, K. (1994). Effect of ultrasonic irradiation on production of fermented milk with *Lactobacillus delbrueckii*. *Ultrasonics Sonochemistry* 1: 107-110.
- Savijoki, K.; Ingmer, H. y Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:394-406.
- Schütte, H.; Hummel, W. y Kula, M. -R. (1984). L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase - A new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19: 167-176.
- Scott, W. J. (1953). Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C. *Australian Journal of Biological Sciences* 6: 549-556.
- Settanni, L. y Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* 27: 691-697.
- Shah, N. P. y Lankaputhra, W. E. V. (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. *International Dairy Journal* 7: 349-356.
- Shahbal, S.; Hemme, D. y Renault, P. (1993). Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-strains. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 177-182.
- Shay, B. J.; Egan, A. F.; Wright, M. y Rogers, P. J. (1998). Cysteine metabolism in an isolate of *Lactobacillus sake*: Plasmid composition and cysteine transport. *FEMS Microbiology Letters* 56: 183-188.
- Sheehan, A.; O' Cuinn, G.; FitzGerald, R. J. y Wilkinson, M. G. (2006). Proteolytic enzyme activities in Cheddar cheese juice made using lactococcal starters of differing autolytic properties. *Journal of Applied Microbiology* 100: 893-901.

## Referencias

---

- Sheehan, A.; O'Loughlin, C.; O'Cuinn, G.; Fitzgerald, R. J. y Wilkinson, M. G., (2005). Cheddar cheese cooking temperature induces differential lactococcal cell permeabilization and autolytic responses as detected by flow cytometry: implications for intracellular enzyme accessibility. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1007-1016.
- Sieber, R.; Bosset, J. O. y Biitikofer, U. (1995). Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *International Dairy journal* 5: 227-246.
- Singh, T. K.; Drake, M. A. y Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2: 139-162.
- Sinz, Q. y Schwab, W. (2012). Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. *Food Microbiology* 29: 215-223.
- Skeie, S.; Kieronczyk, A.; Eidet, S.; Reitan, M, Olsen, K. y Østlie, H. (2008a). Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagine and aspartate in a washed-curd cheese. *International Dairy Journal* 18: 169-177.
- Skeie, S.; Kieronczyk, A.; Næss, R. M. y Østlie, H. (2008b). *Lactobacillus* adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese. *International Dairy Journal* 18 158-168.
- Slattery, L.; O'Callaghan, J.; Fitzgerald G. F.; Beresford, T.; Ross, R. P. (1010). Invited review: *Lactobacillus helveticus* - A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science* 93: 4435-4454.
- Smeianov, V. V.; Wechter, P.; Broadbent, J. R.; Hughes, J. E.; Rodríguez, B. T.; Christensen, T. K. Ardö, Y. y Steele, J. L. (2007). Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2661-2672.
- Smit, B. A.; Engels, W. J. M. y Smit, G. (2009). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 987-999.
- Smit, B. A.; Engels, W. J. M.; Alewijn, M.; Lommerse, G. T. C. A.; Kippersluijs, E. A. H.; Wouters, J. T. M. y Smit, G. (2004a). Chemical conversion of  $\alpha$ -keto acids in relation to flavor formation in fermented foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1263-1268.

## Referencias

---

- Smit, B. A.; Engels, W. J. M.; Wouters, J. T. M. y Smit, G. (2004b). Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 396-402.
- Smit, B. A.; Engels, W. J.; Bruinsma, J.; van Hylckama Vlieg J. E.; Wouters, J. T. y Smit, G. (2004c). Development of a high throughput screening method to test flavour-forming capabilities of anaerobic micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 97: 306-313.
- Smit, G.; Smit, B. A. y Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 591-610
- Smith, M. R., Browning, P. D., y Pawlett, D. (2003). Cheese ripening process. Patente US 6649200 B2.
- Somkuti, G, Mary E. Dominiecki, Dennis H. Steinberg (1996). Sensitivity of *Streptococcus thermophilus* to chemical permeabilization. *Current Microbiology* 32: 101-105.
- Somkuti, G. A. y Steinberg D. H. (1994). Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and the expression of  $\beta$ -galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 573-576.
- Somkuti, G. A.; Dominiecki, M. E. y Steinberg, D. H. (1998). Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with ethanol. *Current Microbiology*. 36:202-206.
- Somkuti, G. A.; Steinberg, D. H. (1995). Permeabilized *Streptococcus thermophilus* in the preparation of low lactose milk. *Biotechnology and applied biochemistry* 21: 23-29.
- Sørensen, H. (2005). Boletín-IDF: The world Market for Cheese 1995-2004. *Bulletin of the International Dairy Federation*. p 8-32.
- Starrenburg, M. J. C. y Hugenholtz, J. (1991). Citrate Fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3535-3540.
- Stelwagen, K (2011). Lactose. En: Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3 Eds. (Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p 367-372.
- St-Gelais, D. y Haché, S. (2006). Growth of proteinase-positive and proteinase-negative lactococci strains in reconstituted goat and cow milks. *Le Lait* 86: 373-386.
- St-Gelais, D.; Lessard, J.; Champagne, C. P. y Vuilleumard, J. -C. (2009). Production of fresh Cheddar cheese curds with controlled postacidification and enhanced flavor. *Journal of Dairy Science*. 92: 1856-1863.



## Referencias

---

- Stiles, M. E. y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.
- Stokes, D.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F. y Coffey, A. (2001). Application of *Streptococcus thermophilus* DPC1842 as an adjunct to counteract bacteriophage disruption in a predominantly lactococcal Cheddar cheese starter: use in bulk starter culture systems. *Le Lait* 81: 327-334.
- Sulaimana, A. Z.; Ajit, A.; Yunus, R. M. y Chisti, Y. (2011). Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. *Biochemical Engineering Journal* 54: 141-150.
- Surburg, H. y Panten, J. (2006). Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses. 5th Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p 127.
- Suzuki, I.; Kato, S.; Kitada, T.; Yano, N. y Morichi, T. (1986). Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 2. characteristics of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides, and nucleic acid synthesis. *Journal of Dairy Science* 69: 971-978.
- Tabatabaie, F y Mortazavi, S. A. (2010). Effects of ultrasound treatment on viability and autolysis of starter bacteria in hard cheese. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 8: 301-304.
- Taïbi, A.; Dabour, N.; Lamoureux, M.; Roy, D. y LaPointe, G. (2011). Comparative transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains under conditions simulating Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 146: 263-275.
- Tammam, J. D.; Williams, A. G.; Noble y Lloyd, D. (2000). Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology* 30: 370-374.
- Tanous, C.; Kieronczyk, A.; Helinck, S.; Chambellon, E. y Yvon, M. (2002). Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 271-278.
- Tanous, C; Gori, A.; Rijnen, L.; Chambellon, E. y Yvon M. (2005). Pathways for  $\alpha$ -ketoglutarate formation by *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 15: 759-770.
- Tavaria, F. K. Dahl, S. Carballo, F. J. y Malcata, F. X. (2002). Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 85: 2462–2470.

## Referencias

---

- Thage, B. V.; Broe, M. L.; Petersen, M. H., Petersen, M. A, Bennedsen, M. y Ardö, Y. (2005) Aroma development in semihard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. *International Dairy Journal* 15: 795-805.
- Thage, B. V.; Houlberg, U. y Ardö, Y. (2004a). Amino acid transamination in permeabilised cells of *Lactobacillus helveticus*, *Lb. paracasei* and *Lb. danicus*. *Journal of Dairy Research* 71:461-470.
- Thage, B. V.; Rattray, F. P.; Laustsen, M. W.; Ardo, Y.; Barkholt, V. y Houlberg, U. (2004b). Purification and characterization of a branched-chain amino acid aminotransferase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHCC 2115. *Journal of Applied Microbiology* 96: 593-602.
- Thomas, S.; Besset, C.; Courtin, P. y Rul, F. (2010). The role of aminopeptidase PepS in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition. *Journal of Applied Microbiology* 108: 148-157.
- Tjener, K.; Stahnke, L. H.; Andersen, L. y Martinussen, J. (2004). Addition of  $\alpha$ -ketoglutarate enhances formation of volatiles by *Staphylococcus carnosus* during sausage fermentation. *Meat Science* 67: 711-719.
- Tormo, M. y Izco, J. M. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A* 1033: 305-310.
- Trépanier, G.; Abboudi, M.; Lee, B.H. y Simar R. E. (1992). Accelerated maturation of Cheddar cheese: microbiology of cheeses supplemented with *Lactobacillus casei* subsp. *casei* L2A. *Journal of Food Science* 57: 345-349.
- Upadhyay, V. K. y McSweeney, P. L. H. (2003). Acceleration of cheese ripening. En: Dairy processing. Improving quality Cap. 1 Ed. (Smit, G.). CRC Press, Cambridge, Inglaterra, p 419-441.
- Upadhyay, V. K.; Huppertz, T.; Kelly, A. L. y McSweeney, P. L. H. (2007). Use of high pressure treatment to attenuate starter bacteria for use as adjuncts for Cheddar cheese manufacture. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 485-492.
- Upadhyay, V. K.; McSweeney, P. L. H.; Magboul, A. A. A. y Fox, P. F. (2004). Proteolysis in cheese during ripening. En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects, Eds. (Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M. y Guinee, T. P.), p 392-433.

## Referencias

---

- Upreti, P.; McKay, L. L. y Metzger, L. E. (2006). Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening. *Journal of Dairy Science* 89: 429-443.
- Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal* 5: 877-903.
- Urbach, G. (1997). The chemical and biochemical basis of cheese and milk aroma. En: *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Blackie Academic and Professional, London, p 253-298.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. (1996). Esterase activities of cell-free extracts from 'wild' strains of leuconostocs and heterofermentative lactobacilli isolated from traditional Greek cheese. *Letters in Applied Microbiology* 23: 367-370.
- Valence, F.; Deutsch S.-M.; Richoux; R; Gagnaire, V.y Lortal, S. (2000). Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Research* 261-271.
- van den Bogaard, P. T. C. (2002). Catabolite control of sugar metabolism in *Streptococcus thermophilus*. Tesis doctoral. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Van Kranenburg, R.; Kleerebezem, M.; van Hylckama Vlieg, J. E. T.; Ursing, B. M.; Boekhorst, J.; Smit, B. A., Ayad, E. H. E.; Smit, G. y Siezen, R. J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: Predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12: 111-121.
- Vanigelgem, F.; Zamfir, M.; Adriany, T. y De Vuyst, L. (2004). Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1257-1273.
- Vanigelgem, F.; Zamfir, M.; Mozzi, F.; Adriany, T.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; De Vuyst, L. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 900-912.
- Vermeulen, N.; Ganzle, M. G. y Vogel, R. F. (2006). Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*

## Referencias

---

- DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3832-3839.
- Vermeulen, N.; Gänzle, M. G. y Vogel, R. F. (2007). Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1197-1205.
- Vinderola, C. G. y Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904.
- Vogels, G. D. y van der Drift (1976). Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriological Reviews* 40: 403-468.
- Wallace, J. M. y Fox, P. F. (1997). Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *International Dairy Journal* 7: 157-167.
- Wang, D. y Sakakibara, M. (1997). Lactose hydrolysis and 13-galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrasonics Sonochemistry* 4: 255-261.
- Wilkinson, M. G. (1993). Acceleration of cheese ripening. En: *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Ed. (Fox, P. F.), Vol. 1 London, UK: Chapman and Hall. p 523-556.
- Wilkinson, M. G. y Kilcawley, K. N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes in to cheese during ripening. *International Dairy Journal* 15: 817-830.
- Wilkinson, M. G.; Guinee, T. P. y Fox, P. F. (1994). Factors which may influence the determination of autolysis of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* 4: 141-160.
- Williams, A. G. y Banks, J. M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal* 7: 763-774.
- Williams, A. G.; Noble, J. y Banks, J. M. (2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 11: 203-215.
- Williams, A. G.; Noble, J. y Banks, J. M. (2004). The effect of  $\alpha$ -ketoglutaric acid on amino acid utilization by nonstarter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheeses. *Letters in Applied Microbiology* 38: 289-295.
- Williams, A. G.; Noble, J.; Tammam, J.; Lloyd, D. y Banks, J. M. (2002). Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter

## Referencias

---

- lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 12: 841-852.
- Williams, A. G.; Withers, S. E.; Brechany, E. Y.; y Banks, J. M. (2006). Glutamate dehydrogenase activity in lactobacilli and the use of glutamate dehydrogenase-producing adjunct *Lactobacillus* spp. cultures in the manufacture of cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1062-1075.
- Wittenberger, C. y Angelo, N. (1970). Purification and properties of a fructose-1,6-diphosphate-activated lactate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* 101: 717-724.
- Woldringh, C. L. (1970). Lysis of the cell membrane of *Escherichia coli* K12 by ionic detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* 224: 288-290.
- Woldringh, C. L. (1973). Effects of toluene and phenethyl alcohol on the ultrastructure of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 114: 1359-1361.
- Woldringh, C. L. y van Iterson, W. (1972). Effects of treatment with sodium dodecyl Sulfate on the ultrastructure of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 111: 801-813.
- Wolf, I. V. (2009). Estudio de compuestos de aroma y sabor en quesos argentinos. Tesis de Doctorado en Química en la Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Woodrow, J. R. y Quirk, A. V. (1982). Evaluation of the potential of a bead mill for the release of intracellular bacterial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 4: 385-389.
- Yebra M. J.; Viana, R.; Monedero, V.; Deutscher J. y Pérez-Martínez G. (2004). An esterase gene from *Lactobacillus casei* cotranscribed with genes encoding a phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and regulated by a LevR-like activator and  $\sigma^{54}$  factor. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 8: 117-128.
- Yvon, M. (2006). Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* 61: 16-24.
- Yvon, M., y Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11: 185-201.
- Yvon, M.; Berthelot, S. y Gripon, J. C. (1998). Adding  $\alpha$ -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal* 8: 889-898.

## Referencias

---

- Yvon, M.; Chambellon, E.; Bolotin, A. y Roudot-Algaron, F. (2000). Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris NCDO 763. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 571-577.
- Yvon, M.; Thirouin, S.; Rijnen, L.; Fromentier, D. y Gripon, J. C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 414-419.
- Yvon, M.; y Gripon, J. C. (2003). Use of keto acid to enhance the flavoro of cheese products. Patente US 6,586,025 B2.
- Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A. y Hynes, E. (1999). Quesos típicos argentinos: Una revisión general sobre producción y características; Cap. 3: Los quesos argentinos. Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, p 20-49.
- Zalazar, C.; Candiotti, M.; Mercanti, D.; Bergamini, C. y Meinardi, C. (2007). Maduración de quesos y su control. En: Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de Quesos. Eds. (Reinheimer, J. A. y Zalazar, C. A.). Sección V; Cap. 1: Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina, p 117-243.
- Zhang, C. y Gänzle, M. G. (2010). Metabolic pathway of  $\alpha$  -ketoglutarate in *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Lactobacillus reuteri* during sourdough fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1301-1310.
- Zhang, Y.; Chien, M. y Ho, C. T. (1988). Comparison of the volatile compounds obtained from thermal degradation of cysteine and glutathione in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 992-996.
- Zotta, T.; Ricciardi, A.; Ciocia, F.; Rossano, R. y Parente, E. (2008a). Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci. *International Journal of Food Microbiology* 124: 34-42.
- Zotta, T.; Ricciardi, A.; Rossano, R. y Parente, E (2008b). Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* 25: 113-119.