



INLAIN

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis desarrollada en el

INSTITUTO DE LACTOLOGÍA INDUSTRIAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“DESARROLLO DE FERMENTOS ADJUNTOS PARA QUESERÍA A PARTIR DE BACTERIAS LÁCTICAS NO PERTENECIENTES AL FERMENTO”

Autora: BIOQ. MARÍA MERCEDES MILESI

Directora: DRA. ERICA HYNES

Co-director: ING. CARLOS ZALAZAR

Tesis presentada para optar por el grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

SANTA FE

- 2008 -

**JURADOS DESIGNADOS PARA LA EVALUACIÓN
DE LA PRESENTE TESIS**

TITULARES

Dra. Noemí Zaritzky

Dra. Silvia González

Dra. Susana Zorrilla

SUPLENTE

Dra. Marina Etcheverrigaray

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que contribuyeron con la realización de este trabajo de tesis.

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

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Universidad Nacional del Litoral, 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 mi directora Erica Hynes, a quien debo mi formación profesional, por la confianza depositada y el asesoramiento brindado en mis primeros pasos en la investigación.

A Carlos Zalazar, mi co-director, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN).

Al grupo de microbiología del INLAIN, por la paciencia y el soporte brindado, especialmente a Jorge Reinheimer por ceder gentilmente las cepas que fueron estudiadas y por permitirme trabajar en su laboratorio, y a Andrea Quiberoni por su calidez, su apoyo y su constante predisposición para disipar mis dudas sobre temas relacionados a la microbiología de los productos lácteos.

A Carina Bergamini, por su compañerismo y su infinita paciencia e invaluable ayuda en la aplicación de técnicas de laboratorio y en el uso del HPLC.

A Diego Mercanti, Mario Candiotti y Carlos Meinardi, por su colaboración en las elaboraciones de queso a escala piloto, por su cordialidad y los buenos momentos compartidos.

A Nora Sabbag y su grupo de panelistas, por el análisis sensorial de los quesos Cremoso y Pategrás elaborados a escala piloto.

Al Programa Alβan (Programa de la Unión Europea de Becas de Alto Nivel para América Latina), por el otorgamiento de la beca doctoral que hizo posible la realización de un trabajo de investigación en la Universidad Nacional de Irlanda y por el sustento económico.

A Paul McSweeney, supervisor de la beca doctoral en Irlanda, por la confianza depositada, por sus enseñanzas y por haberme brindado la posibilidad de trabajar en su laboratorio. A su grupo de trabajo, en especial a Kevin, Marvin, Nidhi y Jim, por su generosidad, compañerismo y ayuda.

A la firma Milkaut S. A., por la donación de la leche y del suero fermento utilizados en la presente tesis.

A los integrantes del INLAIN, por el compañerismo y la cordialidad de todos y cada uno, que hicieron profundamente grato trabajar cada día en el Instituto. En especial, a Diego, Daniela y Verónica, por su ayuda y aliento en todo momento y por la hermosa amistad que tenemos.

A los amigos de la vida, necesarios siempre; especialmente a Carolina Cicotello por su apoyo y comprensión.

A mi abuela, mi madre y mis hermanos, por su amor, apoyo incondicional y comprensión. Por contar con ellos siempre.

A mi padre, por su ejemplo y porque gracias a sus consejos decidí orientar mi carrera hacia la investigación científica.

Finalmente, quiero agradecer de manera muy especial a Damian, quien me ha acompañado todos estos años con gran amor y paciencia, apoyándome y alentándome en los momentos de incertidumbre, porque sin su apoyo todos mis logros no hubiesen sido posibles.

Publicaciones

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

Publicaciones en revistas internacionales

Milesi, M. M.; Candiotti, M.; Hynes, E. (2007). *Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening*. LWT – Food Science and Technology, 40:1427-1433.

Milesi, M. M.; McSweeney, P. L. H.; Hynes, E. R. (2008). *Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of Lactobacillus plantarum in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type*. Journal of Applied Microbiology, 105:884-892.

Milesi, M. M.; McSweeney, P. L. H.; Hynes, E. R. (2008). *Impact of chymosin- and plasmin-mediated primary proteolysis on the growth and biochemical activities of lactobacilli in miniature Cheddar-type cheeses*. Journal of Dairy Science, 91:3277–3290.

Publicaciones en revistas nacionales

Milesi, M. M., Hynes, E., McSweeney, P. L. H. (2008). *Incremento de la actividad de plasmina por adición de plasminógeno-uroquinasa, y su influencia en el perfil proteolítico de queso Cheddar miniatura*. Revista Argentina de Lactología, N° 25, 43-55.

Publicación de trabajos completos en proceedings o actas de congresos

Mercanti, D. J.; Milesi, M. M.; Hynes, E. *Fermentos de lactobacilos mesófilos para quesería*. Publicación en el 9° Congreso Panamericano de la Leche. Puerto Alegre, Río Grande del Sur, Brasil, 20 al 23 de Junio de 2006.

Milesi, M. *Bacterias lácticas no fermento y calidad de quesos*. Publicación en las XIV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades “Grupo Montevideo”. Campinas, San Pablo, Brasil, 13 al 15 de Setiembre de 2006.

Milesi, M. M.; McSweeney, P. L. H.; Hynes, E. *Influencia de la actividad de cuajo y plasmina en la microbiota y la proteólisis secundaria de quesos Cheddar miniatura*. Publicación en el XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina, 12 al 14 de Setiembre de 2007.

Milesi, M. M.; Meinardi, C. A.; Sabbag, N.; Palma, S.; Hynes, E. *Impacto de fermentos adjuntos de lactobacilos en la proteólisis y las características sensoriales de quesos de pasta blanda y semidura*. Publicación en el XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina, 12 al 14 de Setiembre de 2007.

Resumen

La maduración del queso es un proceso complejo de naturaleza fundamentalmente enzimática que involucra los grupos de reacciones de proteólisis y lipólisis, y el metabolismo de los carbohidratos. La proteólisis es el evento bioquímico cuantitativamente más importante en la mayoría de las variedades de queso, y está mediada principalmente por los siguientes agentes: **i)** coagulante, **ii)** plasmina, **iii)** fermento primario y **iv)** bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB).

Las NSLAB son microorganismos adventicios que crecen espontáneamente en todos los quesos, ya sea en aquellos obtenidos en ambientes industriales y elaborados con leche pasteurizada, como en los productos artesanales de leche cruda. La flora no fermento de los quesos elaborados con leche pasteurizada está constituida fundamentalmente por lactobacilos mesófilos, pero se han detectado también pediococos, micrococos y *Leuconostoc* spp. Este grupo microbiano proviene de la leche cruda y de la planta láctea, se desarrolla durante la maduración desde recuentos muy bajos (10^2 - 10^4 UFC/g queso en prensa) hasta valores superiores a 10^6 UFC/g, y puede convertirse en la microflora dominante en el queso.

Los efectos de las NSLAB en el queso pueden ser positivos, negativos o neutros, según las especies y cepas predominantes y el número que alcancen en el producto. Se ha comprobado que producen un incremento en los niveles de aminoácidos libres, y pueden intensificar el *flavor*, aunque también son capaces de isomerizar el L-lactato a D-lactato, generar *off-flavors* y/o sobreacidificación, y formar aberturas, fenómenos que muchas veces son indeseables. En quesería industrial, la flora NSLAB es el único factor no controlado, y podría ser la causa de aproximadamente el 80% de los defectos. Los quesos completamente libres de NSLAB no son una alternativa para superar este problema, ya que sólo pueden obtenerse en condiciones de laboratorio, y además se ha comprobado que desarrollan un sabor muy suave. En este contexto, la estrategia más aceptada para responder a dos aspectos contrapuestos como lo son, el requerimiento de las NSLAB para el desarrollo de un *flavor* maduro, y los defectos indeseables causados por algunas NSLAB adventicias, consiste en el empleo de fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos en las elaboraciones de quesos. Estos fermentos son cultivos de cepas de NSLAB seleccionadas, que se adicionan a la leche de elaboración con un propósito diferente a la acidificación. Dichas cepas se aíslan de quesos de buena calidad, con características sensoriales favorables y ningún defecto, y se caracterizan desde el punto de

vista tecnológico mediante ensayos *in vitro* e *in situ*. Los fermentos adjuntos, para ser adecuados, no deben contribuir a la acidificación durante la elaboración del queso, deben crecer rápidamente en la cuajada, alcanzar altas densidades al comienzo de la maduración y mantener altos recuentos ($\sim 10^7 - 10^8$ UFC/g). Asimismo, deben producir un balance de efectos deseables y ningún defecto en el producto final. Su principal objetivo está dirigido a controlar el crecimiento de la microflora adventicia potencialmente perjudicial, con la finalidad de obtener productos de calidad satisfactoria y constante. También pueden ser empleados para acelerar la maduración y/o contribuir al desarrollo de compuestos de aroma y sabor con notas más intensas y distintivas. Asimismo, algunas cepas de *Lactobacillus* aisladas de queso, se han identificado como candidatas probióticas.

En la primera etapa del presente trabajo de tesis, se implementaron y validaron dos modelos experimentales obtenidos en condiciones asépticas, a saber, queso Cremoso miniatura y pasta o extracto soluble de queso Reggianito, con el objetivo de obtener ecosistemas simples que presentaran condiciones medioambientales similares a los quesos de pasta blanda y de pasta dura, respectivamente. Para ello, se valoró la reproducibilidad y aplicabilidad de estos sistemas modelos, a través de su caracterización química y microbiológica (capítulo 1). En el caso del modelo de queso Cremoso miniatura, se demostró que las curvas de pH durante la elaboración, la composición global, y los perfiles proteolíticos y sensoriales, fueron semejantes a los del queso Cremoso convencional, con lo que el modelo resultó ser representativo de la matriz alimentaria real. Asimismo, la tecnología de elaboración a escala miniatura fue efectiva para obtener unidades experimentales repetitivas y reproducibles, y la aplicación de condiciones de asepsia en el proceso de elaboración y maduración, permitió controlar el crecimiento de los lactobacilos adventicios, como así también, de la microflora no láctica, durante tiempos prolongados. Para el diseño de los modelos experimentales representativos de quesos duros se obtuvieron pastas y extractos solubles de queso Reggianito; las primeras se sometieron a tratamiento térmico mientras que los segundos se esterilizaron por filtración. El extracto soluble de queso Reggianito demostró ser el modelo experimental más apropiado, ya que presentó una composición química similar a la fase acuosa del alimento que representa y logró esterilizarse de manera eficaz, sin recurrir a tratamientos térmicos intensos.

Los dos modelos experimentales diseñados, quesos Cremoso miniatura y extractos solubles de queso Reggianito, fueron utilizados para caracterizar desde un punto de vista tecnológico las cepas seleccionadas de lactobacilos mesófilos, a fin de evaluar su aptitud como cultivos adjuntos en elaboraciones de queso.

En el modelo de queso Cremoso miniatura, se investigó la contribución de dos cepas de lactobacilos mesófilos aisladas de queso - *Lactobacillus plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 - a los perfiles de proteólisis y a la calidad sensorial de quesos blandos. Además, se evaluó la supervivencia de dichas cepas en las condiciones medioambientales que prevalecen en el producto, y su interacción con el fermento primario termófilo empleado en la elaboración (capítulo 2). Para ello, se realizaron experiencias de elaboraciones de quesos; los quesos controles contenían solamente el fermento primario de *Streptococcus thermophilus*, y los quesos experimentales fueron inoculados además con *Lb. plantarum* I91 o *Lb. casei* I90 como cultivos adjuntos. Durante la elaboración se estudió la evolución del pH de los quesos, y durante la maduración se llevaron a cabo los análisis de composición global, recuentos microbiológicos (fermento primario, fermento adjunto, lactobacilos adventicios, coliformes, hongos y levaduras), estudio de la proteólisis (fraccionamiento nitrogenado, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa de los perfiles peptídicos y de aminoácidos libres) y análisis sensorial del aroma (ensayo sensorial triangular simple). La adición de las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 no modificó los valores de pH de los quesos durante la elaboración, ni introdujo cambios en la composición global. En ambas experiencias, la población del fermento primario alcanzó niveles similares en quesos controles y con agregado de cultivos adjuntos, lo que indicó que las cepas ensayadas no interfirieron en el crecimiento y supervivencia del *S. thermophilus*. Asimismo, ambas cepas crecieron rápidamente en la cuajada alcanzando valores de 10^8 - 10^9 UFC/g durante la maduración, y mostraron una supervivencia favorable. Los quesos elaborados con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 exhibieron recuentos de coliformes y de hongos y levaduras inferiores a los de sus respectivos controles, lo que indicó que dichas cepas fueron efectivas en controlar el desarrollo de la microflora indeseable. Los adjuntos no influyeron en los niveles de nitrógeno en las distintas fracciones, ni contribuyeron a la hidrólisis de las caseínas intactas (proteólisis primaria) durante la maduración, pero causaron notables modificaciones en los perfiles peptídicos, e incrementaron el contenido total de aminoácidos y de ciertos aminoácidos libres individuales. Los cambios observados fueron consecuentes con la aceleración de la proteólisis secundaria durante la maduración, la que a su vez fue mayor en los quesos inoculados con *Lb. plantarum* I91, probablemente como consecuencia de una mayor actividad peptidolítica en relación a *Lb. casei* I90. Finalmente, el análisis sensorial indicó que ambas cepas mejoraron los atributos sensoriales del queso Cremoso miniatura, al intensificar la nota “aroma a manteca”, deseable en esta variedad de queso.

Los resultados obtenidos a escala miniatura, fueron validados mediante ensayos de elaboraciones de queso a escala piloto, para verificar la robustez de las propiedades tecnológicas de los cultivos estudiados, y otorgar mayor credibilidad a su aplicación en condiciones reales. En estos ensayos, también se evaluó la influencia de otras cepas de lactobacilos, identificadas como candidatas probióticas, en la composición, proteólisis y el perfil sensorial de quesos de pasta blanda y de pasta semidura (capítulo 3). Para tal fin, se elaboraron quesos de las variedades Cremoso y Pategrás, ensayando como cultivos adjuntos individuales las cepas *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90, *Lb. rhamnosus* I73 y *Lb. rhamnosus* I77. Asimismo, se obtuvieron controles sin el agregado de lactobacilos para ambos tipos de quesos. La composición global de los quesos Pategrás no mostró diferencias significativas entre controles y quesos con lactobacilos. Entre los quesos Cremosos, se verificó que la humedad de aquellos elaborados con *Lb. rhamnosus* era significativamente menor, lo que puede ser atribuido a un incremento en la velocidad de acidificación durante la elaboración. Todos los quesos con *Lb. rhamnosus* I77, Cremosos y Pategrás, mostraron un pH significativamente menor que los controles. Por el contrario, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 no impactaron en el pH ni en la composición global de los quesos. En todos los casos se verificó un incremento significativo de la proteólisis con el tiempo de maduración de los productos, para todos los índices estudiados, que fueron similares a los empleados para describir la proteólisis de los quesos miniatura. En ambas variedades de queso, la proteólisis secundaria, descrita mediante los perfiles peptídicos y el contenido total e individual de aminoácidos, cambió de acuerdo al cultivo adjunto utilizado, lo que indicó una marcada variación intra- e inter-especie en la actividad peptidolítica de las distintas cepas. En general, los quesos con *Lb. rhamnosus* I73, y en menor medida *Lb. rhamnosus* I77, mostraron una proteólisis secundaria más acentuada que los quesos controles y los quesos con agregado de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91. Los cambios observados en los patrones proteolíticos, asociados a la incorporación de las cepas de lactobacilos estudiadas, fueron consistentes con la aceleración de la maduración en los quesos, en forma similar a lo detectado con el modelo miniatura. Las características sensoriales, evaluadas por un ensayo descriptivo, indicaron que todos los quesos Cremosos fueron muy similares. En los quesos tipo Pategrás, por el contrario, se evidenció que los quesos con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 fueron similares a los controles, aunque mostraron una intensificación del sabor picante/áspero y del *flavor* residual. Los quesos Pategrás con la adición de *Lb. rhamnosus* exhibieron mayores diferencias con los controles, especialmente en textura y sabor ácido, lo que correlacionó con su mayor acidez.

En la presente tesis, también se abordó el estudio de la interacción entre fermentos primarios – fermentos adjuntos, y entre enzimas no microbianas – fermentos adjuntos. En este aspecto, se evaluó el impacto de la proteólisis causada por la enzima coagulante residual, la plasmina y fermentos de *Lb. helveticus*, sobre el crecimiento y la actividad bioquímica de cepas de lactobacilos mesófilos.

El efecto de dos fermentos primarios de *Lb. helveticus* (*Lb. helveticus* SF209 o *Lb. helveticus* SF138) de diferente actividad proteolítica, en el crecimiento y la actividad peptidolítica de los lactobacilos mesófilos *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, se estudió en el extracto soluble de queso Reggianito. Además de la influencia del fermento, se valoró el impacto de la edad del queso y, en consecuencia, de su composición peptídica. A su vez, se buscó diferenciar la contribución de cada cepa, *Lb. casei* I90 o *Lb. plantarum* I91, en la proteólisis secundaria del sistema modelo. Los extractos solubles preparados con quesos Reggianito de distintos tiempos de maduración (0, 90 y 180 días), elaborados con fermentos primarios de *Lb. helveticus* SF209 o *Lb. helveticus* SF138, fueron inoculados con las cepas en estudio e incubados a 34°C durante 21 días. También se prepararon extractos controles sin inocular y extractos blancos, en los que se inactivaron las proteasas y peptidasas presentes. Se obtuvieron muestras durante toda la incubación, para determinar el pH, realizar los recuentos de lactobacilos, y evaluar los cambios bioquímicos (perfiles de péptidos y de aminoácidos libres). *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 alcanzaron valores máximos de $\sim 10^8$ UFC/ml en todos los tipos de extractos a los 3 días de incubación, pero luego los recuentos disminuyeron a una velocidad variable dependiendo del tipo de fermento primario utilizado en las elaboraciones y de la edad de los quesos Reggianito empleados en la preparación de los extractos solubles. El fermento primario no influyó en la actividad acidificante, ni el desarrollo de las cepas de lactobacilos mesófilos, aunque sí tuvo un cierto efecto en el mantenimiento de la viabilidad. Por otro lado, se determinó que *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 impactaron de manera diferente en la proteólisis secundaria, probablemente como consecuencia de diferencias en sus equipos enzimáticos, vinculados fundamentalmente a la formación de péptidos pequeños, y en menor grado a la liberación de aminoácidos; la influencia de ambas cepas radicó en una aceleración de la peptidólisis. Los resultados de la presente tesis demostraron, además, que la contribución de las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 a la proteólisis secundaria en el modelo de queso duro de pasta cocida, resultó notablemente influenciada por la actividad y especificidad de las enzimas peptidolíticas de los fermentos primarios. En efecto, el impacto de las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 sobre los perfiles peptídicos fue mayor en presencia de peptidasas de *Lb. helveticus* SF209,

mientras que su contribución a la formación de aminoácidos fue superior en combinación con las enzimas peptidolíticas de *Lb. helveticus* SF138.

Finalmente, se estudió la influencia de las actividades del coagulante residual y de la plasmina en el crecimiento y expresión bioquímica de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91, en un modelo de queso Cheddar miniatura elaborado en condiciones asépticas (capítulo 5). Las actividades enzimáticas en los quesos se modificaron mediante agregado de pepstatina para conseguir la inhibición de la enzima coagulante, y por adición de una solución de plasminógeno-uroquinasa para aumentar el nivel de plasmina. Se obtuvieron quesos con distintos niveles de las enzimas proteolíticas, inoculados o no con *Lb. plantarum* I91. No se encontraron diferencias significativas en la composición global de los quesos, indicando que la adición del cultivo adjunto y la modificación de las actividades proteolíticas del coagulante y la plasmina no introdujeron cambios. Asimismo, la evolución del pH fue similar en todas las muestras, lo que indicó que los lactobacilos adjuntos no contribuyeron a la acidificación, y que la adición de pepstatina o plasminógeno-uroquinasa no interfirió con la actividad acidificante del fermento primario. La adición de pepstatina disminuyó en un 95% la actividad de la enzima coagulante residual, lo que se reflejó en una fuerte inhibición de la proteólisis primaria y secundaria, caracterizada por ausencia de degradación de la α_{s1} -caseína, y por una drástica disminución de la producción de péptidos y aminoácidos. Por otro lado, la adición de plasminógeno-uroquinasa duplicó la actividad de plasmina en los quesos, lo que ocasionó un incremento en la proteólisis primaria, evidenciado por una mayor hidrólisis de la β -caseína y en consecuencia, por un aumento en las γ -caseínas; en este caso, sin embargo, la proteólisis secundaria no resultó afectada. La adición del cultivo adjunto causó notables modificaciones en el perfil de aminoácidos, y en algunos casos, de la cantidad total de aminoácidos libres. En ambas experiencias, la velocidad de crecimiento y el número final alcanzado por los lactobacilos adventicios, en los quesos controles, y por el fermento adjunto, en los quesos experimentales, no resultaron afectados por las actividades enzimáticas ni por los diferentes grados de proteólisis alcanzados. Asimismo, la inhibición o el incremento de la proteólisis primaria no influyeron en la actividad peptidolítica del cultivo adjunto.

En el presente trabajo se identificaron cepas de lactobacilos mesófilos con un adecuado desempeño para su uso como fermentos adjuntos en quesería, y se validó su aplicación para distintas tecnologías queseras y escalas de trabajo. Asimismo, se exploraron aspectos poco conocidos de la utilización de estos cultivos, como su interacción con los otros fermentos lácticos presentes en el ecosistema alimentario, y la sinergia entre equipos enzimáticos de origen microbiano y no microbiano.

Abstract

Cheese ripening is a complex process which consists mainly of enzymatic-mediated reactions, grouped in proteolysis, lipolysis, and metabolism of carbohydrates. Proteolysis is the major biochemical event in most cheese varieties, and is mainly caused by the followings agents: **i)** coagulant, **ii)** plasmin, **iii)** primary starter and **iv)** non starter lactic acid bacteria (NSLAB).

NSLAB are adventitious microorganisms that grow spontaneously in all cheeses, either in those obtained in industrial environments and manufactured with pasteurized milk, or in artisanal products made of raw milk. The NSLAB flora of pasteurized milk cheeses is mainly composed of mesophilic lactobacilli, although pediococci, micrococci and *Leuconostoc* spp. have also been detected. This microbial group originates from raw milk and dairy plant and grows during cheese ripening from very low numbers (10^2 - 10^4 CFU/g cheese in press) up to 10^6 CFU/g or higher counts, and may become the dominant microflora in cheese.

The effects of NSLAB in cheese may be positive, negative or neutral, depending on the dominant species and strains and the number they reach in the product. It has been shown that NSLAB cause an increase in the content of free amino acids, and may intensify the flavour. However, they can also isomerize L-lactate to D-lactate, generate off-flavours and/or over-acidification, and cause openings and cracks in cheese body, all phenomena that are frequently undesirable. In cheese industry, NSLAB are the only factor that remains uncontrolled, and they may originate up to 80% of the quality defects. NSLAB-free cheeses are not an alternative to overcome this problem, as they can be obtained only in laboratory conditions; in addition, they are relatively mild-flavoured. In this context, the most accepted strategy to deal with two opposed aspects of NSLAB in cheese, i.e., their influence in the development of a mature flavour, and the undesirable defects that they can potentially cause, lies in the use of adjunct cultures of mesophilic lactobacilli. Adjunct cultures are selected NSLAB strains added to the cheese-milk with a purpose different from acidification. Such strains are isolated from good quality cheeses, with favourable sensory characteristic and no defects, and characterized from a technological point of view by *in vitro* and *in situ* assays. The adjunct cultures, to be appropriate, should not contribute to acid production during cheesemaking, should grow rapidly in the curd, reach high densities at the beginning of ripening and maintain high counts ($\sim 10^7 - 10^8$ CFU/g). Moreover, they should produce a

balance of desirable effects and no defect in the final product. Adjunct cultures are mainly aimed at controlling the growth of undesirable adventitious microflora, in order to obtain regular and satisfactory products. They also may be used to accelerate cheese ripening and/or contribute to the development of flavour compounds, and consequently, to more distinctive and intense notes in the cheeses. Furthermore, some strains of *Lactobacillus* isolated from cheese have been identified as probiotics candidates.

In the first stage of the present thesis, two experimental models obtained under aseptic conditions were designed and validated, i.e., miniature Cremoso cheese and a slurry or soluble extract of Reggianito cheese, with the aim of providing simple ecosystems representative of soft and hard cheeses environmental conditions, respectively. For that purpose, the reproducibility and applicability of those model systems were assessed through their chemical and microbiological characterization (chapter 1).

In the case of miniature Cremoso cheese, acidification rate during cheesemaking, gross composition and sensory and proteolytic profiles, were similar to those of conventional Cremoso cheese, which pointed out that the model represented well the actual alimentary matrix. Moreover, cheesemaking technology at miniature scale was effective to obtain reproducible and repetitive experimental units, and aseptic manipulation, applied during manufacture and ripening, kept adventitious lactobacilli and no lactic microflora at low levels, during prolonged times.

For the design of experimental models representative of hard cheeses, slurries and soluble extracts of Reggianito cheese were prepared; the first were submitted to heat treatment, while the second were sterilized by filtration. Soluble extract was selected as the best model system, because its chemical composition was similar to that of the aqueous phase of the food that represented and it was effectively sterilized without applying an intense heat treatment.

Both experimental models, miniature Cremoso cheese and Reggianito cheese soluble extract, were used to characterize the strains of mesophilic lactobacilli selected from a technological point of view, in order to evaluate their performance as adjunct cultures for cheese manufacture.

The contribution of two strains of mesophilic lactobacilli isolated from cheese – *Lactobacillus plantarum* I91 and *Lb. casei* I90 – on the proteolysis profile and sensory quality of soft cheese was studied in the miniature Cremoso cheese model. The survival of the above mentioned strains in the environmental conditions that prevail in the food and their interaction with thermophilic primary starter were also evaluated (chapter 2). For that purpose, cheesemaking experiments were performed; control cheeses only contained a primary starter

of *Streptococcus thermophilus*, and experimental cheeses were also inoculated with *Lb. plantarum* I91 or *Lb. casei* I90 as adjunct cultures. During cheesemaking, the evolution of pH was assessed; gross composition, microbial counts (primary starter, adjunct culture, adventitious lactobacilli, coliforms, moulds and yeasts), proteolysis (nitrogen fractionation, polyacrylamide gel electrophoresis, reversed phase high performance liquid chromatography of peptide profiles and free amino acid) and aroma (simple triangular sensory test) were evaluated during ripening. The addition of *Lb. plantarum* I91 and *Lb. casei* I90 strains neither modified the pH decrease during cheese manufacture, nor caused changes in gross composition. In both experiments, primary starter population reached similar levels in cheeses made with and without adjunct cultures, which suggests that the assayed strains did not interfere on the growth and survival of *S. thermophilus*. Moreover, both strains grew rapidly in the curd reaching values of 10^8 - 10^9 CFU/g during ripening, and showed good survival. Cheeses made with *Lb. plantarum* I91 and *Lb. casei* I90 exhibited lower counts of coliforms and moulds and yeasts than their respective controls, indicating that such strains were effective at controlling the development of undesirable microflora. The adjuncts did not influence the levels of nitrogen in the different fractions, or enhance the hydrolysis of intact casein (primary proteolysis) during ripening, but caused notable changes on peptide profiles, and increased the content of total free amino acid as well as the concentration of certain individual free amino acids. The changes observed were consistent with the acceleration of secondary proteolysis during ripening, which in turn was higher in the cheeses inoculated with *Lb. plantarum* I91, probably as a consequence of a greater peptidolytic activity comparatively to *Lb. casei* I90. Finally, the sensory analysis indicated that both strains improved the aroma of miniature Cremoso cheeses, by intensifying the note “buttery aroma”, desirable in this cheese variety.

The results obtained at miniature scale with *Lb. plantarum* I91 and *Lb. casei* I90 were validated by means of cheesemaking assays at pilot scale, in order to verify the robustness of the technological properties of the cultures studied, and increase reliability of results to its application in real conditions. In pilot plant assays, the influence of other lactobacilli strains identified as probiotic candidates, on composition, proteolysis and sensorial profile of soft and semi-hard cheeses was also evaluated (chapter 3). For such purpose, cheeses of Cremoso and Pategrás varieties were manufactured, testing the strains *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90, *Lb. rhamnosus* I73 y *Lb. rhamnosus* I77 as individual adjunct cultures. Furthermore, control cheeses were obtained without the addition of lactobacilli for both types of cheese. Gross composition of Pategrás cheeses did not show significant differences between cheeses with or

without adjunct lactobacilli. Among Cremoso cheeses, it was verified that the moisture content of those made with *Lb. rhamnosus* strains was significantly lower, which may be attributed to an increase of the acidification rate during manufacture. All cheeses with *Lb. rhamnosus* I77, Cremosos and Pategrás, showed a pH significantly lower than the controls. On the contrary, *Lb. casei* I90 and *Lb. plantarum* I91 did not impact on pH and gross composition of the cheeses. In all cases, a significant increase of proteolysis was observed during ripening time, detected by all the proteolysis indexes assessed, which were similar to those used for miniature cheeses. In both cheese varieties, the secondary proteolysis described by peptide profiles and total and individual free amino acids content, changed according to the adjunct culture used, indicating a marked intra- and inter-specie variation on the peptidolytic activity of the different strains. In general, the cheeses with *Lb. rhamnosus* I73, and in a lesser extent *Lb. rhamnosus* I77, showed a more intense secondary proteolysis than control cheeses and cheeses with *Lb. casei* I90 and *Lb. plantarum* I91. The changes observed on the proteolytic patterns, associated with the addition of the lactobacilli strains studied, were consistent with the acceleration of ripening in the cheeses, similarly to the effect detected in the miniature model. Sensory profiles of all Cremoso cheeses, assessed by a descriptive assay, were very similar, regardless of the addition of adjunct cultures. In Pategrás type cheeses, on the contrary, some differences were found: cheeses with *Lb. casei* I90 and *Lb. plantarum* I91 were similar to the controls, but they showed an increase in pungent and creamy taste, as well as residual flavour. Pategrás cheeses with *Lb. rhamnosus* strains exhibited the greatest differences with the controls, especially in texture and acid flavour, which was consistent with their higher acidity.

This thesis also dealt with the study of the interaction between primary starter – adjunct culture, and between no microbial enzymes – adjunct culture. For that purpose, the influence of proteolysis caused by residual coagulant enzyme, plasmin and primary starters of *Lb. helveticus* on the growth and biochemical activity of mesophilic lactobacilli was evaluated.

The effect of two primary starters of *Lb. helveticus* (*Lb. helveticus* SF209 or *Lb. helveticus* SF138) with different proteolytic activity, on the growth and peptidolytic activity of the mesophilic lactobacilli *Lb. casei* I90 and *Lb. plantarum* I91, was studied on the Reggianito cheese soluble extract. Apart from the influence of the starter, the impact of cheese age, and consequently, of its peptidic composition was assessed. In addition, it was expected to differentiate the contribution of each strain, *Lb. casei* I90 or *Lb. plantarum* I91, to the secondary proteolysis of the system. The soluble extracts prepared with Reggianito cheeses of different ripening times (0, 90 and 180 days), manufactured with primary starters of either *Lb.*

helveticus SF209 or *Lb. helveticus* SF138, were inoculated with the strains in study and incubated at 34°C during 21 days. Control extract, without lactobacilli, and blank extract, in which proteases and peptidases were inactivated, were also prepared. Samples were obtained during all the incubation period to assess pH, lactobacilli counts, and evaluate the biochemical changes (peptide and free amino acids profiles). *Lb. casei* I90 and *Lb. plantarum* I91 reached maximum values of $\sim 10^8$ CFU/ml in all types of extract after 3 days of incubation, but then the counts decreased at a variable rate, depending on the type of primary starter used in the manufacture and the age of the Reggiano cheeses utilized for the preparation of the soluble extracts. The primary starter did not influence the acidifying activity, or the development of the strains of mesophilic lactobacilli, although did have a certain effect on the maintenance of their viability. On the other hand, *Lb. plantarum* I91 and *Lb. casei* I90 showed a different impact on secondary proteolysis, probably as a consequence of differences in their enzymatic equipment; their influence was mainly linked to the formation of small peptides, and in lesser extent, to the release of amino acids. The influence of both led to an acceleration of peptidolysis. The results of the present thesis also showed that the contribution of the strains of *Lb. plantarum* I91 and *Lb. casei* I90 to secondary proteolysis in the cooked-paste hard cheese model was notably influenced by the activity and the specificity of the peptidolytic enzymes of the primary starter. In fact, the impact of the strains of *Lb. plantarum* I91 and *Lb. casei* I90 on the peptide profiles was higher in the presence of peptidases of *Lb. helveticus* SF209, whereas their contribution to the formation of amino acids was greater in combination with the peptidolytic enzymes of *Lb. helveticus* SF138.

Finally, the influence of residual coagulant and plasmin activities on the growth and biochemical expression of an adjunct culture of *Lb. plantarum* I91, in a miniature Cheddar cheese model made under aseptic conditions, was studied (chapter 5). The enzymatic activities in the cheeses were modified by means of the addition of pepstatin to achieve the inhibition of the coagulant enzyme, and through the addition of a plasminogen-urokinase solution to increase the level of plasmin. Cheeses with or without a *Lb. plantarum* I91 adjunct culture and with or without added pepstatin or plasminogen-urokinase solution were manufactured and ripened for 60 days. No significant differences were found in the gross composition of the cheeses, indicating that the addition of the adjunct culture and the modification of the proteolytic activities of the coagulant and plasmin did not introduced changes. Furthermore, the evolution of pH was similar in all samples, which showed that the adjunct lactobacilli did not contribute to acidification, and that the addition of pepstatin or plasminogen-urokinase solution did not interfere with the acidifying activity of the primary

starter. The addition of pepstatin decreased in a 95% the residual activity of the coagulant enzyme, which was reflected by a strong inhibition of the primary and secondary proteolysis, characterized by the absence of α_{s1} -casein degradation, and a dramatic decrease in the production of peptides and amino acids. On the other hand, the addition of plasminogen-urokinase doubled plasmin activity in the cheeses, which caused an increase of primary proteolysis, evidenced by a greater hydrolysis of β -casein and consequently, by an increase in γ -casein; in this case, however, secondary proteolysis was not modified. The addition of the adjunct culture caused notable changes in the amino acids profile, and in some cases, in the total amount of free amino acids. In both experiments, the growth rate and the final number of adventitious lactobacilli, in control cheeses, and adjunct starter, in the experimental cheeses, was not affected by the enzymatic activities of coagulant or plasmin or the different degree of proteolysis achieved. Furthermore, the inhibition or the increase of primary proteolysis did not influence the peptidolytic activity of the adjunct culture.

In the present work, strains of mesophilic lactobacilli which demonstrated suitable performance as adjunct cultures for cheese production were identified. These strains were applied in different cheese technologies and scales, where results obtained in model systems were validated. Moreover, evidence on unexplored aspects of adjunct cultures application was provided, such as their interaction with other lactic starters in the food ecosystem, and synergy between enzymatic equipments of microbial and no microbial origin.

Índice de contenidos

Introducción

1. Las bacterias lácticas no fermento o NSLAB	1
2. Origen de las NSLAB en quesos	1
3. Factores que influyen en la velocidad de crecimiento, el recuento final alcanzado y la actividad bioquímica de las NSLAB durante la maduración del queso	4
3.1. Fermento primario o de acidificación	4
3.2. Factores ambientales	7
3.2.1. Temperatura	7
3.2.2. Sal en la humedad	7
3.2.3. Contenido de humedad	8
3.2.4. Fuente de energía	8
4. Crecimiento de las NSLAB en quesos	11
5. Métodos utilizados para estudiar la influencia de las NSLAB en la calidad del queso	16
5.1. Adición de antibióticos	17
5.2. Empleo de fermentos primarios productores de bacteriocinas	17
5.3. Manipulación de la temperatura de maduración	18
5.4. Microfiltración o pasteurización de la leche	20
5.5. Pseudo-cuajadas o “ <i>slurries</i> ” de queso	21
5.6. Adición de cultivos adjuntos en elaboraciones de queso	23
6. Actividad bioquímica de los lactobacilos	25
6.1. Metabolismo del citrato	25
6.2. Metabolismo de la lactosa y del lactato	27
6.3. Actividad lipolítica	28
6.4. Actividad proteolítica y catabolismo de los aminoácidos	29
7. Efectos de las NSLAB en la calidad del queso	33
7.1. Formación de manchas blancas en la superficie del queso	34
7.2. Formación de aminas biogénicas	34
7.3. Formación de ojos y/o aperturas en los quesos	35
7.4. Producción excesiva de ácido	35
7.5. Producción de <i>off-flavors</i>	35

8. Cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos	38
--	----

Objetivos

- Objetivo general	46
- Objetivos particulares	46

Capítulo 1: “Desarrollo de modelos experimentales representativos de matrices alimentarias reales: queso Cremoso miniatura y extracto soluble de queso Reggianito”

1. Introducción	47
2. Materiales y Métodos	48
2.1. Desarrollo de un modelo de queso Cremoso miniatura	48
2.1.1. Ensayos preliminares	48
2.1.2. Elaboración de quesos	49
2.1.3. Periodo de maduración	50
2.1.4. Muestreo y conservación de las muestras	50
2.1.5. Análisis de los quesos	51
Determinación de pH	51
Análisis de composición global	51
- Humedad	51
- Materia grasa	52
- Proteínas totales	52
Análisis microbiológicos	53
Estudio de la proteólisis	54
- Fraccionamiento nitrogenado	54
- Electroforesis (urea-PAGE)	56
- Perfiles peptídicos por RP-HPLC	57
Análisis sensorial	59
2.1.6. Análisis estadístico	60
2.2. Desarrollo de un modelo experimental a partir de queso de pasta dura	60
2.2.1. Obtención de una pasta de queso Reggianito	60
2.2.2. Obtención de un extracto soluble de queso Reggianito	61
2.2.3. Seguimiento del crecimiento microbiano en los modelos propuestos	62

3. Resultados y Discusión	63
3.1. Modelo de queso Cremoso miniatura	63
3.1.1. Influencia del tratamiento térmico en la aptitud a la coagulación	63
3.1.2. Composición química y curva de acidificación	65
3.1.3. Recuentos microbiológicos y tiempo de maduración	66
3.1.4. Proteólisis primaria y secundaria	68
3.1.5. Análisis sensorial	71
3.2. Modelos representativos de queso duro	71
3.2.1. Pasta de queso Reggianito	71
3.2.2. Extracto soluble de queso Reggianito	75
4. Conclusiones	79

Capítulo 2: “Efecto de cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos sobre la composición química y las propiedades sensoriales de quesos de pasta blanda”

1. Introducción	80
2. Materiales y Métodos	81
2.1. Cultivos adjuntos de lactobacilos	81
2.2. Elaboraciones de queso	82
2.3. Análisis de los quesos	82
2.4. Análisis estadístico	84
3. Resultados y Discusión	87
3.1. Composición global y pH de los quesos	87
3.2. Recuentos microbiológicos	89
3.3. Estudio de la proteólisis	94
3.3.1. Fraccionamiento nitrogenado	95
3.3.2. Electroforesis (urea-PAGE)	96
3.3.3. Perfiles peptídicos	97
3.3.4. Aminoácidos libres totales e individuales	103
3.4. Análisis sensorial	107
4. Conclusiones	109

Capítulo 3: “Influencia de lactobacilos autóctonos potencialmente probióticos en la proteólisis y las características sensoriales de quesos Cremoso y Pategrás”

1. Introducción	110
2. Materiales y Métodos	112

2.1. Cultivos	112
2.2. Diseño experimental y elaboraciones de quesos	112
2.3. Análisis de los quesos	114
2.3.1. Modificación del análisis de aminoácidos libres	114
2.3.2. Análisis sensorial	115
2.4. Análisis estadístico	115
3. Resultados y Discusión	116
3.1. Composición global y pH	116
3.2. Recuentos microbiológicos	118
3.3. Electroforesis y fraccionamiento nitrogenado	121
3.4. Perfiles peptídicos	126
3.5. Aminoácidos libres totales e individuales	132
3.6 Análisis sensorial	139
4. Conclusiones	142

Capítulo 4: “Interacción entre fermentos lácticos primario y adjunto: Efecto del cultivo iniciador en el crecimiento y la actividad peptidolítica de lactobacilos mesófilos en un modelo de queso duro de pasta cocida”

1. Introducción	144
2. Materiales y Métodos	145
2.1. Elaboración de quesos Reggianito	145
2.1.1. Fermentos primarios	146
2.1.2. Preparación de los cultivos primarios	146
2.1.3. Protocolo de elaboración	147
2.1.4. Análisis de los quesos	148
2.2. Preparación del extracto soluble de queso Reggianito, inoculación con los fermentos adjuntos e incubación	148
2.3. Análisis de los extractos	150
2.3.1. Evolución del pH y recuentos microbiológicos	150
2.3.2. Perfiles peptídicos por RP-HPLC	150
2.3.3. Análisis de aminoácidos libres por RP-HPLC	150
2.4. Análisis estadístico	151
3. Resultados y Discusión	152
3.1. Composición química y microbiológica de los fermentos de suero y de los quesos Reggianito	152

3.2. Evolución del pH en los extractos solubles de queso Reggianito	153
3.3. Recuentos microbiológicos de los extractos solubles de queso Reggianito	156
3.4. Perfiles peptídicos	162
3.4.1. Impacto de las cepas de <i>Lb. casei</i> I90 y <i>Lb. plantarum</i> I91 en los perfiles peptídicos	165
3.4.2. Influencia de la peptidólisis causada por el fermento primario, en las actividades peptidolíticas de los lactobacilos mesófilos en estudio	169
3.5. Aminoácidos libres totales	173
3.6. Aminoácidos libres individuales	180
3.6.1. Impacto de las cepas de <i>Lb. casei</i> I90 y <i>Lb. plantarum</i> I91 en la formación de aminoácidos	180
3.6.2. Influencia de la peptidólisis causada por el fermento primario, en la producción de aminoácidos libres por los lactobacilos mesófilos en estudio	185
4. Conclusiones	189

Capítulo 5: “Impacto de la proteólisis causada por el coagulante residual y la plasmina en el crecimiento y actividad peptidolítica de lactobacilos en quesos miniatura tipo Cheddar”

1. Introducción	190
2. Materiales y Métodos	191
2.1. Muestras de leche	191
2.2. Estudios preliminares y modelo de queso	191
2.3. Diseño experimental	193
2.4. Obtención de la solución de plasmina	194
2.5. Análisis de los quesos	195
2.5.1. Composición global, pH y recuentos microbiológicos	195
2.5.2. Estudio de la proteólisis	195
Preparación de las muestras	195
Electroforesis (urea-PAGE)	195
Perfiles peptídicos por RP-HPLC	196
Contenido de aminoácidos libres totales e individuales	197
Determinación de la actividad de la enzima coagulante residual	198
Determinación de la actividad de plasmina	199
2.6. Análisis estadístico	200
3. Resultados y Discusión	200
3.1. Composición y recuentos microbiológicos de la leche de elaboración	200

3.2. Estudio preliminar: Composición química y dinámica de las poblaciones de lactococos y lactobacilos durante la maduración de los quesos	201
3.3. Obtención de la solución de plasmina	203
3.4. Quesos con actividades de quimosina y plasmina modificadas: Experiencias 1 y 2	204
3.4.1. Composición global y pH	204
3.4.2. Actividades enzimáticas	205
3.4.3. Electroforesis	208
3.4.4. Perfiles peptídicos de los quesos	211
3.4.5. Aminoácidos libres totales e individuales	217
3.4.6. Recuentos microbiológicos	227
4. Conclusiones	230
<i>Conclusiones del trabajo de tesis</i>	231
<i>Anexo</i>	233
<i>Bibliografía</i>	244

Índice de tablas y figuras

Tablas

Capítulo 1

Tabla 1.1. Gradiente empleado en la separación cromatográfica de péptidos	59
Tabla 1.2. Aptitud a la coagulación de la leche sometida a diferentes tratamientos térmicos	64
Tabla 1.3. Composición global y pH de quesos Cremoso miniatura	65
Tabla 1.4. Contenido de nitrógeno de las fracciones solubles a pH 4,6, en ácido tricloroacético 12% y en ácido fosfotúngstico 2,5%, expresados como porcentaje del nitrógeno total, de los quesos Cremoso miniatura	70
Tabla 1.5. Composición química de las pastas de queso Reggianito luego de la aplicación de los tratamientos térmicos	72
Tabla 1.6. Composición química de los extractos solubles de queso Reggianito	76
Tabla 1.7. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y pH de los extractos solubles de queso Reggianito	76

Capítulo 2

Tabla 2.1. Gradiente empleado en la separación cromatográfica de aminoácidos	84
Tabla 2.2. Composición global y pH de los quesos Cremoso miniatura de 3 días de maduración, elaborados bajo condiciones microbiológicas controladas	88

Capítulo 3

Tabla 3.1. Composición global y pH durante la maduración de los quesos Cremoso y Pategrás	118
--	-----

Capítulo 4

Tabla 4.1. Diseño experimental y nomenclatura asignada a cada muestra	149
Tabla 4.2. Recuento inicial de lactobacilos termófilos y evolución del contenido de humedad durante la maduración de quesos Reggianito	152

Capítulo 5

Tabla 5.1. Composición global y pH de los quesos tipo Cheddar miniatura del ensayo preliminar	201
--	-----

Tabla 5.2. Composición global y pH de los quesos Cheddar miniatura correspondientes a las experiencias del coagulante y de la plasmina	205
Tabla 5.3. Actividad de coagulante residual y de plasmina en los quesos Cheddar miniatura	208

Figuras

Introducción

Figura 1. Rutas metabólicas implicadas en la degradación del citrato y del lactato durante la maduración del queso	28
Figura 2. Principales vías metabólicas del catabolismo de los aminoácidos	33

Capítulo 1

Figura 1.1. Curva de acidificación de quesos Cremoso miniatura	66
Figura 1.2. Evolución de las poblaciones microbianas durante la maduración de quesos Cremoso miniatura	68
Figura 1.3. Electroforesis urea-PAGE de los quesos Cremoso miniatura	69
Figura 1.4. Perfiles peptídicos de los quesos Cremoso miniatura luego de 3, 30 y 60 días de maduración	71
Figura 1.5. Perfiles peptídicos de las pastas de queso Reggianito de 1 día de incubación .	73
Figura 1.6. Evolución de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales en las pastas de queso Reggianito	74
Figura 1.7. Perfiles peptídicos del extracto soluble de queso Reggianito. A) Extracto soluble esterilizado por filtración no sometido a tratamiento térmico. B) Extracto soluble esterilizado por filtración y tratado a 70°C durante 30 min	78

Capítulo 2

Figura 2.1. Curva de acidificación de los quesos Cremoso miniatura durante la etapa de elaboración	88
Figura 2.2. Evolución de las poblaciones del fermento primario, coliformes, hongos/levaduras y lactobacilos adventicios y adjuntos, en los quesos Cremoso miniatura correspondientes a la experiencia 1. A) Quesos controles. B) Quesos experimentales	90
Figura 2.3. Evolución de las poblaciones del fermento primario, coliformes, hongos/levaduras y lactobacilos adventicios y adjuntos, en los quesos Cremoso miniatura correspondientes a la experiencia 2. A) Quesos controles. B) Quesos experimentales	92
Figura 2.4. Evolución del contenido de nitrógeno en las distintas fracciones solubles de los quesos Cremoso miniatura controles y experimentales. A) Experiencia 1. B) Experiencia 2	95

Figura 2.5. Electroforesis urea-PAGE de los quesos Cremoso miniatura controles y experimentales. A) Experiencia 1. B) Experiencia 2	97
Figura 2.6. Perfiles peptídicos de los quesos Cremoso miniatura elaborados con y sin lactobacilos adjuntos. A) Experiencia 1. B) Experiencia 2	98
Figura 2.7. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos Cremoso miniatura controles y experimentales, correspondientes a la experiencia 1. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	100
Figura 2.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos Cremoso miniatura controles y experimentales, correspondientes a la experiencia 2. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	101
Figura 2.9. Perfiles de aminoácidos libres individuales de los quesos Cremoso miniatura, elaborados con y sin lactobacilos adjuntos. A) Experiencia 1. B) Experiencia 2	105

Capítulo 3

Figura 3.1. Curva de acidificación de los quesos Cremoso elaborados a escala piloto durante la elaboración	116
Figura 3.2. Evolución del fermento primario y de los lactobacilos durante la maduración. A) Quesos Cremoso. B) Quesos Pategrás	120
Figura 3.3. Perfiles electroforéticos de los quesos Cremoso a los 7, 30 y 60 días de maduración	122
Figura 3.4. Perfiles electroforéticos de los quesos Pategrás, a los 7, 30 y 60 días de maduración	123
Figura 3.5. Fracciones nitrogenadas de los quesos controles e inoculados con lactobacilos. A) Quesos Cremoso. B) Quesos Pategrás	124
Figura 3.6. Perfiles peptídicos de los quesos controles e inoculados con lactobacilos. A) Quesos Cremoso. B) Quesos Pategrás	127
Figura 3.7. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos tipo Cremoso elaborados con y sin lactobacilos adjuntos. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	129
Figura 3.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos tipo Pategrás elaborados con y sin lactobacilos adjuntos. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	130
Figura 3.9. Perfiles de aminoácidos libres individuales de los quesos Cremoso	134
Figura 3.10. Perfiles de aminoácidos libres individuales de los quesos Pategrás	135
Figura 3.11. Atributos sensoriales de los quesos Pategrás	140

Capítulo 4

Figura 4.1. Evolución del pH en los extractos solubles blancos e inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91. A) Extractos preparados con quesos Reggianito Lh209. B) Extractos preparados con quesos Reggianito Lh138	153
---	-----

Figura 4.2. Evolución del pH en los extractos solubles controles e inoculados con <i>Lb. casei</i> I90. A) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh209. B) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh138	155
Figura 4.3. Recuento de lactobacilos en los extractos solubles experimentales inoculados con <i>Lb. casei</i> I90. A) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh209. B) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh138	157
Figura 4.4. Recuento de lactobacilos en los extractos solubles experimentales inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91. A) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh209. B) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh138	159
Figura 4.5. Comparación de perfiles peptídicos de extractos de quesos Lh209 y Lh138 de 90 y 180 días de maduración, sin inocular con lactobacilos adjuntos y previo a la incubación	163
Figura 4.6. Comparación de perfiles peptídicos de extractos de quesos de distintas edades, sin inocular con lactobacilos adjuntos y previo a la incubación. A) Extracto de queso Lh209. B) Extracto de queso Lh138	164
Figura 4.7. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh209 de 180 días de maduración. A y C): Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D): Gráficos de los <i>scores</i>	166
Figura 4.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh138 de 180 días de maduración. A): Gráficos de los <i>loadings</i> . B): Gráficos de los <i>scores</i>	168
Figura 4.9. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. casei</i> I90, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración. A y C): Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D): Gráficos de los <i>scores</i>	170
Figura 4.10. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración. A y C): Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D): Gráficos de los <i>scores</i>	172
Figura. 4.11. Evolución del contenido total de aminoácidos en los extractos solubles controles, blancos y experimentales. A) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh138 de 0 días de maduración. B) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh138 de 90 días de maduración. C) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh138 de 180 días de maduración	174
Figura. 4.12. Evolución del contenido total de aminoácidos en los extractos solubles controles, blancos y experimentales. A) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh209 de 0 días de maduración. B) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh209 de 90 días de maduración. C) Extractos preparados con quesos Reggiano Lh209 de 180 días de maduración	177
Figura 4.13. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh209 de 180 días de maduración. A): Gráfico de los <i>loadings</i> . B): Gráfico de los <i>scores</i> ..	182

Figura 4.14. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh138 de 180 días de maduración. A y C: Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D: Gráficos de los <i>scores</i>	183
Figura 4.15. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. casei</i> I90, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráficos de los <i>scores</i>	185
Figura 4.16. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráficos de los <i>scores</i>	186

Capítulo 5

Figura 5.1. Curva de calibrado para la determinación del contenido total de aminoácidos mediante el método TNBS	198
Figura 5.2. Curva de calibrado para la determinación de la actividad de plasmina	200
Figura 5.3. Evolución del fermento primario y de las NSLAB adventicias durante la maduración de quesos tipo Cheddar miniatura, correspondientes a los ensayos A, B y C .	202
Figura 5.4. Curva de obtención de plasmina por incubación de una solución de plasminógeno y uroquinasa a 37°C	203
Figura 5.5. Cuantificación de la actividad de coagulante residual mediante el seguimiento de la hidrólisis de un péptido sintético por cromatografía líquida. A) Queso tipo Cheddar miniatura con agregado de pepstatina. B) Queso tipo Cheddar miniatura sin pepstatina	206
Figura 5.6. Electroforesis urea-PAGE. A) Quesos de la experiencia del coagulante. B) Quesos de la experiencia de la plasmina	210
Figura 5.7. Perfiles peptídicos de los quesos tipo Cheddar miniatura de 60 días de maduración, elaborados con y sin pepstatina o cultivo adjunto	213
Figura 5.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos correspondientes a la experiencia del coagulante. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	214
Figura 5.9. Perfiles peptídicos de los quesos tipo Cheddar miniatura de 60 días de maduración, elaborados con y sin solución de plasmina o cultivo adjunto	216
Figura 5.10. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos correspondientes a la experiencia de la plasmina. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	217
Figura 5.11. Concentración total de aminoácidos libres de los quesos tipo Cheddar miniatura controles y experimentales elaborados con y sin pepstatina	219
Figura 5.12. Perfil de aminoácidos libres individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura de la experiencia del coagulante. A) Quesos de 1 día de maduración. B) Quesos de 60 días de maduración	221

Figura 5.13. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura de la experiencia del coagulante. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	222
Figura 5.14. Concentración total de aminoácidos libres de los quesos tipo Cheddar miniatura controles y experimentales elaborados con y sin solución de plasmina	223
Figura 5.15. Perfil de aminoácidos libres individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura de la experiencia de la plasmina. A) Quesos de 1 día de maduración. B) Quesos de 60 días de maduración	225
Figura 5.16. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura pertenecientes a la experiencia de la plasmina. A) Gráfico de los <i>loadings</i> . B) Gráfico de los <i>scores</i>	227
Figura 5.17. Evolución del fermento primario y de los lactobacilos en los quesos de la experiencia del coagulante durante la maduración	228
Figura 5.18. Evolución del fermento primario y de los lactobacilos en los quesos de la experiencia de la plasmina durante la maduración	229

Anexo

Figura I.1. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh209 del inicio de la maduración. A y C: Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D: Gráficos de los <i>scores</i>	233
Figura I.2. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh209 de 90 días de maduración. A y C: Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D: Gráficos de los <i>scores</i>	234
Figura I.3. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh138 del inicio de la maduración. A y C: Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D: Gráficos de los <i>scores</i>	235
Figura I.4. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh138 de 90 días de maduración. A y C: Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D: Gráficos de los <i>scores</i>	236
Figura I.5. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. casei</i> I90, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 del inicio de la maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráfico de los <i>scores</i>	237
Figura I.6. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 del inicio de la maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráfico de los <i>scores</i>	237
Figura I.7. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. casei</i> I90, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración. A y C: Gráficos de los <i>loadings</i> . B y D: Gráficos de los <i>scores</i>	238

Figura I.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráfico de los <i>scores</i>	239
Figura I.9. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh209 del inicio de la maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráfico de los <i>scores</i> .	239
Figura I.10. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh209 de 90 días de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráfico de los <i>scores</i> ...	240
Figura I.11. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh138 del inicio de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráfico de los <i>scores</i>	240
Figura I.12. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles, blancos y experimentales preparados con los quesos Lh138 de 90 días de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráfico de los <i>scores</i> ...	241
Figura I.13. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. casei</i> I90, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 del inicio de la maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráficos de los <i>scores</i>	241
Figura I.14. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 del inicio de la maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráficos de los <i>scores</i>	242
Figura I.15. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. casei</i> I90, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráficos de los <i>scores</i>	243
Figura I.16. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles y experimentales inoculados con <i>Lb. plantarum</i> I91, preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración. A: Gráfico de los <i>loadings</i> . B: Gráficos de los <i>scores</i>	243

Abreviaturas

Generales

A₄₂₀: Absorbancia a 420 nm.

AAL: Aminoácidos libres.

ABRV: Agar bilis rojo violeta.

AC: Análisis de cluster.

ACGY: Agar cloranfenicol – dextrosa (glucosa) – extracto de levadura.

ACP: Análisis por componentes principales.

AMC: 7-amino-4-metil cumarina.

ANOVA: Análisis de la varianza.

APC: Agar para recuento en placa; acrónimo del inglés: *agar plate count*.

AT: Aminotransferasa/s.

Br.: *Brevibacterium*.

CEPs: Proteinasas de pared extracelulares; acrónimo del inglés: *cell-envelope proteinase*.

CP: Componente principal.

CPs: Componentes principales.

GDH: Enzima glutamato dehidrogenasa.

IDF: Federación Internacional de Lechería; acrónimo del inglés: *International Dairy Federation*.

L.: *Lactococcus*.

LAB: Bacterias ácido lácticas; acrónimo del inglés: *lactic acid bacteria*.

Lb.: *Lactobacillus*.

log: Logarítmico/s.

LSD: Mínima diferencia significativa; acrónimo del inglés: *least significant difference*.

MRS: De Man, Rogosa and Sharpe (medio de cultivo para recuento de lactobacilos).

NSLAB: Bacterias lácticas no pertenecientes al fermento; acrónimo del inglés: *non starter lactic acid bacteria*.

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

NS-PTA: Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico.

NS-TCA: Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético.

NT: Nitrógeno total.

P.: *Penicillium*.

PLP: Piridoxal fosfato.

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

S.: *Streptococcus*.

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina.

TFA: Ácido trifluorocético.

TNBS: Ácido trinitrobencensulfónico.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

UHT: Pasteurización ultra alta temperatura; acrónimo del inglés: *ultra-high temperature pasteurization*.

Urea – PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea.

UV: Ultravioleta.

Específicas del Capítulo 1

TL: Pasta de queso Reggianito esterilizada por vapor fluente a 85°C – 10 min.

TM: Pasta de queso Reggianito esterilizada por vapor fluente a 95°C – 10 min.

TA: Pasta de queso Reggianito esterilizada en autoclave a 115°C – 30 min.

C: Pasta control no sometida a tratamiento térmico.

Específicas del Capítulo 2

C1 y C2: Quesos controles tipo Cremoso elaborados a escala miniatura, correspondientes a las experiencias 1 y 2, respectivamente.

E1 y E2: Quesos experimentales tipo Cremoso elaborados a escala miniatura con la adición de *Lb. plantarum* I91 (experiencia 1) y *Lb. casei* I90 (experiencia 2).

Específicas del Capítulo 3

CC: Quesos controles tipo Cremoso elaborados a escala piloto.

PC: Quesos controles tipo Pategrás elaborados a escala piloto.

CLb73, CLb77, CLb90 y CLb91: Quesos experimentales tipo Cremoso elaborados a escala piloto con la adición de cultivos adjuntos de *Lactobacillus rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente.

PLb73, PLb77, PLb90 y PLb91: Quesos experimentales tipo Pategrás elaborados a escala piloto con la adición de cultivos adjuntos de *Lactobacillus rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente.

Específicas del Capítulo 4

Lh209: Quesos Reggianito elaborados con fermento primario de *Lb. helveticus* SF209.

Lh138: Quesos Reggianito elaborados con fermento primario de *Lb. helveticus* SF138.

E90209-i, E90209-m, E90209-f: Extractos solubles de queso Reggianito inoculados con *Lb. casei* I90, y preparados con quesos Lh209 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

E91209-i, E91209-m, E91209-f: Extractos solubles de queso Reggianito inoculados con *Lb. plantarum* I91, y preparados con quesos Lh209 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

C209-i, C209-m, C209-f: Extractos solubles de queso Reggianito sin inocular, preparados con quesos Lh209 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

B209-i, B209-m, B209-f: Extractos solubles de queso Reggianito sin inocular, tratados a 70°C durante 30 min, y preparados con quesos Lh209 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

E90138-i, E90138-m, E90138-f: Extractos solubles de queso Reggianito inoculados con *Lb. casei* I90, y preparados con quesos Lh138 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

E91138-i, E91138-m, E91138-f: Extractos solubles de queso Reggianito inoculados con *Lb. plantarum* I91, y preparados con quesos Lh138 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

C138-i, C138-m, C138-f: Extractos solubles de queso Reggianito sin inocular, preparados con quesos Lh138 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

B138-i, B138-m, B138-f: Extractos solubles de queso Reggianito sin inocular, tratados a 70°C durante 30 min, y preparados con quesos Lh138 de 0, 90 y 180 días de maduración, respectivamente.

Específicas del Capítulo 5

A, B y C: Quesos tipo Cheddar correspondientes a los ensayos A, B y C, respectivamente.

S: Sustrato heptapéptido (Pro-Thr-Glu-Phe-[NO₂-Phe]-Arg-Leu).

P: Producto de hidrólisis del sustrato heptapéptido.

Cc: Quesos controles tipo Cheddar correspondientes a la experiencia del coagulante.

CPc: Quesos controles tipo Cheddar correspondientes a la experiencia del coagulante elaborados con pepstatina.

Cp: Quesos controles tipo Cheddar correspondientes a la experiencia de la plasmina.

CPp: Quesos controles tipo Cheddar correspondientes a la experiencia de la plasmina elaborados con solución de plasminógeno – uroquinasa.

Ec: Quesos experimentales tipo Cheddar correspondientes a la experiencia del coagulante elaborados con la adición de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91.

Ep: Quesos experimentales tipo Cheddar correspondientes a la experiencia de la plasmina elaborados con la adición de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91.

EPc: Quesos experimentales tipo Cheddar correspondientes a la experiencia del coagulante elaborados con adición de pepstatina y de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91.

EPp: Quesos experimentales de la experiencia de la plasmina elaborados con adición de solución de plasminógeno – uroquinasa y de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91.

Nomenclatura de aminoácidos

Ala: Alanina.

Arg: Arginina.

Asp: Ácido aspártico.

Glu: Ácido glutámico.

Gly: Glicina.

His: Histidina.

Ile: Isoleucina.

Leu: Leucina.

Lys: Lisina.

Met: Metionina.

Phe: Fenilalanina.

Pro: Prolina.

Ser: Serina.

Thr: Treonina.

Tyr: Tirosina.

Val: Valina.

ArAAs: Aminoácidos aromáticos; acrónimo del inglés: *aromatic amino acids*.

BcAAs: Aminoácidos de cadena ramificada; acrónimo del inglés: *branched-chain amino acids*.

Introducción

1. Las bacterias lácticas no fermento o NSLAB

Las bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento o NSLAB (por sus siglas en inglés: non-starter lactic acid bacteria) son microorganismos adventicios que se encuentran en los quesos y que no forman parte del fermento primario; por lo tanto, no contribuyen a la producción de ácido láctico durante la elaboración (Beresford, 2003). La flora NSLAB se compone de cuatro grupos principales de bacterias, a saber: lactobacilos mesófilos, pediococos, enterococos y *Leuconostoc* spp. Los lactobacilos mesófilos constituyen el grupo microbiano mejor estudiado y el más frecuentemente encontrado en los quesos como miembro de la flora NSLAB (De Angelis y col., 2001; Quiberoni y col., 2005).

Los lactobacilos se clasifican en tres grupos en base a su capacidad fermentante: homofermentantes obligatorios (Grupo I); heterofermentantes facultativos (Grupo II); y heterofermentantes obligatorios (Grupo III). Los lactobacilos heterofermentantes facultativos (Grupo II) son los más frecuentemente aislados a partir de quesos, mientras que los miembros del Grupo III, en particular *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*, son encontrados en forma ocasional. El Grupo I se compone de lactobacilos que normalmente forman parte de la flora del fermento primario (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp.) (Beresford, 2003).

La mayoría de las NSLAB no crecen bien en leche, y por lo tanto no contribuyen a la producción de ácido durante el proceso de elaboración. Ellos pueden, sin embargo, crecer en el queso durante la maduración y convertirse en la microflora dominante luego de largos periodos (McSweeney, 2004). Muchas especies de lactobacilos mesófilos han sido aisladas a partir de quesos, pero las más frecuentemente encontradas son *Lactobacillus casei*/*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus curvatus* (Jordan y Cogan, 1993; Fitzsimons y col., 1999; Depouilly y col., 2004; Dolci y col., 2008).

2. Origen de las NSLAB en quesos

El origen de las NSLAB en el queso ha sido objeto de debate, dado que estos microorganismos adventicios desarrollan tanto en quesos elaborados con leche cruda, como en quesos elaborados con leche pasteurizada y cultivos primarios definidos, bajo estrictos estándares de inocuidad y calidad.

En los quesos elaborados con leche cruda, la principal fuente de NSLAB es probablemente la leche de elaboración (Beresford, 2003). Coppola y col. (2000), Berthier y

col. (2001) y Casey y col. (2006) caracterizaron la composición microbiológica de quesos Parmigiano Reggiano, Comté y Gruyère, respectivamente, y de la leche cruda utilizada en su elaboración, a fin de determinar el origen de la flora NSLAB en los quesos. En todos los casos se observó que muchas de las cepas identificadas en la leche cruda fueron aisladas posteriormente a partir del queso. Un estudio comparativo de la flora NSLAB de quesos elaborados en una misma fábrica a partir de leche cruda proveniente de dos regiones diferentes de Italia demostró que el 83% de las cepas provenían de la leche cruda, mientras que sólo el 17% restante podía atribuirse a otros orígenes tales como, equipamiento, medioambiente de la planta láctea o fermento natural de suero (Poznanski y col., 2004).

En los quesos elaborados con leche pasteurizada, las NSLAB están presentes como consecuencia de contaminaciones post-pasteurización por contacto con la superficie de equipos y utensilios, o a través de la flora residente en el medioambiente de la planta láctea (Naylor y Sharpe, 1958a; Chapman y Sharpe, 1981). Dolci y col. (2008) informaron que los *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* aislados de quesos en altos recuentos y generalmente ausentes en la leche, provienen del ecosistema de la planta láctea. Las NSLAB han sido aisladas a partir de desagües, pisos, tinas, máquina de envasado al vacío, moldes, y biofilms encontrados en diversas superficies en la industria láctea (Somers y col., 2001). Los biofilms son importantes reservorios de microorganismos dado que las bacterias que los conforman se adhieren firmemente a las superficies a través de la producción de exopolisacáridos. Estos compuestos protegen a los microorganismos al otorgarle mayor resistencia a los agentes antimicrobianos y a las soluciones desinfectantes y de limpieza (Mittelman, 1998). Somers y col. (2001) detectaron la formación de biofilms de *Lb. curvatus* en las tinas durante la elaboración de quesos Cheddar preparados con leche inoculada con esa bacteria. Asimismo, informaron que el biofilm de *Lb. curvatus* resistió a los procesos de limpieza, y contaminó los quesos de una producción subsiguiente. Agarwal y col. (2006a) detectaron biofilms de NSLAB conteniendo entre $10^2 - 10^4$ UFC/100 cm² en silos de leche cruda, equipos de ultrafiltración, zona de cheddarización y torre de queso que habían sido higienizados y desinfectados.

Sin embargo, a pesar del empleo de tinas cerradas y de la implementación de prácticas más higiénicas en la elaboración de quesos no se ha logrado evitar la contaminación con NSLAB (De Angelis y col., 2004). En base a estos resultados se postuló que otra posible fuente de estas bacterias en los quesos elaborados con leche pasteurizada, es la microflora de la leche cruda que sobrevive a la pasteurización (Jordan y Cogan, 1999). Esta hipótesis fue sustentada por McSweeney y col. (1994) quienes no detectaron presencia de lactobacilos

mesófilos en la leche luego de la pasteurización, pero observaron su desarrollo en los quesos Cheddar elaborados con dicha materia prima, bajo condiciones microbiológicas controladas. Varios investigadores han evaluado la resistencia al calor de cepas de lactobacilos mesófilos, y en muchos casos han demostrado que algunas de ellas sobreviven a la pasteurización permaneciendo en un estado de injuria celular, y que luego durante la maduración se recuperan y desarrollan en el queso (Turner y col., 1986, Martley y Crow, 1993; Jordan y Cogan, 1999; Crow y col., 2002; De Angelis y col., 2004). Turner y col. (1986) evaluaron la supervivencia de 21 cepas de NSLAB luego de la pasteurización de la leche a 72°C durante 15 s. Excepto por una cepa de *Lb. casei* que mostró una reducción de 3,5 ciclos log, los recuentos del resto de las cepas disminuyeron en 6 o más órdenes. En forma similar, De Angelis y col. (2004) observaron que el tratamiento de la leche a 72°C durante 90 s disminuyó los recuentos de una cepa de *Lb. plantarum* desde 10^7 UFC/ml hasta menos de 1 célula/ml, y que parte de la población celular recuperó luego su viabilidad durante la incubación en leche estéril a 7°C durante 20 días. Por otro lado, Christiansen y col. (2006) evaluaron la resistencia de varias cepas de *Lb. paracasei* (aisladas a partir de un queso semi-duro elaborado con leche pasteurizada) a los tratamientos térmicos de pasteurización (73°C, 15 s) y termización (60°C, 5 min), e informaron que la mayor parte de ellas sobrevivieron a los tratamientos aplicados a la leche. Sin embargo, Rynne y col. (2007), quienes elaboraron quesos Cheddar reducidos en materia grasa a partir de leche sometida a cuatro tratamientos térmicos de pasteurización (72, 77, 82, u 87°C durante 26 s), informaron que el incremento de la temperatura no afectó la supervivencia de la población NSLAB durante la maduración.

Se ha informado que la resistencia de las bacterias al calor depende de la variación genética entre las especies y cepas, y es afectada por el estado fisiológico de las células y por factores medioambientales tales como pH, actividad acuosa, contenido de sal y presencia de conservantes (Casadei y col., 2001; De Angelis y col., 2004).

Como se mencionó anteriormente, el origen de las NSLAB en los quesos constituye un tema de gran controversia. Hace unos años se consideraba que la contaminación post-pasteurización era la vía de entrada más probable de las NSLAB en quesos elaborados con leche pasteurizada. Sin embargo, gracias al advenimiento de las técnicas moleculares y estudios más recientes este concepto ha ido cambiando, y en la actualidad se considera que la hipótesis más fuerte es que las NSLAB tienen origen en la leche cruda utilizada en la elaboración de quesos, y que sobreviven a la pasteurización.

3. Factores que influyen en la velocidad de crecimiento, el recuento final y la actividad bioquímica de las NSLAB durante la maduración del queso

3.1. Fermento primario o de acidificación

El género, la especie y cepa de las bacterias ácido lácticas (LAB) utilizadas como fermento primario en la elaboración de quesos, parecen tener una importante influencia en la velocidad de crecimiento y número final alcanzado por las NSLAB, como así también en sus actividades bioquímicas durante la maduración del queso (Hynes y col., 2001a).

Thomas (1987) demostró que varias cepas de lactobacilos y pediococos aislados de quesos fueron capaces de crecer en suspensiones de células de lactococos sometidas a un tratamiento de purificación y lisis celular, y en base a estos resultados sugirió que los productos de degradación de las células del fermento primario constituyen una fuente de carbono y energía para el crecimiento de las NSLAB. Asimismo, informó que la densidad máxima alcanzada por las cepas de NSLAB estudiadas fue dependiente del fermento primario, lo que indicó que éste último puede influir en la microflora adventicia que se desarrolla durante la maduración. Crow y col. (1995) reportaron que los fermentos primarios líticos contribuyen a un incremento en el contenido de aminoácidos libres, como consecuencia de la liberación de las peptidasas intracelulares, lo que podría favorecer el crecimiento de las NSLAB. Si bien existe evidencia que sustenta esta hipótesis, varios estudios posteriores han arribado a resultados contrarios.

Lane y col. (1997a) estudiaron entre otros factores, el efecto de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* utilizadas como fermento primario en el crecimiento de las NSLAB durante la maduración de quesos Cheddar. Durante las etapas iniciales de la maduración, la velocidad de crecimiento de las NSLAB en los quesos elaborados con *L. lactis* subsp. *lactis* ML3 o 303 fue mayor que en los quesos fabricados con *L. lactis* subsp. *cremoris* AM1 o AM2, pero alcanzaron recuentos similares luego de 6 meses de maduración. Los fermentos primarios de *L. lactis* subsp. *lactis* ML3 o 303 se mantuvieron en niveles elevados en el orden de $10^8 - 10^9$ UFC/g durante todo el periodo de maduración, mientras que los recuentos de *L. lactis* subsp. *cremoris* AM1 o AM2 fueron mucho más bajos ($\sim 10^5 - 10^6$ UFC/g).

En un trabajo posterior, Hynes y col. (2001a) estudiaron el efecto de tres fermentos primarios en el crecimiento y actividad proteolítica de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* 1572, en elaboraciones de quesos miniatura de pasta lavada fabricados en condiciones microbiológicas controladas. Los fermentos primarios utilizados presentaron distintas

características: *L. lactis* subsp. *lactis* IL416 posee una alta resistencia al ataque de fagos, *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2, hospeda un profago que induce su lisis luego de la etapa de elaboración del queso, y *L. lactis* subsp. *cremoris* HP ha sido calificado como un fermento que produce quesos amargos. Los autores informaron que el cultivo adjunto de *Lb. plantarum* creció en la misma extensión en quesos elaborados con *L. lactis* subsp. *lactis* IL416 y *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2; el recuento del primer fermento fue 2 ciclos logarítmicos mayor que el del segundo. De manera similar a lo observado por Lane y col. (1997a), los resultados de este trabajo indicaron que la cepa lítica (AM2) no favoreció el crecimiento de los lactobacilos. En los quesos elaborados con la cepa HP, la velocidad de crecimiento del cultivo adjunto fue menor; sin embargo, éste alcanzó un recuento mayor hacia el final del periodo de maduración. Por otra parte, los investigadores reportaron que la actividad proteolítica del cultivo adjunto de *Lb. plantarum* 1572 varió de acuerdo a la cepa de fermento primario utilizada, lo que indicó que el fermento primario no solo influye en el desarrollo de los lactobacilos, sino también en sus actividades bioquímicas durante la maduración.

En un trabajo similar, Hannon y col. (2003) elaboraron quesos Cheddar con tres fermentos primarios que diferían en cuanto sus propiedades autolíticas. Uno de los fermentos se compuso por *L. lactis* subsp. *lactis* 223 y *L. lactis* subsp. *cremoris* 227 caracterizados por presentar baja capacidad autolítica, otro de los fermentos consistió en una cepa altamente autolítica de *Lb. helveticus* DPC4551, y el último fermento consistió en una combinación de cepas de *L. lactis* (223 y 227) y *Lb. helveticus*. Los autores informaron que los quesos elaborados con la cepa altamente autolítica presentaron mayor contenido de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (NS-PTA) y de aminoácidos libres; sin embargo, los recuentos de las NSLAB adventicias en estos quesos fueron ~ 4 a 5 ciclos logarítmicos menores que en los quesos fabricados con las cepas de baja actividad lítica. El menor recuento de NSLAB no puede atribuirse a la producción de bacteriocinas por parte de la cepa de *Lb. helveticus* dado que ésta no presentó actividad inhibitoria contra lactobacilos o lactococos.

Por otra parte, en el trabajo desarrollado por Bourdat-Deschamps y col. (2004), las NSLAB adventicias crecieron en la misma extensión en los quesos elaborados con un fermento primario altamente autolítico (*L. lactis* subsp. *cremoris* AM2) y con su derivado isogénico no lítico obtenido por eliminación del profago, a pesar de que la concentración de aminoácidos libres fue mayor en los primeros.

Contrariamente a lo observado por Thomas (1987), los trabajos citados indicaron que la muerte y posterior lisis de las células del fermento primario no favorece el crecimiento de los lactobacilos adventicios.

En un enfoque diferente, Di Cagno y col. (2003a) evaluaron el efecto de las proteinasas de pared parcialmente purificadas de distintos fermentos primarios, sobre el crecimiento y actividad proteolítica de una cepa de *Lb. plantarum* DPC2741, tanto *in vitro* como en un *slurry* de queso. En leche descremada reconstituida, la mayoría de las proteinasas estudiadas promovieron un incremento en el recuento de *Lb. plantarum* y estimularon la producción de aminoácidos libres. En particular, la cepa estudiada mostró una mayor velocidad de crecimiento y una menor fase de latencia en presencia de las proteinasas de *Lb. helveticus* PR4 y *L. Lactis* subsp. *cremoris* ST2. Por otra parte, en el *slurry* de queso, todas las proteinasas estudiadas favorecieron el crecimiento de *Lb. plantarum* DPC2741, incrementaron la concentración de aminoácidos, y modificaron los perfiles peptídicos y de aminoácidos libres individuales. Los investigadores concluyeron que las proteinasas de las bacterias del fermento primario pueden influir en forma diferente en el crecimiento de las NSLAB, y que varias combinaciones de estas enzimas y las NSLAB, afectan en gran medida los perfiles de péptidos y aminoácidos.

Los estudios más recientes relacionados a este tema, sugieren que las cepas de fermentos primarios altamente proteolíticas, más que las cepas autolíticas, estimulan el crecimiento de los lactobacilos durante la maduración del queso (Lane y col., 1997a; Hynes y col., 2001a; Di Cagno y col., 2003a; Hannon y col., 2003).

Por otra parte, un estudio reciente se ha centrado en el estudio de la capacidad de degradación de citrato, asparragina y aspartato de una cepa de *Lb. plantarum* INF15D en combinación con tres fermentos primarios (mesófilo heterofermentante con capacidad de degradar citrato o Cit^+ , mesófilo homofermentante Cit^- y termófilo), en elaboraciones de quesos de pasta lavada (Skeie y col., 2008a). Los autores reportaron que la degradación de citrato y aspartato por parte del cultivo adjunto de *Lb. plantarum* en los quesos, varió de acuerdo al tipo de fermento primario utilizado. En los quesos elaborados con fermento primario Cit^+ , el citrato fue metabolizado fundamentalmente a diacetilo y acetoína por acción del fermento primario, mientras que la degradación del mismo a asparragina por parte del cultivo adjunto fue menos extensa. Por el contrario, en los quesos elaborados con fermento primario Cit^- , *Lb. plantarum* degradó el citrato principalmente a aspártico, que fue posteriormente metabolizado a acetoína y diacetilo, mientras que en presencia del fermento primario termófilo degradó el citrato fundamentalmente a ácido succínico.

Los estudios citados demuestran que el fermento primario influye tanto en el crecimiento como en las actividades bioquímicas de los lactobacilos durante la maduración del queso.

3.2. Factores ambientales

El queso constituye un medio ambiente hostil para el crecimiento bacteriano dado que posee un pH bajo (4,9 – 5,3), un alto contenido de sal (4 – 6% de sal en la humedad), un contenido de humedad relativamente bajo (< 50%), carece de azúcares fermentables, madura a bajas temperaturas (~ 7 – 15°C) y es anaeróbico (Fox y col., 1996; Wouters y col., 2002). Sin embargo, las NSLAB son capaces de crecer bajo estas condiciones adversas, mientras las poblaciones de la mayor parte de otros microorganismos decrecen.

3.2.1. Temperatura

Numerosos trabajos han abordado el estudio de la influencia de la temperatura de maduración sobre el crecimiento de las NSLAB. Se ha demostrado que la disminución de la temperatura de maduración, como así también el enfriamiento rápido de la cuajada luego de la etapa de prensado, constituyen unos de los factores principales que inhiben el crecimiento de las NSLAB en los quesos. Los trabajos de investigación relacionados a este tema serán discutidos en profundidad más adelante.

3.2.2. Sal en la humedad

En un estudio desarrollado por Jordan y Cogan (1993) se demostró que los lactobacilos adventicios presentan una elevada tolerancia a la sal, siendo algunas cepas capaces de crecer en presencia de concentraciones de NaCl tan altas como 10%.

Lane y col. (1997a) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de sal en la humedad sobre la velocidad de crecimiento y número final alcanzado por la población de NSLAB. Estos autores informaron que los valores de sal en la humedad comprendidos entre 2,85 – 5,93% no influyeron en el crecimiento de las NSLAB durante la maduración. Por el contrario, un contenido de sal en la humedad de 6,09% disminuyó la velocidad de crecimiento de las NSLAB hasta los 4 meses, pero no afectó el número alcanzado hacia el final del periodo de maduración (6 meses). Estos investigadores concluyeron que el contenido de sal en la humedad no influye significativamente en el desarrollo de las NSLAB, siempre que los valores estén dentro del rango normal establecido para quesos Cheddar.

3.2.3. Contenido de humedad

Lane y col. (1997a) reportaron que los valores de humedad comprendidos dentro del rango normal (35 – 39%) para queso Cheddar, no influyen en la velocidad de crecimiento y número final de las NSLAB. Asimismo, informaron que en los quesos con un elevado contenido de humedad, las NSLAB presentaron una fase de latencia más corta, pero luego de esta etapa la velocidad de crecimiento fue independiente de la humedad.

3.2.4. Fuente de energía

El hecho de que las NSLAB desarrollan durante la maduración del queso alcanzando niveles elevados, mientras que los recuentos de la mayoría de las otras bacterias decrecen, ha fomentado la investigación acerca de la fuente de energía que sustenta su crecimiento en un medio ambiente prácticamente desprovisto de carbohidratos fermentables.

Si bien la lactosa es una potencial fuente de energía, su nivel residual en el queso es generalmente bajo en el momento en que las NSLAB se establecen, siendo completamente degradada dentro de los 8 a 20 días, debido a que es metabolizada por el fermento primario (Martley y Crow, 1993). El crecimiento de los lactobacilos adventicios y el mantenimiento de recuentos elevados durante las etapas finales de la maduración, cuando la lactosa ha sido completamente degradada, respaldan la teoría de que la misma no constituye la principal fuente de energía (Fox y col., 1998; Banks y Williams, 2004). Williams y col. (2000) señalaron que probablemente la lactosa actúa como una importante fuente de energía para las NSLAB en las etapas iniciales de la maduración. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en quesos Cheddar elaborados con distintas concentraciones de lactosa (normal, reducida e incrementada), Shakeel-Ur-Rehman y col. (2004) observaron que la evolución de la población NSLAB fue similar en todos los quesos, y sugirieron que la lactosa no es necesaria para el crecimiento de estos microorganismos en el queso.

Por otra parte, algunos investigadores han sugerido que el citrato, que está presente en el queso Cheddar inmaduro en una concentración de ~8 mmol/Kg, es probablemente la fuente de energía para el crecimiento de las NSLAB (Thomas, 1987; Jimeno y col., 1995). Thomas (1987) demostró que varias cepas de *Lb. plantarum* metabolizaron el citrato durante la maduración de queso Cheddar. Asimismo, De Figueroa y col. (2000) señalaron que varias cepas de *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum* utilizaron citrato como única fuente de energía cuando crecieron en un medio complejo. Recientemente, Díaz-Muñiz y Steele (2006), demostraron que *Lb. casei* fue capaz de degradar citrato en un extracto de queso Cheddar,

mientras que Skeie y col. (2008b) informaron que *Lb. plantarum* INF15D y *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* INF448 metabolizaron el citrato residual en un queso tipo Holanda de pasta lavada. En los quesos tipo Suizos y Cheddar, donde se utilizan fermentos primarios homofermentantes citrato negativo, la degradación del citrato se ha atribuido a la presencia de NSLAB heterofermentantes facultativas (Fox y col., 2000; Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2004). Sin embargo, Jordan y Cogan (1993) informaron que a pesar de que las NSLAB alcanzaron altas densidades en el queso Cheddar, se observó una escasa o nula degradación del citrato. Fryer (1970) encontró que siete cepas de *Lb. casei* y nueve de diez cepas de *Lb. plantarum* aisladas de queso fueron citrato negativo. En los quesos tipo Holanda, que se elaboran con cultivos primarios tipo DL (compuestos por cepas de *Leuconostoc* spp. y de lactococos citrato positivo) que metabolizan rápidamente el citrato, las NSLAB se desarrollan rápidamente, alcanzando altas densidades (Adamberg y col., 2005). Palles y col. (1998) informaron que las cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* estudiadas fueron capaces de metabolizar el citrato en presencia o ausencia de azúcares fermentables a pH similar al del queso. En forma análoga, Díaz-Muñiz y col. (2006) informaron que *Lb. casei* ATCC334 fue capaz de utilizar el citrato en ausencia de otra fuente de energía que sea más rápidamente degradada, como la lactosa. Asimismo, estos investigadores observaron que en un medio químicamente definido con limitada concentración de carbohidratos, el crecimiento de la cepa de lactobacilo estudiada se incrementó concomitantemente con la utilización de citrato. Si bien numerosos trabajos han demostrado que ciertas especies de NSLAB presentan capacidad para metabolizar citrato, varios investigadores (Kennes y col., 1991; Palles y col., 1998; Williams y col., 2000; Adamberg y col., 2005) coinciden en que el mismo no puede ser considerado una fuente de energía importante para su desarrollo en el queso.

El glicerol también ha sido indicado como posible fuente de carbono para las NSLAB. Cantoni y Molna (1967) demostraron que algunos lactobacilos homofermentantes metabolizaron el glicerol a lactato y otros metabolitos por medio de la vía de la manosa fosfato. Sin embargo, otros investigadores informaron que las cepas de *Lb. paracasei* estudiadas no fueron capaces de degradar el glicerol (Williams y col., 2000).

Se ha demostrado que algunas cepas de lactobacilos mesófilos poseen actividad glicósido hidrolasa (Williams y Banks, 1997) y que por lo tanto, pueden obtener energía de los carbohidratos liberados a partir del caseinomacropéptido de la κ -caseína (galactosa, N-acetilgalactosamina, ácido N-acetilneuramínico), de las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana del glóbulo graso (galactosa, manosa, mucosa, N-acetilglucosamina, N-

acetilgalactosamina, ácido N-acetilneuramínico) y de la lisis de las células del fermento primario (ribosa, desoxiribosa N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico).

Thomas (1987) y Rapposch y col. (1999) señalaron que la ribosa proveniente de los ácidos nucleicos de las células del fermento primario representa una importante fuente de carbono para el crecimiento de las NSLAB en el queso. Sin embargo, Westby y col. (1993) informaron que varias cepas de lactobacilos, pediococos y leuconostoc no fueron capaces de crecer en un medio que contenía D-ribosa como única fuente de carbohidrato fermentable, y que ésta sí fue metabolizada en presencia de glucosa. Un estudio posterior llevado a cabo por Fitzsimons y col. (1999) indicó que muchas de las NSLAB aisladas a partir de queso Cheddar maduro fueron incapaces de fermentar la ribosa, indicando que otras fuentes de carbono deben ser también utilizadas por las NSLAB para su crecimiento en el queso.

Williams y col. (2000) informaron que el 58%, 48% y 22% de las NSLAB aisladas a partir de queso Cheddar metabolizaron, respectivamente, ribosa, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico, derivados de los ácidos nucleicos y de la deglicosilación de las caseínas. En un trabajo más reciente, Adamberg y col. (2005) señalaron que el 46% de las cepas aisladas a partir de un queso Danés semi-duro fueron capaces de crecer en presencia de ribosa. Asimismo, estos investigadores informaron que las NSLAB metabolizaron los carbohidratos provenientes del caseínomacropéptido de la κ -caseína, de las glicoproteínas de la membrana del glóbulo graso (galactosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina) y de los peptidoglicanos de las paredes celulares bacterianas. Por otra parte, Rynne y col. (2007) reportaron que la velocidad de crecimiento de las NSLAB en quesos Cheddar reducidos en materia grasa fue más lenta que en aquellos elaborados con leche entera, y atribuyeron este fenómeno al menor contenido de materia grasa en los quesos, y en consecuencia, a una disminución del material de la membrana del glóbulo graso.

Algunos investigadores afirmaron que los péptidos y aminoácidos presentes en el queso no pueden ser utilizados por las NSLAB como fuente de energía, dado que representan sólo una fuente nitrógeno (Fox y col., 1998). Sin embargo, varios estudios han demostrado que las NSLAB pueden utilizar hidrolizados de proteínas, péptidos y aminoácidos como fuente de energía en presencia de un aceptor de grupo amino (Tammam y col., 2000; Williams y col., 2000; Laht y col., 2002). Se ha postulado (Kristoffersen, 1956; Stuart y col., 1999) que la serina puede actuar como una fuente de energía para las LAB dado que su metabolismo vía piruvato a acetato genera ATP. Kieronczyk y col. (2001) informaron que las células de *Lb. plantarum* INF15D en fase estacionaria metabolizaron la serina en un buffer que contenía sólo aminoácidos libres, sin disponibilidad de otra fuente de energía.

Hasta el momento, la fuente de energía utilizada por los lactobacilos mesófilos en el queso no ha sido claramente definida. Los resultados reportados demuestran que las NSLAB son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos, y por lo tanto, es probable que no dependan de una fuente única de energía para sostener su crecimiento en el queso (Beresford, 2003). La lactosa residual, sin embargo, parece jugar un rol importante en el crecimiento de este grupo microbiano en las etapas iniciales de la maduración.

4. Crecimiento de las NSLAB en quesos

Las bacterias del fermento primario constituyen la microflora dominante durante el proceso de elaboración en todos los tipos de quesos, con recuentos que generalmente alcanzan niveles de $10^8 - 10^9$ UFC/g de cuajada al comienzo de maduración. Sin embargo, la población del fermento primario generalmente declina con el avance de la maduración, debido a factores ambientales tales como disminución del contenido de humedad, del pH y baja temperatura de maduración, junto a una concentración relativamente elevada de sal (McSweeney y col., 1994; Banks y Williams, 2004). La velocidad a la cual las células del fermento primario mueren y sufren lisis es característica de la especie y de la cepa, pero normalmente los recuentos de bacterias viables declinan hasta aproximadamente un 1% de los valores máximos durante el primer mes de maduración, especialmente para los fermentos mesófilos (McSweeney y col., 1994). Al mismo tiempo que las bacterias del fermento declinan, la población de las NSLAB adventicias comienza a desarrollarse desde recuentos muy bajos ($10^1 - 10^4$ UFC/g) en la cuajada hasta valores de $10^7 - 10^8$ UFC/g de queso luego de las primeras semanas de maduración (Peterson y Marshall, 1990; McSweeney y col., 1993). Los lactobacilos adventicios desarrollan en todas las variedades de quesos y generalmente dominan la microflora bacteriana viable de los quesos maduros. Si bien los recuentos máximos alcanzados por las NSLAB se mantienen en niveles relativamente estables durante toda la maduración, su composición no es estática sino que se verifican modificaciones en las proporciones de especies y cepas.

Numerosos trabajos de investigación se han abocado al estudio de la diversidad y evolución de la flora NSLAB durante la maduración de quesos. El estudio del ecosistema microbiano en el queso resulta de gran utilidad para numerosas aplicaciones, a saber: **i)** diferenciación de quesos, **ii)** estudio de los efectos de parámetros tecnológicos seleccionados sobre las diferencias específicas en la flora microbiana, **iii)** monitoreo de la dinámica de la microflora en fermentaciones donde intervienen poblaciones mixtas, **iv)** evaluación de la

contribución real de especies y cepas a la maduración del queso, y, en general, v) obtención de información acerca de la diversidad de una población adventicia numerosa (De Angelis y col., 2001).

Jordan y Cogan (1993) informaron que la población adventicia de NSLAB en quesos Cheddar irlandeses comerciales de 8 semanas de maduración se compuso de 55% *Lb. paracasei*/*Lb. casei*, 28% *Lb. plantarum* y 14% *Lb. curvatus*. Un estudio similar conducido por Fitzsimons y col. (1999), reveló que la cepa predominante en quesos Cheddar irlandeses maduros (9 – 24 meses de maduración) fue *Lb. paracasei* (96,4%), mientras que *Lb. plantarum* (2,1%), *Lb. curvatus* (0,3%) y *Lb. brevis* (0,3%) fueron encontrados en menor porcentaje. En el primer estudio la identificación de las especies y cepas bacterianas se llevó a cabo mediante ensayos fenotípicos, mientras que en el segundo se utilizó el método RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction*), que a diferencia del anterior permite manipular grandes cantidades de aislamientos. Por otra parte, en quesos Cheddar maduros elaborados en el Reino Unido *Lb. paracasei* y *Lb. brevis* representaron el 52,7% y el 25,8%, respectivamente, de los aislamientos identificados; *Lb. plantarum* (10,5%) y *Lb. curvatus* (5,6%) también fueron encontrados aunque en menor proporción (Williams y col., 2002).

Medina y col. (2001) estudiaron la composición de la flora ácido láctica de un queso semi-duro elaborado en el norte de Argentina a partir de leche de oveja cruda sin la adición de cultivos primarios. En los quesos de 30 días de maduración las especies más frecuentemente aisladas fueron *Lb. plantarum* (93%), *Lb. acidophilus* (5%) y *Lb. casei* (2%). En los quesos Roncal e Idiazábal, elaborados también con leche de oveja, *Lb. casei* (52,6%) y *Lb. plantarum* (30%) fueron las especies predominantes (Arizcum y col., 1997), mientras que en tres quesos ovinos italianos *Lb. curvatus* fue la especie mayoritaria, seguida de *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium* en Pecorino Romano, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y *E. faecium* en Fiore Sardo, y *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, y *Leuconostoc* spp. en Canestrato Pugliese (Di Cagno y col., 2003b).

Bude-Ugarte y col. (2006) aislaron diversas cepas lactobacilos de origen NSLAB a partir de quesos Argentinos de buena calidad, y las identificaron mediante RAPD-PCR. Los lactobacilos aislados de quesos blandos y semi-duros (Cremoso y Tybo) elaborados con leche pasteurizada fueron identificados como *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* y *Lb. plantarum*. En quesos semi-duros elaborados con leche cruda las especies identificadas fueron *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum* y *Lactobacillus perolens*.

En cuanto a quesos duros de pasta cocida, en un estudio llevado a cabo en queso Parmigiano Reggiano se informó que las LAB termófilas, integrantes del fermento de suero natural, desaparecieron dentro de los 30 días de maduración, mientras que la flora NSLAB, compuesta por lactobacilos mesófilos (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*, *Lb. rhamnosus*) y pediococos, se incrementó progresivamente hasta los 5 meses de maduración (Coppola y col., 2000). Gala y col. (2008), también estudiaron la diversidad de la microflora láctica en quesos Parmigiano Reggiano de 12 meses de maduración, e informaron que las cepas más frecuentemente aisladas pertenecían a la especie *Lb. casei*. Por otra parte, en un queso italiano de pasta hilada (Caciocavallo) la microflora se compuso principalmente por lactobacilos mesófilos, siendo *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, y *Lb. plantarum* las especies más frecuentemente aisladas (Piraino y col., 2005).

Dolci y col. (2008), quienes estudiaron la composición microbiana del queso Castelmagno (queso Italiano con denominación de origen controlada), informaron que *Lb. plantarum* y *Lb. paracasei* dominaron la microflora de los quesos maduros.

Berthier y col. (2001) y Depouilly y col. (2004) informaron que *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus* fueron las especies más frecuentemente aisladas a partir de quesos Comté, mientras que *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus* predominaron en quesos tipo Gruyère (Casey y col., 2006).

Lb. plantarum y en menor proporción *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paraplantarum* fueron los microorganismos más comúnmente aislados a partir de queso Feta (Manolopoulou y col., 2003), mientras que *Lb. plantarum* y *Lb. brevis* fueron los principales lactobacilos identificados en queso Afuera'l Pitu (Cuesta y col. 1996).

Kongo y col. (2007) informaron que las especies más frecuentemente aisladas a partir de queso São Jorge fueron *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *E. faecalis* y *E. faecium*.

En síntesis, las colonias más frecuentemente aisladas, especialmente a partir de quesos de pasta semi-dura y dura elaborados con leche pasteurizada, pertenecen a las especies *Lb. casei* y *Lb. paracasei*. En los quesos elaborados con leche cruda, ya sea de vaca o de oveja, se evidencia una mayor diversidad, y *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* y *Lb. rhamnosus* suelen ser los aislamientos más frecuentes.

Por otra parte, otros factores además de la tecnología de elaboración y el tipo de queso contribuyen a la diversidad de la población NSLAB, como el tiempo de maduración (Demarigny y col., 1996; Zárate y col., 1997; Fitzsimons y col., 2001; Gobetti y col., 2002; Williams y col., 2002; Veljovic y col., 2007), la región geográfica de elaboración (Mannu y col., 2000; De Angelis y col., 2001), y la fábrica (Mannu y col., 2000; Williams y col., 2002;

Henri-Dubernet y col., 2004; Sánchez y col., 2005) o, incluso, el lote de procedencia (Mannu y col., 2000; Williams y col., 2002). Las variaciones estacionales también han sido consideradas un importante factor por su influencia en la composición de la flora NSLAB (Mannu y col., 2000).

Un estudio llevado a cabo en queso miniatura tipo Suizo elaborado con leche cruda reveló fluctuaciones en el ecosistema microbiano durante la maduración (Demarigny y col., 1996). En efecto, en los quesos inmaduros la población de NSLAB se compuso por especies de *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. rhamnosus*, pero sólo dos subespecies de *Lb. paracasei* dominaron la microflora de los quesos luego de 24 semanas de maduración.

Lb. plantarum (56,9%) y *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (37,2%) fueron las principales especies aisladas a partir de queso de cabra Tenerife. *Lb. plantarum* predominó en los quesos de dos días y luego disminuyó durante la maduración, mientras que *Lb. paracasei*, inicialmente presente en bajas densidades, se convirtió en la especie dominante en quesos de 60 días de maduración (Zárate y col., 1997).

Fitzsimons y col. (2001) evaluaron la distribución espacial y la diversidad de las NSLAB dentro y entre bloques de quesos, como así también, la dinámica de la población durante la maduración de queso Cheddar irlandés. Los investigadores informaron que las cepas de NSLAB se distribuyeron de manera uniforme en toda la masa del queso, dado que se encontraron las mismas cepas bacterianas en las distintas zonas del queso analizadas. *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* y otras cepas no identificadas fueron los microorganismos dominantes hasta los seis meses de maduración; a partir de entonces, sólo cepas de *Lb. paracasei* fueron aisladas del queso.

Gobetti y col. (2002) también verificaron un cambio en la población NSLAB de queso Cacciocavallo Pugliese. Luego de 1 día de maduración *Lb. delbrueckii*, procedente del fermento primario, dominó la microflora del queso, y también se detectaron cepas de *E. durans* y *E. faecalis*. Sin embargo, en periodos de maduración más prolongados (42 y 60 días) las especies predominantes fueron *Lactobacillus parabuchneri* y *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Veljovic y col. (2007) observaron variaciones temporales en la flora NSLAB de queso Zlatar (queso artesanal elaborado con leche cruda sin la adición de cultivos primarios) en particular en relación a la proporción de cocos y bacilos. Los lactococos constituyeron la población bacteriana predominante al comienzo de la maduración, pero luego de 20 a 30 días los lactobacilos dominaron la microbiota del queso.

Recientemente, Mangia y col. (2008) identificaron la microflora autóctona de queso Fiore Sardo, un producto de denominación de origen controlada, elaborado con leche cruda entera de oveja. Los autores reportaron que la microflora láctica típica de esta variedad de queso se compuso principalmente por LAB mesófilas tales como, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum*, y *Lb. casei* subsp. *casei*. *Lb. plantarum* fue la especie predominante durante los primeros 150 días de maduración, pero luego su recuento declinó en favor de *Lb. brevis* y *Lb. casei*, quienes dominaron en las etapas más tardías de la maduración.

Los principales cambios temporales en la población NSLAB parecen consistir en una simplificación del ecosistema, con un predominio de la especie *Lb. plantarum* al inicio de la maduración, y de la especie *Lb. paracasei* en las etapas finales de la misma.

Dichas modificaciones probablemente son consecuencia de la evolución de las condiciones medioambientales y de la presencia de nutrientes en el queso. Como se indicó anteriormente, los factores medioambientales y composicionales afectan la velocidad de crecimiento de los lactobacilos no fermento en el queso (Lane y col., 1997a). Asimismo, la disponibilidad de sustratos fermentables en el queso varía a lo largo de la maduración, lo que influye en la heterogeneidad y en la dinámica de la población de los lactobacilos mesófilos durante este periodo (Williams y col., 2000; Beresford, 2003). Las cepas con mayor capacidad para utilizar los sustratos de crecimiento disponibles inicialmente dominarían la microflora del queso al principio, pero luego declinarían cuando esta fuente de energía se agote, para dar lugar al predominio de especies y cepas capaces de metabolizar otros sustratos (Williams y col., 2002).

Con respecto a las variaciones en la flora NSLAB de acuerdo al lugar de elaboración del queso, se han reportado varios trabajos.

El queso Pecorino es un tipo de queso Italiano que se elabora a partir de leche de oveja; existe una gran variedad de Pecorinos (Pecorino Romano, Pecorino Sardo, etc.), la mayoría de los cuales se elabora con leche cruda y sin cultivos primarios seleccionados. La microflora de este queso tradicional se compone principalmente de lactobacilos mesófilos que contribuyen en forma notable al desarrollo de textura y *flavor* típicos (De Angelis y col., 2001). En un estudio sobre diferentes quesos italianos del tipo Pecorino elaborados en distintas regiones, y dentro de una misma región en distintas fábricas, en general, los lactobacilos aislados pertenecieron a las especies *Lb. plantarum* (32%), *Lb. brevis* (15%), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (12%), *Lb. curvatus* (9%), *Lb. fermentum* (6%), *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. pentosus* (5%), *Lb. casei* subsp. *pseudopplantarum* (3%), y *Lb. rhamnosus* (1%). Los autores informaron

que la composición de la flora NSLAB varió de acuerdo a la región geográfica y a los factores tecnológicos (De Angelis y col., 2001).

Por otra parte, Mannu y col. (2000) observaron que en el queso ovino Fiore Sardo procedente de tres fábricas, se encontraron diferencias en la composición y evolución de los lactobacilos mesófilos; en los quesos elaborados en dos de ellas *Lb. paracasei* dominó la microflora del queso, mientras que en la restante, la especie encontrada en mayor proporción fue *Lb. plantarum*.

Henri-Dubernet y col. (2004) compararon el ecosistema microbiano de quesos Camembert de Normandía elaborados en cuatro fábricas diferentes y reportaron que en una de ellas *Lb. plantarum* fue la especie dominante, mientras que en el resto predominó *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Sánchez y col. (2005) también encontraron diferencias en la composición de las especies de lactobacilos en muestras de queso de cabra español pertenecientes a diferentes fábricas, si bien *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* fue la cepa predominante en todas las muestras.

En un estudio llevado a cabo en quesos Cheddar elaborados en el Reino Unido, se encontraron diferencias en la composición de la población de NSLAB no sólo entre quesos elaborados en distintas fábricas sino también en aquellos fabricados dentro de una misma fábrica, ya sea en diferentes tinas durante el mismo proceso de producción, como en la misma tina pero en distintos procesos de producción (Williams y Banks, 1997; Williams y col., 2002).

Los trabajos citados indican que la composición de la población de lactobacilos mesófilos en los quesos difiere de acuerdo al lugar de elaboración. Esas diferencias probablemente son el resultado de variaciones estacionales, como así también, de diferencias en la composición microbiológica de la leche cruda y en los ecosistemas residentes en las distintas fábricas.

5. Métodos utilizados para estudiar la influencia de las NSLAB en la calidad del queso

Existen varias alternativas para el estudio *in situ* de la influencia de las NSLAB en la maduración de quesos. Entre los principales pueden citarse la adición de antibióticos y el empleo de fermentos primarios productores de bacteriocinas para evitar su crecimiento, la manipulación de la temperatura de maduración, la preparación de pseudo cuajadas o “*shurries*” de quesos (pastas de queso o cuajadas esterilizadas y adicionadas con las bacterias en estudio), y la fabricación de quesos con la adición de fermentos adjuntos (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000a; Beresford, 2003).

5.1. Adición de antibióticos

Las bacterias del fermento primario metabolizan la lactosa con producción de ácido láctico durante la elaboración del queso, pero su actividad metabólica es inhibida en la etapa de salado. Así, se sugirió que la población de las NSLAB adventicias que desarrollan durante la maduración, podría ser controlada mediante la adición de antibióticos a la cuajada en la etapa de salado, a fin de no interferir con la actividad acidificante del fermento primario (Beresford, 2003).

Si bien la adición de antibióticos representa una técnica sencilla para reducir el crecimiento y la influencia de las NSLAB, se ha sugerido que pueden repercutir en el sabor del queso y perder su actividad bactericida durante la maduración (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000a). Otra gran desventaja de esta aplicación radica en que los antibióticos pueden ser sólo efectivos contra ciertas especies o cepas de NSLAB, e incluso, pueden acelerar la lisis de las células del fermento primario dificultando la interpretación de los resultados. Varios estudios (O'Donovan y col., 1996; Walsh y col., 1996; Shakeel-Ur-Rehman y col., 1999) han abordado el estudio de las NSLAB mediante el uso de antibióticos, y si bien el recuento de lactobacilos adventicios fue menor en los quesos tratados con antibióticos respecto a los controles, presentaron un mayor contenido de aminoácidos. Algunos autores atribuyeron este hecho a la mayor lisis de las células del fermento primario (Shakeel-Ur-Rehman y col., 1999), mientras que otros sugirieron que las NSLAB presentes en los quesos controles utilizaron los aminoácidos como sustratos de crecimiento, reduciendo su concentración en estos quesos (O'Donovan y col., 1996).

5.2. Empleo de fermentos primarios productores de bacteriocinas

Una alternativa al uso de antibióticos exógenos para controlar el crecimiento de las NSLAB, es la adición, ya sea como fermento primario o como adjuntos, de cultivos de LAB productoras de bacteriocinas. Se han realizado varios estudios en los que se utilizaron distintas cepas de lactococos productoras de bacteriocinas, con el objeto de controlar el crecimiento de las NSLAB, pero a su vez, de incrementar la lisis de las células del fermento primario, a fin de acelerar el proceso de maduración e incrementar el aroma y sabor de los quesos (Martínez-Cuesta, 1998; Oumer y col., 2001; Morgan y col., 2002; O'Sullivan y col., 2003). Sin embargo, para abordar el estudio de las NSLAB en la calidad del queso, es necesario que los fermentos productores de bacteriocinas que se adicionan como adjuntos, no interfieran con la supervivencia del cultivo primario o de acidificación. Se ha informado que

la adición de cultivos adjuntos productores de bacteriocinas, puede retardar el crecimiento del fermento primario, y en consecuencia, la producción de ácido láctico, y afectar las características sensoriales del queso (Morgan y col., 1997; Oumer y col., 2001). La presencia de varios fermentos en el ecosistema hace que los resultados resulten difíciles de interpretar.

Morgan y col., (1997) utilizaron una cepa de productora de bacteriocina (*L. lactis* subsp. *lactis* DPC3286) como adjunto en elaboraciones de queso Cheddar, empleando como fermento primario *L. lactis* subsp. *cremoris* HP. Estos autores informaron que el uso de la cepa DPC3286 no previno el desarrollo de las NSLAB durante la maduración, pero indujo la lisis del fermento primario. Ryan y col. (1996) informaron que la adición de *L. lactis* productora de lacticina 3147 - una bacteriocina de amplio espectro - disminuyó significativamente los recuentos de las NSLAB adventicias durante la maduración de queso Cheddar. En otro estudio desarrollado por Fenelon y col. (1999), se elaboraron quesos Cheddar reducidos en materia grasa empleando como fermento primario la misma cepa caracterizada por Ryan y col. (1996), a fin de inhibir el crecimiento de las NSLAB. El recuento de los lactobacilos adventicios en los quesos elaborados con fermento productor de lacticina 3147 fue 5 órdenes log menor que en los quesos controles elaborados con fermento primario común, lo que confirmó la eficiencia de la lacticina 3147 en inhibir la flora NSLAB en las condiciones de estudio.

Una ventaja que presentan los fermentos productores de bacteriocinas respecto a los antibióticos, es que pueden ser utilizados comercialmente para controlar la proliferación de las NSLAB. Sin embargo, estos cultivos pueden producir alteraciones durante el proceso de elaboración, tales como: disminución de la velocidad de acidificación de la cuajada, con un concomitante incremento de la lactosa residual, si ejercen un efecto inhibitorio sobre el fermento primario (Fox, 1996; Oumer y col., 2001; O'Sullivan, 2003), o por el contrario, cambios en la composición química del queso, si contribuyen a la producción de ácido durante la elaboración, especialmente cuando se adicionan como adjuntos con el fermento primario y no exhiben antagonismo alguno con dicha población bacteriana.

5.3. Manipulación de la temperatura de maduración

La temperatura es el principal factor que controla el crecimiento bacteriano en todos los tipos de quesos, tanto durante la etapa de elaboración como durante el proceso de maduración.

Martley y Crow (1993), estudiaron el efecto de tres temperaturas de maduración diferentes (5, 10 ó 15°C) sobre el crecimiento de las NSLAB en quesos Colby (una variedad similar al

Cheddar que incluye lavado de la cuajada y salado en seco). El recuento inicial de las NSLAB en todos los quesos fue inferior a 10^2 UFC/g. En los quesos madurados a 15°C , las NSLAB crecieron rápidamente alcanzando niveles de $\sim 10^7$ UFC/g luego de 2 meses de maduración. Este aumento fue más lento en los quesos madurados a 10°C (10^6 UFC/g a los 2 meses, 10^7 UFC/g luego de 3 meses), mientras que en los quesos madurados a 5°C , las NSLAB permanecieron por debajo de 10^5 UFC/g luego de 4 meses de maduración.

En un estudio similar pero llevado a cabo en queso Cheddar, Cromie y col. (1987) compararon el efecto de diferentes temperaturas de maduración (8 , 15 , $17,5$ ó 20°C) sobre el desarrollo de las NSLAB. Estos autores informaron que el recuento de las NSLAB se incrementó rápidamente durante las primeras 4 semanas de maduración a 15 , $17,5$ ó 20°C , mostrando luego un incremento más lento hasta alcanzar valores de 10^8 UFC/g. En los quesos madurados a 8°C la velocidad de crecimiento de las NSLAB fue menor, y estos microorganismos alcanzaron recuentos de $\sim 10^7$ UFC/g luego de 32 semanas de maduración.

Utilizando un enfoque diferente, Shakeel-Ur-Rehman y col. (2000b, 2000c) evaluaron el efecto de dos temperaturas de maduración (1 y 8°C) sobre el crecimiento de las NSLAB en quesos Cheddar elaborados con leche cruda o pasteurizada, a fin de determinar la influencia de la flora adventicia en la proteólisis, lipólisis y características sensoriales. En los quesos madurados a 1°C , el recuento de las NSLAB luego de 4 y 6 meses de maduración fue aproximadamente 3 y 2 órdenes log menor, respectivamente, que en los quesos madurados a 8°C . La maduración a 1°C disminuyó notablemente la velocidad de crecimiento y número final de las NSLAB en el queso.

Por otro lado, Fox y col. (1993) informaron que la velocidad de enfriamiento de la cuajada luego de la etapa del prensado, es el principal factor que determina el crecimiento de las NSLAB en el queso. Folkertsma y col. (1996) estudiaron el efecto de la velocidad de enfriamiento de la cuajada, rápida (15 hs) o lenta (8 días), y de la maduración a tres temperaturas (8 , 12 ó 16°C), sobre los perfiles proteolíticos/ lipolíticos y las características sensoriales de queso Cheddar comercial. Estos autores encontraron que la combinación de enfriamiento rápido de la cuajada y maduración a 8°C , disminuyó notablemente la velocidad de crecimiento de las NSLAB, pero tuvo una influencia menor en el recuento final alcanzado por estos microorganismos adventicios hacia el final de la maduración (9 meses).

Si bien la temperatura de maduración constituye un medio eficaz para controlar el crecimiento de las NSLAB, presenta la desventaja de que todos los fenómenos bioquímicos se lentifican, provocando un alargamiento del tiempo de maduración. Por esta razón, la disminución de la temperatura de maduración para mantener los quesos libres de NSLAB,

representa una estrategia interesante desde el punto de vista científico, no así desde el punto de vista de su aplicación industrial.

5.4. Microfiltración o pasteurización de la leche

Varios investigadores han abordado el estudio de la influencia de las NSLAB mediante ensayos que comparan quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada, encontrando notables diferencias entre ambos productos (Bullock y Irvine, 1956; Scarpellino y Kosikowski, 1962; Lau y col., 1990; 1991). Sin embargo, las razones de las diferencias no son claras, dado que la leche cruda presenta gran variabilidad en su composición microbiana, y no aparece como un modelo adecuado para estudiar la flora no fermento de ecosistemas más controlados, como los quesos obtenidos en la industria. Por otra parte, el tratamiento térmico tiene influencia sobre las proteínas, los minerales y las enzimas nativas de la leche, lo que dificulta el estudio de la contribución de las NSLAB a la calidad del queso.

Otra estrategia es el empleo de la microfiltración, una técnica de separación por membrana que permite la eliminación de microorganismos de la leche descremada, sin producir los cambios inducidos por el calor que resultan del proceso de pasteurización. La microfiltración permite reducir en un 99,9% la carga microbiana de la leche cruda, pero a diferencia de la pasteurización no es selectiva contra los microorganismos patógenos. Una limitación que presenta esta técnica es que se requiere de equipamiento especializado.

McSweeney y col. (1993) elaboraron quesos Cheddar a partir de leche cruda, pasteurizada o microfiltrada, a fin de evaluar la importancia de las NSLAB en el proceso de maduración. Estos investigadores reportaron que los quesos elaborados con leche cruda presentaron un mayor recuento de NSLAB y una mayor heterogeneidad de cepas de lactobacilos que los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada o microfiltrada. Los recuentos alcanzados por las NSLAB en estos dos últimos tipos de quesos fueron similares, indicando que la microfiltración, en este caso en particular, fue equivalente a la pasteurización en reducir el número de lactobacilos adventicios.

Skeie y Ardö (2000) estudiaron la influencia de la microflora de la leche cruda sobre la bioquímica de la maduración de un queso semi duro con ojos. Para ello elaboraron quesos a partir de leche descremada cruda, pasteurizada y microfiltrada en combinaciones con crema cruda o pasteurizada, e informaron que el recuento de las NSLAB fue mayor en los quesos elaborados con leche o crema cruda.

5.5. Pseudo-cuajadas o “*slurries*” de queso

El término “*slurry*” de queso es muy amplio dado a que se refiere a una gran variedad de sistemas modelo que intentan reproducir las condiciones de maduración del queso, y a menudo ha sido traducido como pseudo-cuajada. Los *slurries* de queso por lo general se maduran a elevadas temperaturas por cortos periodos de tiempo, por lo que han sido utilizados para evaluar en forma rápida el potencial proteolítico de las NSLAB y su influencia en el desarrollo del *flavor*. En la mayoría de los casos, los *slurries* de queso se han preparado a partir de cuajadas de queso (Farkye y col., 1995; Smit y col., 1995; Muehlenkamp-Ulate y Warthesen, 1999), pero también existen antecedentes de *slurries* obtenidos a partir de leche sometida a un tratamiento de ultra alta temperatura (UHT) (Roberts y col., 1995; Wijesundera y col., 1997; Dias y Weimer, 1999). El empleo de leche UHT podría eliminar la influencia de las NSLAB adventicias, sin embargo, promueve la asociación de las caseínas con las proteínas del suero, lo que impide la formación de un coágulo firme, necesario para la transformación casearia.

Farkye y col. (1995), estudiaron la actividad proteolítica de distintas cepas de lactobacilos (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum* y *Lb. casei* subsp. *casei*) en un *slurry* de queso madurado en condiciones anaeróbicas a 32°C durante 5 días. El *slurry* consistió en una pasta preparada con cuajada de queso Cheddar no salada y libre de fermento primario (acidificado con glucono- δ - lactona), a la que se le adicionó cloruro de sodio, agua destilada estéril, y una suspensión de cada una de las LAB ensayadas, incluyéndose también controles sin inocular.

Un estudio similar fue desarrollado por Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999) quienes evaluaron la capacidad proteolítica de 10 cepas de lactobacilos de origen NSLAB en *slurries* de queso Cheddar, obtenidos en condiciones microbiológicas controladas, y madurados anaeróbicamente a 30°C durante 12 días. También en este caso se trató de pastas de cuajadas, pero a diferencia del estudio anterior, estas se elaboraron en condiciones microbiológicas controladas y con la adición de fermento primario.

En ambos estudios los *slurries* de queso presentaron un contenido de humedad bastante superior (de hasta aproximadamente un 20% mayor) que el establecido para quesos Cheddar, lo que los aleja de las condiciones reales. El método de Farkye y col. (1995) presenta dos inconvenientes respecto al de Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999), a saber: **i**) la cuajada con la cual se preparó el *slurry* no se obtuvo en condiciones microbiológicas controladas razón por la cual, los controles exhibieron recuentos de LAB de 10^8 UFC/g, lo que dificulta el

estudio de la influencia de los lactobacilos agregados, y **ii**) los *slurries* se obtuvieron a partir de cuajada acidificada químicamente, con lo que no es posible estudiar la interacción de los lactobacilos adjuntos con el fermento primario. Se sabe que la actividad proteolítica del fermento primario genera péptidos y aminoácidos que promueven el crecimiento y actividad peptidolítica de las NSLAB (Williams y col., 2000). Es fundamental que el sistema modelo utilizado incluya a todos los agentes que participan del proceso de maduración para obtener un patrón de proteólisis semejante al encontrado en el queso tradicional. Asimismo, la presencia de alto contenido de lactosa en los *slurries* acidificados químicamente, también modifica las condiciones ambientales con respecto a la situación real en el queso.

Smit y col. (1995) desarrollaron una pasta de queso, que denominaron modelo *Ch-easy*, para estudiar el efecto de la adición de bacterias, virus o enzimas sobre la maduración del queso. Para la preparación del *slurry* se utilizó queso Gouda joven triturado, al que se le adicionó una pequeña cantidad de agua para facilitar su disolución. Los autores aseguran que la pasta de queso adquiere una consistencia líquida luego del tratamiento de pasteurización, lo que permite el agregado del agente en estudio (bacterias, virus o enzimas). Asimismo, informan que luego del enfriamiento a temperatura ambiente, la pasta recupera su estructura original. El modelo *Ch-easy* ha sido utilizado en varios estudios, especialmente para evaluar la contribución al *flavor* de LAB, y se considera un modelo adecuado para el screening de bacterias a fin de establecer su potencial en el desarrollo del aroma y sabor del queso. Sin embargo, este método presenta dos limitaciones. Al igual que otras pseudo-cuajadas, el modelo *Ch-easy* contiene un elevado nivel de humedad que difiere de las condiciones encontradas en el queso. Por otro lado, el proceso de pasteurización del *slurry* conlleva a la destrucción de las bacterias del fermento primario y a la inactivación de enzimas (coagulante, proteinasas y peptidasas del fermento primario, etc.), lo que, si bien permite evaluar en forma específica la actividad del agente adicionado, no refleja su verdadera influencia durante la maduración, en donde coexisten diversos microorganismos y enzimas que determinan su actividad.

En síntesis, se puede decir que los *slurries* de queso o pseudo-cuajadas no reproducen las condiciones de maduración del queso, dado su mayor contenido de humedad, y las temperaturas de maduración más elevadas, que favorecen el crecimiento microbiano, en particular de las NSLAB, y aceleran los procesos enzimáticos. Por esta razón, se ha sugerido que estos modelos sean sólo utilizados para estudiar en forma preliminar el potencial de un dado microorganismo, y no para predecir directamente su influencia en la maduración del queso (Fox y col., 1996).

5.6. Adición de cultivos adjuntos en elaboraciones de queso

La elaboración de queso a escala piloto es sin duda el procedimiento más adecuado para evaluar la influencia de las NSLAB sobre la maduración del queso, dado que los ensayos se realizan bajo las condiciones reales de maduración.

Los primeros trabajos que abordaron el estudio de los efectos de la adición de cultivos adjuntos de lactobacilos no fermento se llevaron a cabo en experiencias de elaboraciones de queso a escala piloto y en tinas abiertas, sin control de las condiciones microbiológicas (Broome y col., 1990; Lee y col., 1990). Sin embargo, una importante limitación de los experimentos de elaboraciones de queso en tinas abiertas es el elevado recuento ($> 10^7$ UFC/g queso) que alcanzan las NSLAB adventicias en los quesos controles, que en algunos casos llega a igualar el nivel alcanzado por los lactobacilos adjuntos en los quesos experimentales, dando lugar a interpretaciones erróneas o inciertas de los resultados. En vista de esta problemática, se ha postulado que para abordar el estudio de lactobacilos adjuntos, es necesario desarrollar procedimientos para la elaboración de quesos en condiciones microbiológicas controladas, con el objeto de reducir la influencia de los lactobacilos adventicios (McSweeney y col., 1993).

Uno de los primeros trabajos en condiciones microbiológicas controladas fue realizado por McSweeney y col. (1993), quienes evaluaron la influencia de cepas seleccionadas de lactobacilos sobre la calidad del queso, mediante elaboraciones de queso Cheddar a escala piloto. En los quesos experimentales, los lactobacilos adjuntos se mantuvieron en niveles elevados ($10^8 - 10^9$ UFC/g) durante todo el proceso de maduración. Los investigadores reportaron que a pesar de que en la leche pasteurizada ($78^\circ\text{C} - 15$ s) utilizada en las elaboraciones no se detectó presencia de lactobacilos, las NSLAB adventicias crecieron en los quesos controles. Este hallazgo contribuyó a la hipótesis actual de que los lactobacilos adventicios provienen fundamentalmente de la leche cruda, más que de contaminaciones post-pasteurización. A pesar de que las NSLAB adventicias se desarrollaron en los quesos controles, la diferencia con los queso experimentales fue de al menos 3 órdenes, por lo que el modelo fue considerado válido por los autores.

En un trabajo similar, Lynch y col. (1996) elaboraron quesos Cheddar en condiciones bacteriológicas controladas con la adición de distintas cepas de lactobacilos, a fin de estudiar su potencial para mejorar la calidad del queso. Estos investigadores reportaron que los quesos controles permanecieron libres de lactobacilos adventicios hasta los 97 días de maduración; luego de este tiempo, las NSLAB crecieron alcanzando recuentos que no superaron $5 \cdot 10^5$

UFC/g. Los autores postularon que, debido a que las diferencias en los recuentos de lactobacilos entre quesos controles y experimentales fueron de $\sim 1 - 2$ órdenes, fue posible valorar el impacto de los lactobacilos adicionados sobre la maduración del queso.

Si bien los experimentos de elaboraciones de queso a escala piloto y bajo condiciones microbiológicas controladas han permitido estudiar de manera exitosa la influencia de las NSLAB sobre la calidad del queso, presentan la desventaja de que son costosos y demandan mucho tiempo debido a que los periodos de maduración suelen ser prolongados. Asimismo, la reproducibilidad puede ser difícil de lograr a escala piloto, y la contaminación con NSLAB adventicias, como así también, las infecciones sub-letales de fagos, pueden alterar los patrones de maduración conduciendo a una interpretación equívoca de los resultados (Martley y Crow, 1993; Chapot-Chartier y col., 1994). Por estos motivos, se han presentado como alternativa los modelos de queso miniatura. Estos modelos experimentales permiten llevar a cabo el estudio de la contribución de las NSLAB en la calidad del queso, en forma sencilla, rápida, y económica, bajo condiciones semejantes a las de la matriz alimentaria real. Los quesos miniatura pueden elaborarse bajo condiciones microbiológicas controladas de una manera más sencilla que a escala piloto, y son reproducibles dado que la miniaturización permite lograr un mejor control de las condiciones medioambientales (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001).

Shakeel-Ur-Rehman, y col. (1998a) desarrollaron un modelo de queso Cheddar miniatura, y evaluaron su reproducibilidad y su confiabilidad por comparación de los resultados con un queso Cheddar control elaborado a escala piloto. El modelo fue repetitivo y reproducible dado que la composición química fue similar para los quesos elaborados en un mismo ensayo, en distintos ensayos llevados a cabo en el mismo día y en días diferentes. Asimismo, el queso miniatura demostró ser confiable y adecuado para evaluar la influencia de distintos agentes (fermentos primarios o adjuntos, enzimas, etc.) durante la maduración, debido a que la composición química, los perfiles proteolíticos y las características sensoriales fueron comparables a las del queso Cheddar control elaborado a escala piloto. Sin embargo, estos investigadores no trabajaron en condiciones microbiológicas controladas, ni estudiaron la evolución de la microflora láctica y adventicia en el modelo de queso durante la maduración. Como se mencionó anteriormente, para abordar el estudio de la influencia de los adjuntos de lactobacilos en la calidad del queso, con la intención de seleccionar aquellos que presenten características adecuadas para su empleo en quesería, es necesario conocer la dinámica de las poblaciones microbianas durante la maduración, como así también aplicar procedimientos que permitan evitar la contaminación con NSLAB adventicias.

Por otra parte, Hynes y col. (2000) diseñaron un protocolo para la elaboración de quesos de pasta lavada tipo “Saint-Paulin” bajo condiciones microbiológicas controladas, e informaron que el modelo fue reproducible desde el punto de vista de la composición, y que el mantenimiento de condiciones asépticas durante la elaboración y maduración permitió controlar el crecimiento de las NSLAB adventicias ($< 10^2$ UFC/g), así como también el ataque de fagos. En un estudio posterior, este modelo fue utilizado exitosamente para evaluar la contribución de distintos fermentos primarios y cultivos adjuntos de lactobacilos a la proteólisis, producción de compuestos volátiles y características sensoriales de quesos de pasta lavada (Hynes y col., 2003a).

Di Cagno y col. (2006) adaptaron el modelo desarrollado por Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998a) a la tecnología de elaboración de queso Caciotta, para estudiar en forma individual las actividades proteolíticas y lipolíticas de 17 cepas de lactobacilos mesófilos, aisladas de distintas variedades de quesos y a partir de pan de masa fermentada. La composición química fue similar en todos los quesos y comparable a la del queso Caciotta comercial, en tanto que las NSLAB adventicias permanecieron en niveles inferiores a 10^4 UFC/g durante todo el periodo de maduración.

En conclusión, el uso de modelos de queso miniatura representa la estrategia más eficaz para evaluar el impacto de las NSLAB en la calidad del queso y seleccionar aquellas cepas que demuestren características tecnológicas adecuadas para su empleo como adjuntos en elaboraciones de queso. Sin embargo, una vez seleccionadas las cepas de mayor potencial, es conveniente la validación de los resultados obtenidos mediante ensayos de elaboraciones de queso a escala piloto, para verificar la robustez de las propiedades tecnológicas de un dado cultivo, y otorgar mayor credibilidad a su aplicación en condiciones reales.

6. Actividad bioquímica de los lactobacilos

6.1. Metabolismo del citrato

La leche contiene una baja concentración de citrato (~ 8 mmol/L) y la mayor parte del mismo ($\sim 90\%$) se pierde en el suero durante la elaboración del queso. Sin embargo, las pequeñas concentraciones de citrato retenidas en la cuajada (10 mmol/Kg) son de gran importancia para el desarrollo del *flavor*, dado que el citrato puede ser metabolizado a compuestos volátiles de aroma y sabor por las LAB citrato positivas (McSweeney y Sousa, 2000). En queso Cheddar, por ejemplo, la concentración de citrato decrece desde 0,2 - 0,5%

hasta 0,1% luego de 6 meses de maduración, como consecuencia de la actividad metabólica de algunos lactobacilos mesófilos con actividad citrato positiva, pertenecientes a la flora NSLAB (McSweeney, 2004). Los principales compuestos de *flavor* derivados del metabolismo del citrato son acetaldehído, etanol, acetato, diacetilo y acetoína (Figura 1). El diacetilo es un importante compuesto de aroma en muchas variedades de quesos, y junto con el acetaldehído, es responsable del *flavor* suave y agradable en los quesos tipo Cheddar jóvenes y en los quesos de pasta lavada como el Gouda (Drake y col., 1999).

En los últimos cinco años se han llevado a cabo varios trabajos de investigación orientados al estudio de las actividades metabólicas de cepas de lactobacilos de origen NSLAB, tanto *in vitro* como en sistemas modelo. Jyoti y col. (2003) observaron que *Lb. rhamnosus* creció en un medio conteniendo citrato como única fuente de energía produciendo lactato, acetoína, acetato y diacetilo. Dudley y Steele (2005) estudiaron la habilidad de varios lactobacilos mesófilos para degradar citrato en una solución de fosfato de potasio, e identificaron la ruta metabólica mediante la cual tuvo lugar dicha transformación. Los investigadores informaron que *Lb. casei*, *Lactobacillus zae* y *Lb. rhamnosus* produjeron acetato, lactato y etanol a partir de citrato, mientras que las cepas de *Lb. plantarum* sintetizaron aspartato, acetato, lactato y succinato. El succinato es otro compuesto importante dado que incrementa el *flavor* global del queso Cheddar. Dudley y Steele (2005) concluyeron que las cepas de *Lb. plantarum* producen succinato a partir de citrato mediante el ciclo reductor del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs, y que las otras cepas de lactobacilos estudiadas carecen de la maquinaria enzimática para degradar el citrato a través de esa vía metabólica. Díaz-Muñiz y col. (2006) evaluaron la capacidad de una cepa de *Lb. casei* para degradar el citrato en presencia de un exceso o limitación de una fuente de energía, en un medio químicamente definido y en un extracto de queso Cheddar, bajo condiciones similares a las de la maduración del queso. Los principales productos de degradación del citrato en ambos modelos fueron ácido L-láctico y ácido acético en presencia de un exceso o una cantidad limitada de carbohidratos, respectivamente. Otros compuestos derivados del metabolismo del citrato por acción de la cepa de *Lb. casei* fueron: ácido D-láctico, acetoína, ácido fórmico, etanol y diacetilo. Los autores reportaron que la cepa estudiada fue incapaz de sintetizar ácido succínico, ácido málico y butanodiol a partir de citrato. En un trabajo reciente, Skeie y col. (2008b) evaluaron las propiedades metabólicas de dos lactobacilos como fermentos adjuntos, en estudios *in vitro* y en quesos tipo Holanda de largo periodo de maduración, a saber: *Lb. plantarum* INF15D con capacidad para degradar citrato, y *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* INF448 con escasa habilidad para degradar el citrato. Si bien

ambos cultivos adjuntos fueron capaces de metabolizar el citrato tanto *in vitro* como en queso, *Lb. plantarum* INF15D exhibió una mayor actividad metabólica. *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* INF448 degradó el citrato *in vitro* a lactato, acetato, y ácido succínico, mientras que en el queso produjo lactato, diacetilo y acetoína. Por el contrario, la cepa de *Lb. plantarum* metabolizó rápidamente el citrato *in vitro* a acetato, succinato y aspartato, y también en queso sintetizó ácido succínico y grandes cantidades de aspartato.

6.2. Metabolismo de la lactosa y del lactato

Durante la elaboración y en las etapas tempranas de la maduración del queso el fermento primario metaboliza la lactosa con producción de ácido láctico (principalmente ácido L(+)-láctico). En el curso de la elaboración, las NSLAB no contribuyen a esta transformación ya que, en general, muestran un crecimiento lento en la leche y recién comienzan a desarrollarse en la cuajada (Stanley, 1998). Por esta razón, en cambio, sí pueden contribuir a la degradación de la lactosa durante las etapas tempranas o avanzadas de la maduración, en caso de una fermentación incompleta de la misma por parte del fermento primario (McSweeney y Fox, 2004). En efecto, algunos lactobacilos y pediococos pueden formar D(-)-lactato a partir de la lactosa residual o por medio de la racemización del L(+)-lactato. La solubilidad del D(-)-lactato de calcio es menor que la del L(+)-lactato, con lo que el D(-)-lactato puede cristalizar formando manchas blancas principalmente en la superficie de los quesos maduros (Johnson y col., 1990; Chou y col., 2003; Liu, 2003; Agarwal y col., 2006b). Jyoti y col. (2003) observaron que junto con el incremento de los recuentos de las NSLAB durante la maduración del queso Cheddar se produjo una disminución de los niveles de L(+)-lactato y un aumento de la concentración de una mezcla racémica de L(+)-lactato y D(-)-lactato. Chou y col. (2003) informaron que en los quesos Cheddar elaborados con *Lb. curvatus* como cultivo adjunto, la concentración de D(-)-lactato se incrementó con el tiempo de maduración; luego de 28 días se detectó una mezcla racémica de D/L-lactato, al mismo tiempo que se observó la presencia de cristales de lactato de calcio en los quesos. Resultados similares fueron encontrados por Agarwal y col. (2006a), quienes estudiaron el efecto de una cepa de *Lb. curvatus* utilizada como adjunto en elaboraciones de quesos Cheddar. Los investigadores informaron que luego de 56 días de maduración, los niveles de L(+)-lactato disminuyeron, y concomitantemente se detectó un incremento en la concentración de D(-)-lactato y la formación de cristales de lactato de calcio.

Por otra parte, el lactato puede ser oxidado en el queso a acetato y CO₂ por algunos miembros de la flora NSLAB (cepas de *Lb. curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y pediococos) una vez que se ha agotado la fuente de carbohidratos (Figura 1) (Liu, 2003). Esta transformación depende de la población NSLAB y de la disponibilidad de O₂, la que a su vez está determinada por el tamaño del bloque de queso y la permeabilidad al O₂ de la corteza y del material de envasado (McSweeney y Sousa, 2000). El acetato es un compuesto de *flavor* importante en muchas variedades de quesos, sin embargo, es poco probable que esta reacción oxidativa ocurra en una extensión importante en el queso debido a su bajo potencial redox (ca. -250 mV) y a la escasa disponibilidad de O₂ (McSweeney, 2004).

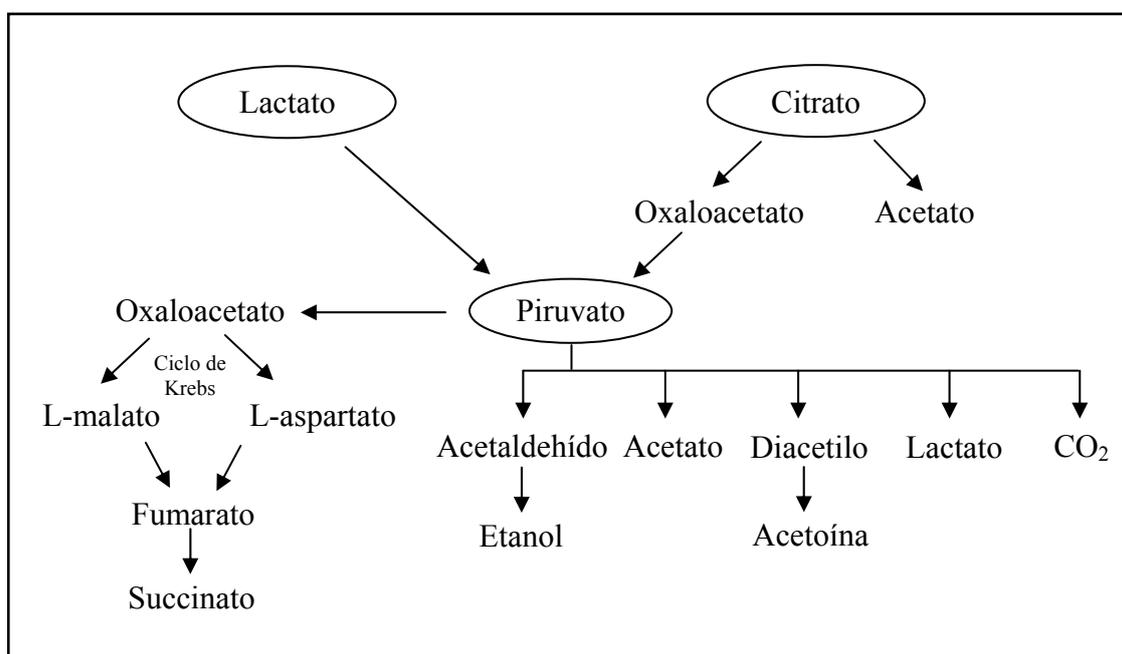


Figura 1. Rutas metabólicas implicadas en la degradación del citrato y del lactato durante la maduración del queso. Modificado de McSweeney y Sousa (2000) y de Dudley y Steele (2005).

6.3. Actividad lipolítica

La lipólisis resulta en la formación de ácidos grasos que ejercen un impacto directo en el *flavor* del queso, pero que además actúan como precursores de compuestos de aroma y sabor, tales como metilcetonas, alcoholes, y lactonas (McSweeney y Sousa, 2000; Smit y col., 2002).

La presencia de actividad lipasa y estearasa en los lactobacilos de origen NSLAB ha sido confirmada en ensayos *in vitro* mediante el empleo de sustratos naturales, triglicéridos y sustratos cromogénicos sintéticos. Las estearasas de *Lb. casei* (Lee y Lee, 1990; Castillo y

col., 1999; Choi y col., 2004), *Lb. plantarum* (El Soda y col., 1986a; Gobbetti y col., 1996; Gobbetti y col., 1997a) y *Lb. fermentum* (El Soda y col., 1986a; Gobbetti y col., 1997b) han sido completa o parcialmente purificadas y caracterizadas. En general, las enzimas están localizadas en el interior de la célula, y las actividades son específicas de la cepa y de la especie (Banks y Williams, 2004; Oliszewski y col., 2007).

Los lactobacilos heterofermentantes facultativos que dominan la flora NSLAB de muchas variedades de quesos (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, y *Lb. paracasei*) son débilmente lipolíticos (McSweeney y Sousa, 2000). Sin embargo, cuando estos microorganismos están presentes en los quesos en altos recuentos durante largos periodos, sus lipasas y esterasas probablemente contribuyan a la liberación de niveles significativos de ácidos grasos (Collins y col., 2003; McSweeney, 2004). La mayoría de las LAB hidrolizan preferentemente los ésteres del ácido butanoico (C4), pero también presentan un alto nivel de actividad sobre ésteres de cinco a ocho cadenas de carbono (C5 a C8); sólo algunas especies, como por ejemplo *Lb. fermentum*, son activas sobre ácidos grasos de diez a catorce cadenas (C10 a C14). Dichas actividades han sido verificadas en solución (actividades estearasa). Asimismo, muchas LAB son capaces de hidrolizar glicéridos en una emulsión (actividad lipasa) con preferencia sobre tributirina y mono-/ di- glicéridos, pero esta actividad lipolítica es notablemente menor que la actividad estearasa (Collins y col., 2003; Yvon, 2006).

6.4. Actividad proteolítica y catabolismo de los aminoácidos

Las LAB poseen un sistema proteolítico complejo que en teoría es capaz de hidrolizar completamente las caseínas desde la cadena polipeptídica intacta hasta aminoácidos libres. Este sistema proteolítico es requerido por estos microorganismos para alcanzar altas densidades en la leche, dado que ésta presenta una muy baja concentración de péptidos y aminoácidos libres (Banks y Williams, 2004; McSweeney, 2004; Smit y col., 2005).

El sistema proteolítico de los lactococos ha sido estudiado detalladamente a nivel molecular, bioquímico y genético. Por el contrario, el sistema de los lactobacilos está menos caracterizado, pero se considera que la maquinaria enzimática de ambos géneros es bastante similar (Pritchard y Coolbear, 1993). En los lactococos se han identificado cuatro componentes del sistema proteolítico: **i**) proteinasas de pared extracelulares (CEP), **ii**) una proteasa asociada a la membrana denominada Htra, **iii**) un conjunto de peptidasas intracelulares (endopeptidasas, aminopeptidasas, di-/tri-peptidasas, iminopeptidasas y

peptidasas específicas de prolina), y **iv)** sistemas de transporte de di/tripéptidos y oligopéptidos (Laan y col., 1998; Poquet y col., 2000; Smit y col., 2002).

Las CEP de *Lactococcus* se han clasificado en tres grupos: proteinasas tipo P_I, P_{III}, y mixtas. Las proteinasas tipo P_I degradan rápidamente la β -caseína, y no así la α_{s1} -caseína, mientras que las proteinasas tipo P_{III} son capaces de hidrolizar rápidamente tanto la α_{s1} - como la β -caseína. En base a su especificidad sobre la α_{s1} -CN (f1-23) (producto de degradación de la α_{s1} -caseína por acción del coagulante), las proteinasas de lactococos pueden clasificarse a su vez en ocho grupos (a – g) (McSweeney, 2004).

Las CEP hidrolizan las caseínas intactas con la formación de oligopéptidos. Estos últimos son transportados al interior de las células a través de los sistemas de transporte, donde son degradados por acción de las peptidasas (Smit y col., 2002).

Debido a que los lactobacilos mesófilos no crecen bien en leche en ausencia de una fuente exógena de oligopéptidos y aminoácidos, una hipótesis indica que podrían carecer de proteinasas de pared. Sin embargo, aunque las especies que componen la flora NSLAB son menos proteolíticas que otras LAB, se han detectado tanto en *Lb. plantarum* como en *Lb. casei* actividades serino-proteinasas asociadas a la superficie celular (El Soda y col., 1986b; Khalid y Marth, 1990a; Law y Haandrikman, 1997; Magboul y col., 1997).

La proteasa de superficie Htra ha sido descubierta en *L. lactis*, donde se vincula a la degradación de proteínas anormales, y eventualmente a la maduración de proteínas nativas, pero no existe información sobre la existencia de esta enzima en lactobacilos (Foucaud-Scheunemann y Poquet, 2003).

El sistema peptidolítico de los lactobacilos ha sido estudiado en detalle y se sabe que estos microorganismos poseen un sistema complejo de peptidasas. En particular, en cepas de lactobacilos aisladas de quesos, de origen NSLAB, se ha detectado una amplia gama de peptidasas, aunque se han verificado notables variaciones intra- e inter-especies en la actividad peptidolítica (El Soda y col., 1978; Abo-Elnaga y Plapp, 1987; Hegazi y Abo-Elnaga, 1987; Khalid y Marth, 1990b; Peterson y col., 1990; El Abboudi y col., 1992; Fernández de Palencia y col., 1997; Williams y Banks, 1997; Williams y col., 1998).

Las características de la maquinaria enzimática de los lactobacilos que componen la flora NSLAB explican el hecho de que lactobacilos mesófilos generalmente no participen en la proteólisis primaria durante la maduración del queso, pero contribuyan a la liberación de péptidos pequeños y aminoácidos (proteólisis secundaria) (McSweeney, 2004).

El *flavor* de la mayoría de los quesos resulta de la combinación de un gran número de compuestos sápidos presentes en las concentraciones y proporciones adecuadas (teoría del balance de los componentes) (McSweeney y Sousa, 2000; Rijnen y col., 2003). Si bien los aminoácidos contribuyen al *flavor* de fondo de la mayoría de las variedades de quesos, los intentos para incrementar su formación mediante la sobre-expresión de varias enzimas proteolíticas (Christensen y col., 1995), o mediante la adición de aminoácidos a la cuajada durante la elaboración de quesos (Wallace y Fox, 1997), demostraron que la proteólisis incrementada no afectó significativamente el desarrollo del aroma y sabor en los productos. En base a estas observaciones se postuló que la etapa limitante para la formación del *flavor* en el queso no es la producción de aminoácidos, sino las modificaciones químicas o enzimáticas de los mismos. En efecto, se ha comprobado que los compuestos volátiles derivados del catabolismo de los aminoácidos son los que contribuyen al desarrollo de aroma y sabor característicos de los quesos (McSweeney y Sousa, 2000; Williams y col., 2001; Tavaría y Malcasa, 2003; Smit y col., 2005).

El paso principal de la conversión de aminoácidos a compuestos de aroma y sabor por parte de las LAB es la transaminación. Esta reacción es catalizada por la enzima aminotransferasa (AT) que transforma un aminoácido en su correspondiente α -ceto ácido utilizando piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. El PLP está fuertemente unido a la enzima y transfiere el grupo amino a partir del aminoácido donante. Para ser regenerada, la enzima utiliza un α -ceto ácido, generalmente ácido α -cetoglutárico, el cual es transformado en ácido glutámico mediante la aceptación del grupo amino transportado por el PLP (Hansen y col., 2001; Tanous y col., 2002). Las AT pueden utilizar otros α -ceto ácidos como aceptores de grupo amino tales como piruvato, oxaloacetato o glioxilato, aunque en menor medida (Amarita y col., 2001; Yvon, 2006). Estas enzimas son intracelulares y han sido aisladas a partir de lactococos (Yvon y col., 1997; Gao y Steele, 1998; Lapujade y col., 1998), y algunos lactobacilos de origen NSLAB (Williams y Banks, 1997; Dias y Weimer, 1998; Gummalla y Broadbent, 1999; Hansen y col., 2001). Las AT aisladas a partir de las LAB fueron específicas para la degradación de ácido aspártico (Asp), metionina (Met), aminoácidos aromáticos (ArAAs): fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptofano (Trp) y aminoácidos de cadena ramificada (BcAAs): leucina (Leu), isoleucina (Ile), y valina (Val) (Hansen y col., 2001; Tanous y col., 2002; Yvon, 2006).

Los α -ceto ácidos son los intermediarios centrales en la ruta catabólica de la AT, y pueden ser hidrogenados a α -hidroxiácidos, decarboxilados a aldehídos, o convertidos en acetyl-CoA

ésteres mediante transformación química, dehidrogenación o decarboxilación oxidativa. A su vez, los aldehídos pueden ser transformados posteriormente a alcoholes mediante reducción o a ácidos carboxílicos mediante oxidación. Todos estos compuestos, excepto los hidroxiácidos, son importantes contribuyentes al aroma y sabor de los quesos (Smit y col., 2002; Tanous y col., 2002; Tavaría y col., 2002; Smit y col., 2005).

Asimismo, los aminoácidos pueden ser directamente metabolizados mediante otras reacciones químicas o enzimáticas tales como decarboxilación, deaminación, desulfuración, e hidrólisis de sus cadenas laterales, aunque en general estas vías metabólicas se consideran de menor importancia en LAB, en comparación con la transaminación (McSweeney y Sousa, 2000; Kieronczyk y col., 2001; Tavaría y col., 2002). Algunas cepas de lactobacilos mesófilos son capaces de producir la decarboxilación de los aminoácidos con formación de aminas biológicamente activas, conocidas como aminas biogénicas (tiramina, feniletilamina, triptamina, histamina, cadaverina, y putrescina) (Curtin y McSweeney, 2003; Banks y Williams, 2004).

El catabolismo de los aminoácidos por parte de las LAB es limitado debido a la escasa disponibilidad en la matriz alimentaria del aceptor de electrones α -cetoglutarato; este α -cetoácido es esencial para el primer paso de la conversión de los aminoácidos. La adición de α -cetoglutarato exógeno a la leche o la cuajada (Yvon y col., 1998; Banks y col., 2001), como así también el empleo de una cepa de *L. lactis* genéticamente modificada capaz de producir α -cetoglutarato a partir de glutamato (Rijnen y col., 2000), incrementó en gran medida la conversión de aminoácidos a potentes compuestos de aroma en el queso. La habilidad de las LAB para producir compuestos de aroma está estrechamente relacionada a su actividad glutamato dehidrogenasa (GDH), la cual cataliza la deaminación de glutamato a α -cetoglutarato (Tanous y col., 2002; Yvon, 2006). La actividad GDH parece ser junto a las actividades AT, la actividad clave en el catabolismo de los aminoácidos por parte de las LAB (Kieronczyk y col., 2004). La actividad GDH está ampliamente extendida en cepas de *Lb. plantarum*, y en otros lactobacilos mesófilos, tales como *Lb. casei*, *Lb. fermentum* y *Lb. paracasei*, y depende de las especies y cepas (Tanous y col., 2002; Yvon, 2006).

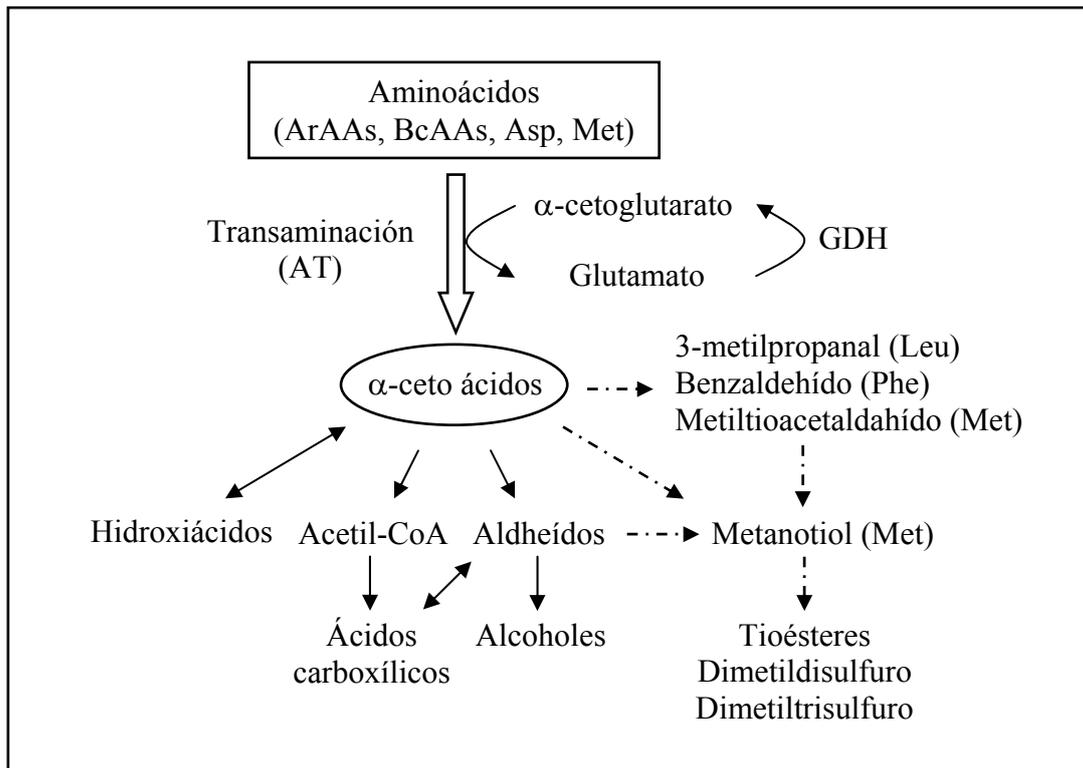


Figura 2. Principales vías metabólicas del catabolismo de los aminoácidos mediante reacciones químicas (líneas de puntos) y enzimáticas (líneas continuas). Fuente: Yvon (2006).

7. Efectos de las NSLAB en la calidad del queso

Tradicionalmente la mayoría de los quesos se elaboraban a partir de leche cruda, sin la adición de fermentos o utilizando fermentos “naturales” de leche o suero, compuestos por mezclas complejas de cepas no definidas. Las desventajas de este procedimiento eran la falta de uniformidad en los productos finales (variaciones en la composición, *flavor* y textura), y la posibilidad de crecimiento de microorganismos patógenos. El empleo de fermentos primarios constituidos por cepas definidas y la implementación de la pasteurización y de prácticas más higiénicas en la manipulación de la leche permitió lograr un control del proceso de fermentación del queso y obtener productos microbiológicamente seguros (Martley y Crow, 1993). Sin embargo, a partir de entonces, muchos consumidores comenzaron a percibir que los quesos elaborados con leche pasteurizada no desarrollaban un *flavor* tan intenso como los fabricados mediante los procedimientos tradicionales (Beresford, 2003). Varios investigadores (McSweeney y col., 1993; Shakeel-Ur-Rehman, y col., 2000b; Skeie y Ardö, 2000; Awad, 2006) han realizado estudios comparativos entre quesos elaborados a partir de leche cruda, pasteurizada o microfiltrada. Todos los estudios indicaron que los quesos

elaborados con leche cruda maduraron más rápidamente y presentaron notas de aroma y sabor sustancialmente más intensas que los quesos fabricados con leche pasteurizada o microfiltrada. Por otra parte, el empleo de tinas queseras asépticas y de fermentos primarios de composición conocida indicó que, si bien la actividad bioquímica de los fermentos primarios era aparentemente suficiente para lograr el aroma y sabor requerido en el producto, éste no desarrollaba un *flavor* completamente maduro (Kleter, 1977; Banks y Williams, 2004). A raíz de estas observaciones se sugirió que las NSLAB ejercían un rol importante en la maduración de los quesos.

La influencia de las NSLAB en la calidad del queso constituye un tema de gran controversia, a pesar de los numerosos trabajos de investigación realizados en la última década. Existen varias hipótesis acerca del rol de las NSLAB en la maduración de quesos.

Algunos investigadores postularon que los lactobacilos adventicios no influyen en el desarrollo del *flavor*, dado que en ensayos realizados en quesos Cheddar (Lloyd y col., 1980) y Gouda (Kleter, 1977) obtenidos en condiciones asépticas y “sin NSLAB”, los productos presentaron características sensoriales adecuadas, aunque poco intensas.

Para otros autores las NSLAB disminuyen la calidad del producto final, y les atribuyen hasta el 80% de los defectos detectados en quesería (Crow y col., 2001). Muchos de los defectos en quesos de largo periodo de maduración se han asociado a las actividades metabólicas específicas de este grupo microbiano. Entre ellos pueden citarse:

7.1. Formación de manchas blancas en la superficie del queso: Como se mencionó anteriormente, algunas cepas de NSLAB son capaces de racemizar el L(+)-lactato a D(-)-lactato que precipita en la forma de manchas blancas de cristales de lactato de calcio. La aparición de estos cristales en los quesos maduros perjudica considerablemente las ventas, dado que impactan negativamente en la apariencia del producto y en la aceptación por parte de los consumidores, quienes los confunden con hongos o con cuerpos extraños (Chou y col., 2003; Agarwal y col., 2006b; Rynne y col., 2007). Asimismo, el consumo excesivo de D(-)-lactato puede ocasionar trastornos clínicos, dado que en algunas personas, en particular en los infantes, no se metaboliza tan fácilmente como el L(+)-lactato (McSweeney y Sousa, 2000; Liu, 2003).

7.2. Formación de aminas biogénicas: Los quesos de largo periodo de maduración por lo general contienen una concentración relativamente elevada de aminas biogénicas, que resulta de la actividad aminoácido decarboxilasa de los microorganismos (Williams y col., 2001;

Curtin y McSweeney, 2003). Las especies de NSLAB más frecuentemente relacionadas con esta transformación en el queso son *Lb. curvatus* (Bover-Cid y col., 2008), *Enterococcus* spp. (Galgano y col., 2001; Pintado y col., 2008) y lactobacilos heterofermentantes tales como *Lactobacillus buchneri* y *Lb. brevis* (Wouters y col., 2002). Las principales aminas encontradas en los quesos son tiramina e histamina que son producidas por decarboxilación de la tirosina y la histidina, respectivamente (McSweeney y Sousa, 2000). Estos compuestos pueden representar un riesgo serio para la salud de individuos susceptibles cuando están presentes en los alimentos en cantidades significativas, o cuando se ingieren en presencia de factores potenciadores, tales como drogas inhibidoras de la enzima monoaminoxidasa, alcohol, o en presencia de enfermedades gastrointestinales (Galgano y col., 2001). Los efectos asociados al consumo de quesos con altos niveles de aminas biogénicas incluyen: emesis, insuficiencia respiratoria, palpitaciones, jaquecas, náuseas, vómitos, hiper o hipotensión y crisis hipertensivas. Asimismo, se ha informado que las diaminas (putrescina y cadaverina) pueden reaccionar con nitritos para formar nitrosaminas carcinogénicas (Novella- Rodríguez y col., 2002).

7.3. Formación de ojos y/o aperturas en los quesos: El CO₂ producido por fermentación del citrato o del lactato durante la maduración es responsable de las aperturas indeseables y del defecto de “cuajada flotante” en quesos Cheddar y Cottage, respectivamente. Estos defectos se han asociado principalmente a la producción de gas por parte de los lactobacilos heterofermentantes obligatorios, fundamentalmente *Lb. fermentum* y *Lb. brevis* (Khalid y Marth, 1990b; McSweeney y Sousa, 2000; Liu, 2003). Otras especies bacterianas no lácticas, como los coliformes, también pueden provocar este defecto.

7.4. Producción excesiva de ácido: algunas cepas de lactobacilos pueden contribuir a la producción de ácido durante la elaboración y/o maduración del queso, conduciendo a defectos de textura y de aroma y sabor (Lee y col., 1990; Zalazar y col., 1999; Herreros y col., 2007).

7.5. Producción de off-flavors: El catabolismo de los aminoácidos aromáticos por ciertas cepas de NSLAB puede conducir a la formación de aromas y sabores a establo o florales, indeseables (Gumalla y Broadbent, 2001). Asimismo, la actividad peptidolítica de algunos lactobacilos puede propiciar la acumulación de péptidos amargos que resultan en *off-flavor* (Somers y col., 2001; Antonsson y col., 2003). Por otra parte, la actividad de las lipasas/ esterasas de algunas cepas de NSLAB puede provocar una lipólisis excesiva o desequilibrada

con la consecuente producción de rancidez (McSweeney y Sousa, 2000). El crecimiento de cepas heterofermentantes (*Lb. brevis* y *Lb. fermentum*) en las etapas tardías de la maduración, se ha asociado con la presencia de aromas y sabores indeseables en quesos Cheddar (Crow y col., 2002).

A continuación se mencionan los principales trabajos de investigación que han reportado una influencia negativa de las NSLAB en la calidad del queso.

Lee y col. (1990) evaluaron el impacto de distintas cepas de lactobacilos sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de queso Cheddar elaborado a escala piloto y en tinas abiertas, con la finalidad de determinar si alguna de ellas ejercía una contribución positiva a la calidad del queso. Los investigadores informaron que la mayoría de las cepas ensayadas causaron defectos durante las etapas tempranas de la maduración, tales como, sobreacidificación, formación de fisuras y aperturas en la masa del queso, sabor amargo y *off-flavors*. En un estudio similar, Crow y col. (2001) estudiaron el efecto de varias cepas de NSLAB en la calidad de quesos Cheddar, e informaron que las cepas heterofermentantes de *Lb. brevis* y *Lb. fermentum* ocasionaron aperturas en los quesos y racemizaron activamente el lactato; *Lb. brevis* fue también responsable de la formación de aminas biogénicas. Por otra parte, Martley y Crow (1993) reportaron que en quesos Cheddar comerciales elaborados en Nueva Zelanda, la presencia de NSLAB adventicias condujo a la producción de defectos de aroma y sabor, aperturas en la masa del queso y formación de cristales de lactato de calcio. Estos investigadores también informaron que la adición de un adjunto de *Lb. plantarum* citrato positivo a la leche de elaboración de queso Emmental, condujo a una menor fermentación de lactato, y por lo tanto, a una menor producción de ácido propiónico, lo que afectó la velocidad de formación de ojos y el desarrollo del *flavor* en estos quesos. Los investigadores postularon que las cepas de NSLAB citrato positivas y resistentes a las temperaturas de cocción elevadas que se aplican en la elaboración de esta variedad de queso, pueden interferir con la actividad de las propionibacterias, conduciendo a defectos de calidad en los productos finales. En un estudio realizado por Antonsson y col. (2003) diferentes cepas de lactobacilos aisladas a partir de queso Danbo, fueron utilizadas como cultivos adjuntos en un sistema modelo de queso. Los autores informaron que los quesos en los que predominaron cepas de *Lb. plantarum* desarrollaron *off-flavors* en un etapa temprana de la maduración. Por otra parte, Herreros y col. (2007) elaboraron quesos Armada a partir de leche de cabra pasteurizada con la adición de distintas combinaciones de fermentos primarios y cepas de NSLAB. Los investigadores detectaron una mayor acidificación en los quesos elaborados con

un adjunto de *Lb. plantarum*, y en consecuencia, estos productos exhibieron defectos de aroma y sabor relacionados con una excesiva acidez.

A pesar de lo expuesto, muchos autores consideran que las NSLAB le otorgan a los quesos características organolépticas distintivas, intensas y típicas de una determinada región (Crow y col., 2001). Numerosos trabajos de investigación han demostrado que la adición de cepas seleccionadas de lactobacilos como cultivos adjuntos a la leche de elaboración, influyó positivamente en la calidad del queso, a través de la intensificación del *flavor* y de la aceleración del proceso de maduración, como consecuencia del incremento en la formación de péptidos pequeños y aminoácidos libres que son precursores de compuestos de aroma y sabor (McSweeney y col., 1994; Lane y Fox, 1996; Lynch y col., 1996; 1999; Madkor y col., 2000; Hynes y col., 2003a; Michaelidou y col., 2003; Poveda y col., 2003; Di Cagno y col., 2006; Irigoyen y col., 2007). Asimismo, se ha postulado que algunas cepas de lactobacilos pueden reducir el sabor amargo en los quesos, mediante la degradación de péptidos amargos que pueden acumularse en el queso, como consecuencia de la acción hidrolítica del coagulante, el fermento primario u otros microorganismos sobre las caseínas (Gomez y col., 1996; Martínez-Cuesta y col., 2001).

Por otro lado, numerosas cepas de lactobacilos, fundamentalmente aquellas pertenecientes a las especies *Lb. casei*, *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum*, han demostrado actividad probiótica (Bertazzoni-Minelli y col., 2004; Maragkoudakis y col., 2006; Vizoso-Pinto y col., 2006; Siragusa y col., 2007). Dado que la flora NSLAB está compuesta fundamentalmente por estas especies de lactobacilos, es posible plantear la hipótesis de que las NSLAB en el queso podrían ejercer un rol de esta naturaleza, determinando el valor probiótico del producto. Esta influencia es difícil de poner en evidencia para las NSLAB nativas, ya que el carácter probiótico debe comprobarse para cada cepa, pero refuerza el concepto que otorga potencial probiótico a los alimentos fermentados tradicionales, y la idea de que prácticamente todos los quesos de larga maduración serían alimentos probióticos “naturales”. El concepto es más simple de verificar para los lactobacilos de origen NSLAB que se adicionan como adjuntos, cuyo potencial probiótico puede estudiarse previo a su utilización.

Se puede concluir que las NSLAB no pueden definirse como beneficiosas o perjudiciales en sí, ya que su influencia en la calidad del queso depende de la especie y la cepa, del número final alcanzado, de la velocidad de crecimiento, de las condiciones ambientales y de la interacción con otras poblaciones microbianas presentes (Crow y col., 2001; Hynes y Bergamini, 2006).

8. Cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos

La mayoría de las variables del proceso de elaboración de quesos a escala industrial están perfectamente controladas. La leche es pasteurizada, estandarizada y de gran mezcla, se utilizan fermentos primarios seleccionados, cuya composición microbiológica y actividad bioquímica son conocidas, la enzima coagulante tiene una actividad definida, los parámetros de elaboración (pH, temperatura de cocción, tamaño de los granos de cuajada, salado, etc.) son estrictamente controlados, y se mantiene un correcto nivel de higiene en las prácticas de obtención y procesamiento de la leche. Todo esto permite obtener como resultado un queso de composición definida, con lo que se podría presumir que desarrollarán características de textura y de *flavor* constantes durante la maduración en un ambiente de temperatura y humedad controladas. Sin embargo, esto no siempre sucede en la práctica ya que existe una importante variable en la elaboración del queso que permanece no controlada: la flora NSLAB (Crow y col., 2001).

A pesar de la aplicación de precauciones rigurosas durante la elaboración del queso, una población de NSLAB desarrolla en la cuajada a partir de contaminantes adventicios presentes inicialmente en la leche, planta láctea y medioambiente, y domina la microflora de la mayoría de los quesos artesanales e industriales (Naylor y Sharpe, 1958a; Martley y Crow, 1993). Dada la naturaleza dinámica e impredecible de la flora NSLAB, su presencia introduce una variabilidad en el proceso de maduración que escapa al control del fabricante de quesos y que puede conducir a una inconstancia en la calidad del producto final (Crow y col., 2002; Williams y col., 2002; Peláez y Requena, 2005).

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de los defectos en quesos obtenidos a escala industrial han sido atribuidos a la flora NSLAB (Crow y col., 2001). Sin embargo, la elaboración de quesos bajo condiciones asépticas para controlar el desarrollo de estos microorganismos adventicios no puede realizarse a escala industrial (Martley y Crow, 1993). Además, la ausencia de NSLAB en los quesos (lo que sólo se logra en condiciones de laboratorio) no es deseable, ya que los productos que se obtienen desarrollan un *flavor* aceptable pero no completamente maduro (Crow y col., 2001; Hynes y Bergamini, 2006).

En los últimos años, se han desarrollado diversos procedimientos para producir leche y obtener quesos con el menor número posible de microorganismos. La implementación de procesos de pasteurización a temperaturas bajas acoplado a procesos de microfiltración permitieron obtener leche de excelente calidad microbiológica. Aunque estos métodos proveen a los consumidores de productos lácteos microbiológicamente seguros, también

conducen a la eliminación de la flora autóctona que daba tipicidad a estos productos. En la actualidad existe una gran demanda por parte de los consumidores de quesos de calidad constante, sin defectos, y con características organolépticas más intensas, que eran propias de estos productos en décadas anteriores (Hynes y Bergamini, 2006).

Para responder a dos aspectos contrapuestos como lo son el requerimiento de las NSLAB para el desarrollo de un *flavor* maduro, y los defectos indeseables causados por algunas NSLAB adventicias, la estrategia más aceptada consiste en el empleo de fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos en las elaboraciones de quesos (Crow y col., 2001; Wouters y col., 2002).

Los cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos son cepas de NSLAB seleccionadas que se adicionan a la leche de elaboración con un propósito diferente a la acidificación (Wouters y col., 2002). Su principal objetivo está dirigido a controlar el crecimiento de la microflora adventicia potencialmente perjudicial, con la finalidad de obtener productos de calidad satisfactoria y constante (Martley y Crow, 1993; Williams y col., 2002). Los cultivos adjuntos pueden inhibir el desarrollo de las NSLAB adventicias en forma directa, o indirecta por competición por un pool limitado de sustratos y factores de crecimiento presentes en el queso (Martley y Crow, 1993; Peláez y Requena, 2005). Por otro lado, además de ser utilizados como agentes de control, los fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos con atributos metabólicos interesantes pueden ser empleados para contribuir al desarrollo de compuestos de aroma y sabor con notas más intensas y distintivas, y/o acelerar el proceso de maduración, lo que permite reducir sustancialmente los costos (Wouters y col., 2002; Banks y Williams, 2004).

Para su empleo en la formulación de cultivos adjuntos, las cepas de origen NSLAB deben reunir los siguientes requisitos: **i)** no deben contribuir a la producción de ácido durante la elaboración, **ii)** deben crecer rápidamente y mantener altas densidades ($\sim 10^7$ UFC g^{-1}) bajo las condiciones nutricionales y fisiológicas que prevalecen en el ecosistema cuajada-queso, a fin de dominar el medio y controlar el desarrollo de las NSLAB adventicias, y **iii)** deben ejercer un efecto complementario con las bacterias del fermento primario, de manera de producir un balance de efectos deseables y ningún defecto en los quesos. Para garantizar estos requerimientos puede ser necesario un fermento constituido por más de una cepa (Crow y col., 2001; Hynes y Bergamini, 2006). No existe una reglamentación acerca de la dosis adecuada de fermentos adjuntos, pero estos generalmente se adicionan a la leche de elaboración en una concentración de $10^4 - 10^6$ UFC/ml.

Las cepas de NSLAB para la formulación de fermentos adjuntos generalmente se aíslan a partir de leche cruda o quesos maduros de buena calidad, mediante el empleo de medios de cultivos selectivos y no selectivos. Por lo general, estas cepas luego se identifican mediante técnicas microbiológicas clásicas, sistemas bioquímicos de identificación (ejemplo, API 20 NE) y técnicas de biología molecular, tales como electroforesis en gel de campo pulsado para caracterizar la relación entre cepas, y análisis de ARNr 16S (ácido ribonucleico ribosómico) para la confirmación de especies. Posteriormente, se estudian las propiedades tecnológicas de las cepas en forma individual, en ensayos *in vitro* y en modelos de quesos experimentales. El estudio concluye con la validación de los resultados en elaboraciones de queso a escala piloto, lo cual es de suma importancia para posibilitar la transferencia de los resultados al medio industrial (Crow y col., 2002; Hynes y Bergamini, 2006).

El criterio para la selección de cultivos adjuntos no ha sido completamente definido. Las cepas deben ser cuidadosamente elegidas dado que sólo un número limitado de NSLAB presentes en los quesos reúnen todas las propiedades requeridas (Williams y Banks, 1997; Wouters y col., 2002).

En la última década se ha dedicado una intensa labor de investigación a determinar los efectos de cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos en la calidad del queso, tanto en modelos experimentales (*slurries* de quesos, quesos miniatura, etc.) como en ensayos de elaboraciones de queso a escala piloto, ya sea en tinas abiertas o bajo condiciones microbiológicas controladas. En general, la mayor parte de los trabajos se han limitado al estudio de cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. brevis* (Banks y Williams, 2004), en quesos elaborados con cultivos iniciadores mesófilos.

En *slurries* o pastas estériles de queso, Farkye y col. (1995) encontraron que cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. casei* subsp. *casei* contribuyeron a la liberación de péptidos pequeños y aminoácidos durante la maduración, mientras que Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999) informaron que las muestras con adjuntos de *Lb. casei* presentaron niveles mayores de aminoácidos libres totales comparado con los controles. Estos autores también determinaron que la influencia en la proteólisis de cepas de *Lb. curvatus* y *Lb. paracasei* fue menor. Además, Martínez-Cuesta y col. (2001) reportaron que la cepa *Lb. casei* IFPL731 fue capaz de degradar un gran número de péptidos, incluyendo péptidos amargos con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, tales como la prolina. Asimismo, la cepa ensayada presentó una elevada actividad hidrolítica sobre péptidos conteniendo metionina, lo que puede contribuir al desarrollo del *flavor* del queso.

En general, los *slurries* sin adjuntos permanecieron libres de lactobacilos adventicios, mientras que en los *slurries* experimentales, las cepas de NSLAB adicionadas se mantuvieron en niveles elevados ($\sim 10^8$ UFC/g) durante toda la incubación, y no contribuyeron a la producción de ácido.

Por otra parte, en estudios realizados en modelos de queso miniatura elaborados asépticamente, Hynes y col. (2003a) demostraron que los lactobacilos adjuntos estudiados (cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum*) permanecieron en altas densidades ($\sim 10^8$ UFC/g) durante la maduración, mientras que en los quesos controles no se detectó desarrollo de NSLAB adventicias. En general, los adjuntos de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* incrementaron el contenido de aminoácidos libres totales e influyeron positivamente en la textura y el *flavor* del queso, pero su actividad varió de acuerdo a la cepa de fermento primario utilizada. Antonsson y col. (2003) caracterizaron varias cepas de lactobacilos aisladas a partir de queso Danbo maduro como cultivos adjuntos en un sistema modelo de queso preparado sin mantener condiciones de asepsia. Los investigadores reportaron que las cepas de *Lb. paracasei* estudiadas mejoraban los atributos sensoriales de los quesos, mientras que las de *Lb. plantarum* iban en detrimento de dichos atributos. En este estudio, los recuentos de lactobacilos en los quesos controles fueron muy elevados (6 log UFC/g). Di Cagno y col. (2006) estudiaron las actividades proteolíticas y lipolíticas de 17 cepas de lactobacilos mesófilos en un modelo de queso miniatura tipo Caciotta, elaborado también sin mantenimiento de condiciones de asepsia. En los quesos controles las NSLAB adventicias permanecieron en niveles inferiores a 10^4 UFC/g, mientras que los lactobacilos adjuntos en los quesos experimentales alcanzaron altas densidades y se mantuvieron en recuentos elevados (10^7 - 10^8 UFC/g) durante la maduración (36 días). Los cultivos adjuntos incrementaron los niveles de aminoácidos libres y de ácidos grasos libres respecto al control, y se detectó una gran variabilidad en las actividades proteolíticas y lipolíticas entre las distintas cepas ensayadas.

Como se mencionó previamente, los cultivos adjuntos de lactobacilos también se han ensayado en elaboraciones de queso, a escala piloto e industrial, en tinas estándares o en cubas cerradas y con precauciones extremas de higiene o asepsia. Los primeros trabajos son los de Broome y col. (1990) y Lee y col. (1990), que se llevaron a cabo en condiciones normales de elaboración. Broome y col. (1990) encontraron que las cepas de *Lb. casei* estudiadas fueron adecuadas para su empleo como adjuntos, dado que no interfirieron con el crecimiento y la actividad acidificante del fermento primario, no introdujeron cambios en la composición química del producto, e incrementaron los niveles de aminoácidos, como así

también, el desarrollo y la intensidad del *flavor*. Por el contrario, Lee y col. (1990) informaron que sólo dos cepas de lactobacilos (*Lb. casei* subsp. *casei* 119-10/62 y *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum* 137-10/62), de un total de 10 cepas ensayadas, exhibieron características tecnológicas adecuadas para su empleo como adjuntos; los quesos elaborados con estos cultivos presentaron una mayor calidad general que aquellos preparados sin lactobacilos. Una desventaja de los estudios de Broome y col. (1990) y Lee y col. (1990) radica en el elevado número de NSLAB presente en los controles ($> 10^7$ UFC/g). Posteriormente, Gomez y col. (1996) también detectaron efectos negativos en un queso semi-duro elaborado con leche pasteurizada debidos a un adjunto de *Lb. plantarum*: la adición de la cepa ensayada contribuyó a la producción de ácido durante la elaboración, provocando sobreacidificación. Sin embargo, el adjunto presentó algunas propiedades positivas, tales como la disminución de los niveles de péptidos hidrofóbicos, y la consecuente reducción del sabor amargo en quesos. En este estudio, tampoco se aplicaron medidas para reducir el número de NSLAB en los controles. Un enfoque diferente fue adoptado por McSweeney y col. (1994) y Lynch y col. (1996), quienes estudiaron varias cepas de *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lb. curvatus* y *Lb. plantarum*, como adjuntos en elaboraciones de queso Cheddar a escala banco y/o piloto en condiciones microbiológicas controladas. Los lactobacilos adventicios fueron detectados en los quesos controles en una concentración inicial de $\sim 10^2$ UFC/g, y si bien luego los recuentos se incrementaron hasta $\sim 10^6$ UFC/g, esto ocurrió lentamente, alcanzándose dicho valor a los 5 meses de maduración. En los quesos experimentales, los lactobacilos adjuntos se mantuvieron en niveles elevados ($\sim 10^8$ UFC/g), e incrementaron la formación de aminoácidos, como así también, la intensidad y la aceptabilidad del *flavor* del queso. Lane y Fox (1996) y Lynch y col. (1999) obtuvieron resultados comparables en elaboraciones estándares de queso Cheddar. Otros ejemplos de estudios que caracterizaron fermentos adjuntos en experiencias de elaboración de queso Cheddar a escala piloto son los de Swearingen y col. (2001) y Benech y col. (2003). En ambos trabajos se verificó una acción de disminución del sabor amargo atribuible a la acción peptidolítica de los adjuntos, un efecto que fue mayor cuando se usaron combinaciones de las cepas estudiadas.

Los fermentos adjuntos de lactobacilos también se han propuesto como soportes tecnológicos para mejorar la calidad de quesos bajos en grasa, ya que la calidad sensorial de estos productos generalmente es de pobres características, si se compara con los quesos de leche entera. Broadbent y col. (2003) reportaron que la adición de un adjunto de *Lb. casei* no influyó en las características sensoriales de quesos Cheddar y Colby reducidos en grasa, y no

suprimió completamente el desarrollo de las NSLAB, pero redujo la diversidad de las especies y cepas de lactobacilos adventicios en ambos tipos de quesos. El cultivo adjunto se mantuvo en altas densidades ($> 10^7$ UFC/g) y dominó la microflora de los quesos durante la maduración. En otros estudios, *Lb. casei* subsp. *ramnosus* (actualmente *Lb. rhamnosus*), utilizado como adjunto en queso Kefalograviera reducido en grasa, incrementó el contenido de péptidos pequeños y aminoácidos, e influyó positivamente en las características sensoriales, a través del incremento en la intensidad del *flavor* y del mejoramiento del cuerpo y la textura del queso (Katsiari y col., 2002; Michaelidou y col., 2003).

Los fermentos adjuntos de lactobacilos han sido propuestos para otras variedades de queso, que suponen distintas tecnologías de elaboración y, en consecuencia, distintas condiciones medioambientales para las bacterias. Entre ellas pueden citarse los quesos peninsulares Arzúa-Ulloa (Menéndez y col., 2000), Manchego (Poveda y col., 2003), Armada (Herreros y col., 2007), Serra da Estrela (Tavaria y col., 2006) y Roncal (Ortigosa y col., 2006; Irigoyen y col., 2007), alguno de ellos elaborados con leche de oveja. En queso Arzúa-Ulloa, Menéndez y col. (2000) encontraron que cultivos adjuntos de *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *pseudopplantarum* y *Lb. casei* incrementaron el contenido de diacetilo-acetoína y de ácidos grasos libres volátiles, y mejoraron las características sensoriales, otorgándole una textura suave y un *flavor* picante y levemente rancio, deseables en este tipo de variedad. En el resto de los estudios, se identificaron cepas de *Lb. plantarum* capaces de incrementar la proteólisis secundaria (Poveda y col., 2003) y acelerar la maduración, incrementando además la producción de compuestos volátiles (Ortigosa y col., 2006; Tavaria y col., 2006; Irigoyen y col., 2007). En general, se verificaron altos niveles de supervivencia, y en un caso, se constató un efecto sinérgico fermento primario – fermento adjunto, ya que el primero alcanzó recuentos más elevados en los quesos con adjunto (Ortigosa y col., 2006). En este último trabajo, así como en el de Herreros y col. (2007), también se aportó evidencia sobre el efecto benéfico del adjunto para controlar el desarrollo de la microflora indeseable: las enterobacterias disminuyeron más abruptamente en los quesos con adjunto.

En cuanto a los quesos italianos, Morea y col. (2007) elaboraron quesos Caciocavallo Pugliese con y sin la adición de un cultivo adjunto compuesto por dos cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y dos cepas de *Lb. parabuchneri*. Las cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* mostraron una buena supervivencia durante la maduración, mientras que las cepas de *Lb. parabuchneri* no fueron recuperadas al final de la maduración. Los autores informaron que los quesos elaborados con agregado de cultivo adjunto presentaron una mayor actividad

peptidasa y un mayor contenido de aminoácidos libres que los quesos sin inocular. Finalmente, Randazzo y col. (2008) evaluaron el efecto de seis cepas de lactobacilos sobre los perfiles de compuestos volátiles de quesos Pecorino Siciliano, y lo compararon con el generado por fermentos industriales empleados generalmente en la elaboración de este tipo de queso. La adición de los adjuntos de lactobacilos condujo a la formación de compuestos volátiles de aroma y sabor típicos, los cuales no fueron detectados en los quesos sin inocular. Los investigadores reportaron que los quesos elaborados con los cultivos adjuntos presentaron características sensoriales más pronunciadas que los fabricados con fermentos industriales.

Del análisis de la información publicada sobre fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos se puede concluir que existe un gran volumen de literatura y se llevan caracterizadas una gran cantidad de cepas en diversas matrices alimentarias. Los resultados de la mayoría de los estudios han indicado que la inclusión de cepas de lactobacilos como adjuntos en elaboraciones de quesos, condujo a un incremento en la proteólisis secundaria, lo que en algunos casos redundó en una mayor intensidad del *flavor* y en una aceleración del proceso de maduración del queso. Sin embargo, la búsqueda ha sido, hasta el momento, fundamentalmente empírica, ya que se intenta estudiar un gran número de cepas para retener aquellas mejores.

En efecto, aún no existen criterios consensuados para elegir una cepa antes de ensayarla en modelos y en matrices alimentarias reales, si bien se han sugerido algunos, que aparecen como los más razonables, a saber: la potencialidad probiótica de las cepas (Bertazzoni-Minelli y col., 2004; Bude-Ugarte y col., 2006) y su capacidad para catabolizar aminoácidos, producir compuestos de *flavor* (Tanous y col., 2002; Kieronczyk y col., 2004; Yvon, 2006) y/o degradar péptidos amargos (Gomez y col., 1996; Martínez-Cuesta y col., 2001). A pesar de la cantidad de información existente sobre fermentos adjuntos, algunos aspectos fundamentales de su crecimiento y actividad bioquímica en el queso no han sido estudiados. No se conoce la importancia de su interacción con distintos fermentos primarios, ni cómo afecta la proteólisis primaria el desarrollo y la actividad peptidolítica de los lactobacilos. Tampoco se ha dilucidado si las operaciones involucradas en la elaboración de distintas familias de quesos tienen un impacto mayor o menor en el adjunto.

Finalmente, el estudio de las cepas - seleccionadas ya sea según uno u otro criterio – en modelos representativos del alimento real es ineludible, y para ello se requiere de modelos válidos y reproducibles.

La motivación para hallar fermentos adjuntos de buen desempeño es importante por varias razones. Una de ellas es la habilidad de los lactobacilos mesófilos para crecer rápidamente y

alcanzar altas densidades en el queso durante la maduración, lo que le permite adicionarlas en niveles muy bajos al comienzo de la elaboración, y aún así obtener un impacto positivo en la calidad del queso (Beresford, 2003). Además, representa una poderosa estrategia para reestablecer las características únicas de las variedades de quesos tradicionales y/o para la formulación de nuevos productos lácteos con aromas y sabores novedosos y distintivos de una determinada región (Peláez y Requena col., 2005). Por último, el beneficio de mayor importancia radica en el control del desarrollo de la microflora adventicia durante la maduración del queso, y por lo tanto, de la calidad del producto final (Beresford, 2003).

Objetivos

Objetivo general:

Estudiar la evolución de las bacterias lácticas de origen fermento y no fermento en el queso, y su influencia en las transformaciones bioquímicas que tienen lugar durante la maduración.

Objetivos particulares:

- Desarrollar modelos experimentales representativos de quesos blandos y de quesos duros de pasta cocida.
- Describir la dinámica de un ecosistema simple (fermento-adjunto) durante la elaboración y maduración de quesos.
- Caracterizar desde un punto de vista tecnológico cepas de origen NSLAB, aisladas de quesos argentinos.
- Desarrollar fermentos adjuntos para quesería.
- Validar los resultados en fabricaciones de queso a escala piloto.
- Determinar la influencia de la proteólisis mediada por el fermento primario y por las enzimas no microbianas (coagulante y plasmina), en el crecimiento y actividad peptidolítica de lactobacilos mesófilos.

Capítulo 1

*“Desarrollo de modelos experimentales
representativos de matrices alimentarias reales:
queso Cremoso miniatura y extracto soluble de
queso Reggianito”*

1. Introducción

La mayoría de los estudios sobre la contribución de los diversos agentes de la maduración al desarrollo del *flavor* y la calidad del queso se han efectuado mediante ensayos de elaboraciones a escala piloto (Hunter y col., 1997). Sin embargo, este tipo de experimentos requiere equipamiento específico y presenta una alta demanda de recursos económicos, tiempo, y personal capacitado. Asimismo, tanto la reproducibilidad como el control de las condiciones microbiológicas pueden ser difíciles de lograr a escala piloto (Martley y Crow, 1993; Chapot-Chartier y col., 1994).

En este sentido, se han propuesto como alternativa varios sistemas modelo para estudiar el impacto en la calidad del queso de enzimas y fermentos primarios o adjuntos, entre otros factores tecnológicos, en forma rápida y económica.

Uno de los modelos propuestos consiste en sistemas acuosos que simulan las condiciones del queso. Su principal ventaja es que varios parámetros, tales como el pH y la concentración de NaCl, pueden ser definidos más fácilmente que en el alimento; sin embargo presentan la desventaja de que no reproducen las condiciones de elaboración, ni la complejidad de los cambios medioambientales que ocurren durante la maduración.

Otro modelo ampliamente utilizado son los *slurries*, o pastas de queso, en los que se logra una mayor aproximación a las condiciones reales que en los sistemas acuosos. Sin embargo, presentan la desventaja de que su cuerpo, textura y actividad acuosa difieren de la del queso. A pesar de que los sistemas acuosos y los *slurries* de quesos no reproducen las condiciones reales de elaboración y maduración, son útiles para estudiar en forma preliminar la influencia de los distintos agentes en la bioquímica de la maduración del queso (Fox y col., 1996).

Los modelos experimentales que mejor reproducen las condiciones reales de elaboración y maduración son los quesos elaborados a escala de laboratorio. Los quesos miniatura pueden elaborarse bajo condiciones microbiológicas controladas de una manera más sencilla que a escala piloto, y son reproducibles dado que la miniaturización permite lograr un mejor control de las condiciones medioambientales (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001). Hasta el momento se han implementado modelos de queso miniatura para queso Cheddar (Shakeel-Ur-Rehman y col., 1998a), queso de pasta lavada “Saint-Paulin” (Hynes y col., 2000) y queso Caciotta (Di Cagno y col., 2006), pero no se ha validado ningún modelo miniatura para quesos de pasta blanda.

El queso Cremoso es un ecosistema relativamente simple el cual sólo incluye un fermento primario termófilo constituido por cepas de *Streptococcus thermophilus*, y a diferencia de

muchos quesos blandos, no posee flora de superficie (Gripon, 1993; Choisy y col., 1997; Zalazar y col., 1999). Por otra parte, su proceso de elaboración no implica cocción o lavado de la cuajada, o etapas de cheddarización o hilado, lo que lo hace relativamente sencillo de miniaturizar y contribuye a la reproducibilidad del modelo (Hynes y col., 1999b; Zalazar y col., 1999).

En el presente trabajo se implementaron y validaron dos modelos experimentales obtenidos en condiciones asépticas, a saber, queso Cremoso miniatura y pasta o extracto soluble de queso Reggiano, con el objetivo de obtener ecosistemas simples que presentaran condiciones medioambientales similares a los quesos de pasta blanda y de pasta dura, respectivamente. Para ello, se valoró la reproducibilidad y aplicabilidad de ambos modelos al estudio de fermentos adjuntos para quesería, por medio de su caracterización química y microbiológica.

2. Materiales y Métodos

2.1. Desarrollo de un modelo de queso Cremoso miniatura

2.1.1. Ensayos preliminares

Previo a los experimentos de fabricación de quesos, se realizaron ensayos que consistieron en incrementar levemente la temperatura de pasteurización, a fin de identificar la mayor temperatura a la cual las propiedades de coagulación de la leche no resulten significativamente afectadas. El propósito de este ensayo fue disminuir tanto como sea posible la carga microbiana inicial de la leche de elaboración, especialmente las bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB), que constituyen un factor no controlado (Martley y Crow, 1993). Se estudiaron cuatro tratamientos térmicos: pasteurización estándar de baja temperatura (63°C, 30 min), y tres temperaturas más altas: 65, 67 y 69°C, todas durante 30 min. Luego de la pasteurización, la leche se enfrió hasta alcanzar una temperatura de 37°C, y se vertieron 30 ml de la misma en tubos falcon de 50 ml de capacidad, los que fueron colocados en un baño de agua a la misma temperatura. A cada tubo se le adicionó coagulante: 700 µl de una solución de 1 g/L quimosina (9 g quimosina activa/1000 g, Maxiren®, Gist-Brocades, Seclin, Francia) en buffer ácido acético-acetato (pH 5,5). Los tubos se agitaron con vortex y se colocaron rápidamente en el baño de agua. El tiempo de coagulación se controló en forma subjetiva rotando suavemente los tubos y determinando visualmente la floculación de las caseínas sobre las paredes. Los tubos se

mantuvieron en el baño de agua por un periodo equivalente al tiempo de coagulación, y luego se efectuó el corte del coágulo con una espátula de acero inoxidable. La capacidad de coagulación de la leche se evaluó subjetivamente por medio de la observación de los siguientes parámetros: limpieza al corte, firmeza del gel, consistencia de los granos de cuajada, presencia de partículas finas y color del suero. Esta experiencia se llevó a cabo por duplicado, en diferentes días con distinta leche, y los resultados definieron la temperatura de pasteurización a aplicar en los ensayos de elaboración de quesos.

2.1.2. Elaboración de quesos

La leche cruda utilizada en las elaboraciones fue provista por Milkaut Coop. Ltda. (Franck, Santa Fe, Argentina). Los quesos Cremoso miniatura fueron elaborados en vasos de precipitado esterilizados (estufa a 140°C durante 2 h) de 2,5 L de capacidad, provistos de una tapa de vidrio esmerilada. Se trasvasaron 2 L de leche pasteurizada a los vasos de precipitado, los que se colocaron en un baño de agua a 37°C. A la leche de elaboración se le adicionó 0,2 g/L de cloruro de calcio a fin de reponer el calcio iónico que precipita parcialmente durante el calentamiento, lo cual produce una desmineralización de las micelas de caseína y afecta negativamente el proceso de coagulación. Como fermento primario se empleó un cultivo liofilizado de adición directa a tina compuesto por cepas seleccionadas de *S. thermophilus* (Diagramma, Santa Fe, Argentina). El fermento se inoculó en la leche de elaboración (0,025 g/L) luego de ser hidratado durante 30 min a 37°C en leche descremada reconstituida estéril. El coagulante (9 g quimosina activa/1000 g, Maxiren®, Gist-Brocades, Seclin, Francia) se suspendió en agua destilada estéril y se adicionó (0,0225 g/L) a la leche de elaboración 15 min después que el fermento. El tiempo de coagulación se controló como se indicó anteriormente, y se estimó entre los 18 y 20 min. El coágulo se mantuvo por un periodo similar de tiempo para lograr una mayor firmeza del gel, y luego se cortó con instrumentos de corte (“liras”) en miniatura en cubos grandes de aproximadamente 0,5 cm de lado. El coágulo se dejó 3 min en reposo para que los granos de cuajada adquieran consistencia, y luego se realizó en tres oportunidades una agitación suave durante 5 min. Posteriormente se procedió al drenaje del suero y al moldeo de la cuajada. Los moldes se colocaron en una caja de acero inoxidable estéril (estufa a 140°C – 2 h), provista de una grilla para facilitar el drenaje del suero, y se mantuvieron en estufa a 45°C hasta que el pH de los quesos alcanzara valores de 5,20 – 5,30. Durante esta etapa los quesos se invirtieron cada 30 min y se verificó la evolución del pH. La determinación del pH se realizó por contacto directo del electrodo con la

masa del queso empleando un peachímetro Horiba (Horiba, Kioto, Japón). Una vez que los quesos alcanzaron el valor de pH indicado, se colocaron en los mismos recipientes estériles utilizados como tinas, y se salaron por inmersión en 1 L de salmuera estéril (200 g/L NaCl, pH 5,40) a 5°C a fin de detener inmediatamente el proceso de acidificación. Este paso es fundamental dado que si se alcanzan valores de pH demasiado bajos, aparece el defecto conocido como “arricotado”, que consiste en un producto final de masa ácida y quebradiza (Zalazar y col., 1999). Luego de 10 min, los quesos se retiraron de la salmuera y se colocaron en los moldes. Los moldes se ubicaron en las cajas de acero inoxidable estériles y se almacenaron durante toda la noche a 5°C para permitir el balance de sal y humedad en los quesos. Al día siguiente, los quesos se secaron con papel estéril (estufa a 120°C durante 4 h), se envasaron al vacío y se maduraron a 5°C.

Todas aquellas operaciones que requirieron de la apertura de las tinas se efectuaron entre dos mecheros. Los utensilios utilizados en la elaboración fueron esterilizados en estufa a 140°C durante 2 h. Previo a la elaboración de quesos, se irradió la superficie de trabajo con luz UV de acción germicida para minimizar la contaminación proveniente del medioambiente.

Cada día de elaboración se obtuvieron 4 quesos miniatura de 200 g. A fin de evaluar la reproducibilidad del modelo se llevaron a cabo 4 réplicas de fabricaciones de quesos (4 quesos miniatura x 4 días de elaboración).

2.1.3. Periodo de maduración

El periodo de maduración estándar para el queso Cremoso es de 20 – 30 días (Código Alimentario Argentino, ANMAT, 2008). Sin embargo, es probable que este periodo de tiempo no sea lo suficientemente prolongado para detectar algunas transformaciones bioquímicas tales como proteólisis secundaria o incremento del nivel de aminoácidos libres (AAL). Por esta razón, se buscó extender todo lo posible el periodo de maduración; los cambios químicos y microbiológicos fueron monitoreados a fin de establecer el tiempo máximo.

2.1.4. Muestreo y conservación de las muestras

Las muestras de queso para análisis fisicoquímico y microbiológico se extrajeron en varias ocasiones durante la maduración bajo condiciones asépticas. Para la toma de muestra, se abrió parcialmente el envoltorio y se limpió la superficie de la porción de queso a extraer con un algodón embebido en alcohol. Con una espátula de acero inoxidable estéril (esterilizada a la

llama) se obtuvo la muestra de queso a la que se le descartó la parte más cercana a la corteza. Finalizado el muestreo, se secó la superficie del queso con papel estéril y éste se envasó nuevamente al vacío. Para los recuentos microbiológicos se pesaron 10 g de queso en un erlenmeyer estéril, que se conservaron a 5°C hasta su análisis, realizado el mismo día. Para los análisis fisicoquímicos se tomaron aproximadamente 40 g de queso, que se trituraron y homogeneizaron mediante el uso de un mortero. Una porción de la muestra se destinó para los análisis de composición global y pH que se realizaron en forma inmediata. El resto, destinado a los estudios de proteólisis, se fraccionó en colectores destinados a los diferentes análisis y se conservó a – 20°C.

2.1.5. Análisis de los quesos

Determinación de pH

El pH de los quesos miniatura se determinó por duplicado en las muestras de 3 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 medición se realizó por contacto directo del electrodo con la muestra de queso y el valor se registró cuando la lectura se estabilizó en un valor constante.

Análisis de composición global

La composición global de los quesos se determinó por duplicado a los 3 días de maduración, empleando los métodos normalizados de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF).

Humedad. La determinación del contenido de humedad en los quesos se realizó por secado de la muestra a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta pesada constante (FIL-IDF, 1982:4A). Para ello, se utilizó un sistema de 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 3 g de la muestra de queso, mediante el uso de una balanza analítica. 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 del sistema (aproximadamente 5 h). Las masas de la muestra húmeda y desecada se obtuvieron por diferencia y se utilizaron para calcular el contenido de humedad.

Materia grasa. 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 (d: 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.

Proteínas totales. 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 el 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 al 96%. 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 al 32% (p/v), 60 ml de ácido bórico al 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 aproximadamente 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, se multiplica el valor obtenido de nitrógeno total por un factor, que varía de acuerdo al tipo de proteína. En el caso de los productos lácteos, este factor es igual a 6,38.

Análisis microbiológico

Los recuentos microbiológicos del fermento primario y de la flora microbiana adventicia (NSLAB, coliformes, hongos y levaduras) en los quesos se realizaron por duplicado al comienzo de la maduración (0 días) y luego de 3, 15, 30, 45 y 60 días. 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 diferentes medios, de acuerdo al grupo microbiano analizado. El recuento del fermento primario de *S. thermophilus* se realizó en placas de Agar leche descremada (APC-leche) luego de 48 h de incubación a 37°C (Frank y col., 1993). Las NSLAB se enumeraron en Agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) luego de la incubación de las placas a 34°C durante 48 h bajo condiciones de microaerofilia (Bude-Ugarte y col., 2006). El recuento de coliformes se realizó en Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) por incubación a 32°C durante 24 h (Christen y col., 1993), mientras que el de hongos y levaduras se llevó a cabo en Agar cloranfenicol – dextrosa (glucosa) – extracto de levadura (ACGY) a 25°C durante 5 días (Frank y col., 1993).

Estudio de la proteólisis

La proteólisis es un proceso complejo en el que intervienen diversos agentes tales como **i)** coagulante, **ii)** plasmina (principal proteínasa de la leche), **iii)** fermento primario, **iv)** NSLAB, y, en el caso en que estén presentes, **v)** cultivos secundarios (*Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, *Propionibacterium* sp., etc.) y **vi)** proteinasas o peptidasas exógenas utilizadas para acelerar el proceso de maduración. En muchas variedades de queso, las caseínas son hidrolizadas por el coagulante y, en menor extensión por la plasmina, con la formación de péptidos grandes (insolubles en agua) y de tamaño intermedio (solubles en agua); esta transformación se conoce como proteólisis primaria. La proteólisis secundaria implica la degradación de los péptidos generados por el coagulante y la plasmina a péptidos más pequeños y aminoácidos por acción de las proteinasas y peptidasas del fermento primario y de las NSLAB. Los productos finales de la proteólisis son los aminoácidos; su concentración en el queso en una determinada etapa de la maduración, es el balance neto entre su liberación a partir de las caseínas, su degradación y quizás su síntesis por parte de la microflora del queso (Pripp y col., 2000a; Sousa y col., 2001).

Dado que el proceso de proteólisis involucra varias etapas y distintos agentes proteolíticos, el mismo no puede ser descrito por un único parámetro. En efecto, un estudio detallado de los diferentes grados de proteólisis (primaria o secundaria) requiere de la aplicación de varias metodologías (Walstra y col., 1999; Sousa y col., 2001). La electroforesis de la fracción insoluble a pH 4,6 es la técnica generalmente utilizada para estudiar la proteólisis primaria, mientras que la proteólisis secundaria suele describirse mediante la determinación del contenido de nitrógeno en fracciones del extracto de queso solubles en distintos medios, la obtención de los perfiles peptídicos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), y la cuantificación del contenido de AAL totales e individuales (Grappin y Beuvier, 1997; Fox y McSweeney, 1998; Upadhyay y col., 2004).

En el presente estudio, la proteólisis se estudió en muestras de quesos de 3, 30 y 60 días de maduración a través de fraccionamiento nitrogenado, electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-PAGE) de la fracción insoluble a pH 4,6, y RP-HPLC de los péptidos solubles.

Fraccionamiento nitrogenado. Mediante esta metodología se determina el contenido de nitrógeno soluble (NS) en distintas fracciones. Se han propuesto varias posibilidades para fraccionar los compuestos nitrogenados del queso; para este estudio se seleccionaron: NS a pH 4,6 (NS-pH 4,6), NS en ácido tricloroacético al 12% (NS-TCA) y NS en ácido

fosfotúngstico al 2,5% (NS-PTA). La técnica se basa en la utilización de distintos agentes precipitantes para separar los compuestos nitrogenados de las muestras a partir de un extracto crudo del queso en solución de citrato, para luego determinar el contenido de nitrógeno en cada fracción mediante el método de Kjeldahl. Los péptidos presentes en el queso son fraccionados de acuerdo a su peso molecular, su hidrofobicidad y su conformación en los distintos solventes. Sin embargo, dado que no hay puntos de corte exactos entre fracciones, se producen solapamientos, ya que componentes que aparecen en las primeras fracciones, están presentes también en fracciones sucesivas (Noël y col., 1998; Ardö, 1999). En efecto, el contenido 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 (lisina, arginina y ornitina) y amoníaco (Grappin y Beuvier, 1997; Ardö, 1999). El fraccionamiento nitrogenado es un método inespecífico debido a que no brinda información sobre la naturaleza de los compuestos nitrogenados y sólo proporciona una idea aproximada de su tamaño (Sousa y col., 2001; Upadhyay y col., 2004). Sin embargo, la técnica es de gran utilidad para evaluar el grado de avance de la proteólisis primaria y secundaria, conceptos también denominados extensión y profundidad, respectivamente, de la proteólisis en quesos (Pripp y col., 2000b).

Para realizar el fraccionamiento nitrogenado, en primer lugar se obtuvo una suspensión del 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 empleando un mortero. 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 transvasó a un tubo falcon y se centrifugó a 3000 g durante 15 min, obteniéndose dos fracciones, una soluble y otra insoluble.

La fracción insoluble a pH 4,6 se destinó al estudio electroforético y se conservó a -20°C hasta su análisis.

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 con bolpipeta 10 ml 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 12% (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.

Electroforesis (Urea-PAGE). La electroforesis de la fracción insoluble a pH 4,6 permite la separación de las caseínas intactas y de los grandes péptidos generados por la actividad proteolítica del coagulante y de la plasmina (Ardö, 1999).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida con agregado de urea, dado que ésta disocia las distintas caseínas de la micela, permitiendo la separación de las mismas según su carga y masa (Upadhyay y col., 2004). El ensayo se realizó en una cuba vertical Mini-Protean II (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos), con una fuente de poder modelo 1000/500 (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos) utilizando un sistema de gel discontinuo (Andrews, 1983). Se empleó una concentración de acrilamida de 4% para el gel de apilamiento, y de 7,5% para el gel de separación. La concentración de acrilamida en este último fue menor que la propuesta por Andrews (1983) para el análisis de leche (12%), debido a que en la muestra analizada la concentración de proteínas de suero es despreciable (Ng-Kwai-Hang y Kroeker, 1984). Los geles de apilamiento y de separación se prepararon a partir de una solución madre de acrilamida-bisacrilamida 30,8%, a la que se le adicionó buffer Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8 en el caso del primero, y buffer Tris-HCl de pH 8,8 y urea

(concentración en el gel: 7,5 M), en el caso del segundo. Se utilizó una solución de persulfato de amonio al 10% (p/v), preparada inmediatamente antes de su uso, y de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) como iniciador y catalizador, respectivamente, de la reacción de polimerización del gel de acrilamida-bisacrilamida. Para la preparación de las muestras y del patrón se disolvieron 10 mg de la fracción insoluble a pH 4,6 y 4 mg de caseinato de sodio, respectivamente, en un 1 ml de buffer de muestra, compuesto por buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, urea (concentración final en el buffer: 7,5 M) y una punta de espátula de azul de bromofenol. Se sembraron 15 µl de muestra y de caseinato patrón, y las corridas se realizaron en medio alcalino utilizando Tris-glicina pH 8,3 como buffer de corrida, bajo las siguientes condiciones: voltaje constante de 150 V, intensidad máxima de 45 mA y potencia de 6,75 W. La finalización de la corrida se determinó por la llegada del frente de avance hacia el final de la placa, lo que se evidenció por el colorante adicionado a la muestra. Los geles se colorearon con solución de Coomassie Blue R-250 al 0,2% (p/v) en ácido acético, etanol y agua destilada (1,6:4:4) durante 1 h (Blakesley y Boezi, 1977), y luego se decoloraron mediante repetidos lavados con solución decolorante, compuesta por ácido acético, etanol y agua destilada (1:2,5:6,5).

Perfiles peptídicos por RP-HPLC. Esta técnica permite la separación de péptidos o grupos de péptidos, obteniéndose un perfil proteolítico característico de cada muestra. Los perfiles peptídicos de los quesos a distintos tiempos de maduración reflejan el complejo equilibrio entre su producción y su posterior degradación a aminoácidos (Pripp y col., 2000b). En RP-HPLC, la fase móvil es polar mientras que la fase estacionaria es no polar. A pH normal de los extractos de queso, los péptidos presentan baja afinidad por la fase estacionaria dado que por lo general presentan una elevada polaridad. Una manera de disminuir la polaridad de los péptidos y mejorar la separación cromatográfica, consiste en acidificar la fase móvil mediante la adición de ácido trifluoroacético. La disminución del pH de la fase móvil a valores inferiores a 3, transforma los grupos carboxilos de los aminoácidos en su forma no disociada. Asimismo, el ácido trifluoroacético actúa como par iónico bloqueando los grupos básicos de los aminoácidos que al pH ácido de la fase móvil se encuentran cargados (Singh y col., 1999).

El equipamiento utilizado consistió en una bomba cuaternaria, un desgasificador en línea y un detector UV-Visible, todo perteneciente a la serie 200 de Perkin Elmer. La adquisición de los datos se realizó por medio de una interfase analógica conectada a una computadora con el software Turbochrom® (Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos). Se empleó una columna

analítica tipo Aquapore OD-300 C18, de 220 x 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 7 μm y un tamaño de poro de 300 Å (Perkin Elmer).

El análisis de los perfiles peptídicos se realizó sobre un extracto de queso soluble en agua. Para tal fin, se homogenizaron 5 g de queso con 15 ml de agua destilada utilizando mortero. La suspensión se trasvasó a un tubo de centrifuga falcon de 50 ml de capacidad, enjuagando con 5 ml de agua destilada e incorporando dicho líquido al tubo. Durante esta operación, se trató de no incorporar la materia grasa al tubo, ya que su presencia dificulta el procedimiento posterior de filtrado. La muestra se incubó en un baño de agua a 40°C durante 1 h, luego de lo cual se centrifugó a 3000 g durante 10 min. Luego de la centrifugación, se descartó cualquier resto de materia grasa que hubiere quedado en el tubo con la ayuda de una espátula, y el sobrenadante se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 42. La solución resultante se llevó a un volumen de 25 ml con agua destilada, constituyendo de esta manera la fracción de nitrógeno soluble en agua. La muestra se transvasó a un colector adecuado y se conservó a -20°C hasta su análisis. Una alícuota de la fracción de nitrógeno soluble en agua se filtró a través de membranas de 0,45 μm de tamaño de poro (Millex, Millipore, San Pablo, Brasil), y un volumen de 60 μl del filtrado se inyectó en el cromatógrafo. Las corridas cromatográficas se llevaron a cabo a una temperatura de 40°C y a una longitud de onda de detección de 214 nm. La separación se llevó a cabo en un gradiente lineal de acetonitrilo en agua, que se formó en la bomba del instrumento a partir de dos fases móviles: A_P, consistente en agua bidestilada- ácido trifluoracético (TFA) (1000:1,1, v/v), y B_P, compuesta de acetonitrilo- agua bidestilada- TFA (600:400:1, v/v/v). La corrida inició con 100% de A_P y el gradiente comenzó después de 10 min de la inyección de la muestra. Se incrementó gradualmente la proporción de fase móvil B_P en la mezcla a razón de 1%/min durante 80 min, y luego en un 20%/min durante 1 min, alcanzando posteriormente una meseta de 100% de B_P que se mantuvo por 4 min. Finalmente, en el término de 1 min se retornó a las condiciones iniciales (100% de A_P) que se mantuvieron durante 10 min (Tabla 1.1) (Bergamini y col., 2006a). El tiempo total de corrida fue de 106 min y el flujo de fase móvil de 1 ml/min.

Tabla 1.1. Cambio en la proporción de las fases móviles A_p y B_p para la formación de un gradiente lineal de acetonitrilo en agua empleado en la separación cromatográfica de los péptidos solubles en agua.

Tiempo total (min)	%A _p	%B _p
1	100	0
10	100	0
90	20	80
91	0	100
95	0	100
96	100	0
106	100	0

Fase móvil A_p: agua bidestilada- ácido trifluoracético (TFA) (1000:1,1, v/v), y Fase móvil B_p: acetonitrilo- agua bidestilada- TFA (600:400:1, v/v/v); todos los gradientes generados fueron rampas lineales.

Análisis sensorial

Se evaluó el aroma de los quesos Cremoso miniatura por comparación con un queso Cremoso estándar obtenido en la planta piloto del INLAIN, aplicando una metodología denominada ensayo triangular simple (AFNOR, NF V09-013, 1995). Este método permite detectar diferencias entre dos productos diferentes, ya sea en el conjunto de sus propiedades o en una sola de ellas, por medio de una comparación triangular. El ensayo consiste en presentar simultáneamente a los panelistas un juego de tres muestras, de las cuales dos son idénticas, a fin de designar la muestra diferente. El orden de presentación de las muestras se debe ir rotando entre las seis combinaciones posibles para eliminar la influencia del orden de la evaluación. El número de panelistas a escoger depende del error que se quiera aceptar. Para llevar a cabo el ensayo, se pesaron 5 g de queso en recipientes de vidrio con cierre hermético, que se mantuvieron en estufa durante 30 min a una temperatura de 30°C para facilitar la liberación de los compuestos volátiles. A cada panelista se le entregaron tres muestras, dos de ellas provenientes de un mismo queso y la otra de un queso diferente, rotuladas al azar con números de tres cifras. El panel se compuso por doce miembros entrenados.

2.1.6. Análisis estadístico

Los datos de composición química, recuentos microbiológicos y fraccionamiento de nitrógeno de los quesos se analizaron mediante análisis de la variancia (ANOVA) de una vía, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus v 3.0 (Statistical Graphics Corp., Herndon, Virginia, Estados Unidos).

Con respecto al análisis sensorial (ensayo triangular simple), el número de respuestas totales y correctas se interpretó utilizando la distribución binomial (parámetro $p=1/3$), a fin de determinar si las muestras presentaban diferencias significativas, y en tal caso, proporcionar el nivel de significación (AFNOR, NF V09-013, 1995).

2.2. Desarrollo de un modelo experimental a partir de queso de pasta dura

Para representar las condiciones medioambientales de quesos de pasta dura cocida, en un principio se propusieron dos modelos experimentales: una pasta de queso y un extracto soluble. Para la puesta a punto de ambos modelos se empleó un queso Reggianito del mercado.

2.2.1. Obtención de una pasta de queso Reggianito

Un modelo alimentario tipo pasta o *slurry* de queso Reggianito se obtuvo mediante la homogenización de queso triturado con una cantidad determinada de agua destilada, suficiente para alcanzar una humedad final del 60%, utilizando un mortero. Para conocer el volumen de agua a adicionar, previamente se determinó el contenido de humedad del queso de acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.1.5 de este capítulo. Luego de la preparación de la pasta de queso se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

pH. El pH de la pasta se determinó de acuerdo a la metodología especificada en la sección 2.1.5 de este capítulo, y se ajustó a un valor comprendido entre 5,2 – 5,3 mediante el agregado de ácido láctico concentrado.

Contenido de sal. El contenido de cloruro de sodio en la pasta de queso se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica (AOAC, 1990). Se pesó aproximadamente 1 g de muestra en un crisol de porcelana, y se secó en estufa a 100°C durante 15 h. Luego, la muestra seca se introdujo en una mufla y se incrementó gradualmente la temperatura (aproximadamente 100°C/h) hasta alcanzar 500°C. La muestra se mantuvo a dicha temperatura hasta la obtención de cenizas, lo que generalmente demandaba 5 h. En este paso,

las cenizas obtenidas presentaban un color grisáceo debido a la presencia de partículas de carbono. Para eliminar las partículas de carbono y completar la calcinación de la muestra, ésta se retiró de la mufla y una vez fría, se humedeció con gotas de ácido nítrico 1:1, y se colocó nuevamente en la mufla. Se realizó un calentamiento gradual a 100°C, luego 300°C y finalmente 500°C, con una hora en cada etapa. La muestra se retiró de la mufla y las cenizas se disolvieron en el mismo crisol con ácido clorhídrico 1 N. Luego, la solución se trasvasó a un matraz de 50 ml y se enrasó con agua destilada. Mediante espectrofotometría de absorción atómica se determinó el contenido de sodio de la solución, cuyo resultado se expresó en ppm o mg/L de sodio. A partir de dicho valor se calculó la concentración de cloruro de sodio en la humedad del queso. El contenido de cloruro de sodio de la pasta se ajustó a un valor de 5 g% de sal en la humedad mediante la adición de salmuera al 30% (p/v).

Una masa de aproximadamente 100 g de pasta se colocó en tres frascos estériles de 250 ml de capacidad con cierre hermético, los que fueron posteriormente sometidos a tres tratamientos térmicos diferentes, a saber: esterilización por vapor fluente a 85°C – 10 min (TL), esterilización por vapor fluente a 95°C – 10 min (TM) y esterilización en autoclave a 115°C – 30 min (TA). Una porción de la pasta no fue sometida a tratamiento térmico y se utilizó como control (C). Luego de los tratamientos térmicos las muestras se enfriaron a una temperatura de 40°C y se observó la consistencia de las mismas para evaluar si era compatible con el agregado de microorganismos y su distribución homogénea. Posteriormente, se tomaron muestras en condiciones de asepsia para la determinación de pH, humedad, cloruro de sodio, proteínas totales y perfiles peptídicos (sección 2.1.5); este último estudio se realizó para establecer si los tratamientos térmicos aplicados producían modificaciones en la matriz proteica y para conocer los perfiles a tiempo inicial. El pH de las muestras se ajustó nuevamente a valores comprendidos entre 5,2 – 5,3 mediante la adición de ácido láctico esterilizado por filtración (0,2 µm tamaño de poro, Millex, Millipore, San Pablo, Brasil) cuando fue necesario. El NaCl se analizó para verificar el correcto ajuste al valor de consigna (5% de sal en la humedad). La preparación de la pasta se llevó a cabo por duplicado utilizando el mismo queso Reggianito.

2.2.2. Obtención de un extracto soluble de queso Reggianito

Un segundo modelo propuesto para el estudio de quesos de pasta dura fue un extracto representativo de la fase acuosa de tales alimentos. Para obtenerlo, se disgregaron 200 g de queso Reggianito triturado con 200 ml de agua destilada en un recipiente mezclador hasta la

obtención de una pasta homogénea. La pasta se distribuyó en tubos de centrífuga falcon, que se equilibraron y centrifugaron a 3000 g durante 20 min. Luego de la centrifugación se obtuvieron tres fases, a saber: una fase inferior sólida compuesta por las caseínas, una fase intermedia acuosa que contiene los componentes solubles del queso, tales como los carbohidratos, proteínas del suero, péptidos y aminoácidos, y una fase superior grasa que incluye a los glóbulos grasos y restos de sus membranas. Los tubos se colocaron a -20°C durante 15 min para que la capa de grasa solidifique. Luego, a través de un pequeño orificio realizado en esta capa, se extrajo con una pipeta pasteur la fase soluble, que se transvasó a tubos colectores. El extracto soluble se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 42, y luego a través de prefiltros de fibra de vidrio (Millipore, San Pablo, Brasil). Se midió con una probeta el volumen total de extracto soluble obtenido, y luego se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

Contenido de sal. El contenido de cloruro de sodio en el extracto soluble se determinó mediante el método de Mohr (Kolthoff y col., 1988). Para ello, se tomaron con bolpipeta 2 ml del extracto soluble que se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml de capacidad, al que se le adicionaron 25 ml de agua destilada y 1 ml de solución indicadora de cromato de potasio 5% (p/v). Asimismo, se preparó un blanco con 30 ml de agua destilada y 1 ml del indicador, dado que el agua destilada, aunque raramente, puede contener trazas de cloruros. Las muestras se titularon con solución valorada de nitrato de plata aproximadamente 0,1 N hasta viraje del amarillo al rojo-marrón pálido. En base al valor obtenido de cloruro de sodio en el extracto soluble, se calculó el volumen de salmuera 30% a adicionar para obtener un contenido de sal final del 5%.

pH. El pH se determinó por inmersión del electrodo en una alícuota del extracto soluble empleando el equipamiento descrito en la sección 2.1.5 de este capítulo. El pH del extracto soluble se ajustó a 5,25 mediante la adición de ácido láctico concentrado.

Una vez ajustados el pH y el contenido de sal, el extracto soluble se esterilizó por filtración a través de filtros estériles de 0,45 µm de tamaño de poro y se recolectó en frascos estériles con tapa hermética de 100 ml de capacidad. La preparación del extracto se realizó por triplicado utilizando como materia prima el mismo queso Reggianito.

2.2.3. Seguimiento del crecimiento microbiano en los modelos propuestos

Los dos tipos de modelos obtenidos, pasta o *slurry* y extracto acuoso de queso de pasta dura, se incubaron a 34°C. La duración del periodo de incubación no se fijó de antemano, sino

que fue uno de los parámetros a establecer de acuerdo a los resultados del análisis microbiológico.

Se tomaron muestras en condiciones de asepsia antes (tiempo 0) y durante la incubación, para determinar el pH y realizar recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales (APC, 32°C – 48 h). En el modelo de extracto soluble también se obtuvieron los perfiles peptídicos de las muestras a distintos tiempos de incubación mediante RP-HPLC. Las condiciones de análisis fueron las detalladas previamente, excepto por una modificación en la concentración de una de las fases móviles. En efecto, la proporción de agua bidestilada/acetonitrilo/ácido trifluoroacético en la fase B_p se modificó según: acetonitrilo/agua bidestilada/TFA 400:600:1, v/v/v. La disminución en la concentración de acetonitrilo estuvo dirigida a obtener una rampa más lenta en la concentración de este solvente en agua, y, en consecuencia, una mejor resolución de los picos. Una alícuota del extracto soluble se filtró a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Millex, Millipore, San Pablo, Brasil), y un volumen de 60 µl del filtrado se inyectó en el cromatógrafo.

3. Resultados y Discusión

3.1. Modelo de queso Cremoso miniatura

3.1.1. Influencia del tratamiento térmico en la aptitud a la coagulación

La Tabla 1.2 ilustra los cambios en la aptitud a la coagulación de la leche de acuerdo al tratamiento térmico aplicado. El tiempo de coagulación de las leches tratadas a 63 y 65°C fue similar (30 – 32 min), y con ambos tratamientos se obtuvieron geles comparables y de buena calidad. Por el contrario, en el caso de las leches pasteurizadas a 67 y 69°C, el tiempo de coagulación fue más prolongado (38 - 42 min) y se obtuvieron coágulos débiles. Asimismo, los dos tratamientos térmicos más enérgicos condujeron a la formación de partículas finas de cuajada detectables en el suero sobrenadante. Rynne y col. (2004) elaboraron quesos Cheddar reducidos en materia grasa a partir de leche pasteurizada a 72°C, 77°C, 82°C y 87°C durante 26 s, e informaron que el tiempo de coagulación aumentó de 48 min a 78 min cuando la temperatura de pasteurización se incrementó desde 72°C hasta 87°C. Estos investigadores también observaron que el incremento de la temperatura ocasionó un aumento en el nivel de proteínas del suero desnaturalizadas, lo que condujo a la formación de un coágulo débil.

Grappin y Beuvier (1997) informaron que bajo condiciones de pasteurización estándar, solamente un 7% de las proteínas del suero son desnaturalizadas.

El efecto de elevadas temperaturas de pasteurización sobre la coagulación de la leche se ha atribuido a los siguientes factores: **i)** formación de un complejo entre las proteínas del suero desnaturalizadas (fundamentalmente la β -lactoglobulina) y la κ -caseína en la superficie de las micelas de caseína; **ii)** disminución concomitante de la accesibilidad del coagulante a la κ -caseína; **iii)** precipitación del fosfato de calcio inducida por el calor, y la consecuente disminución en los niveles de fosfato de calcio nativo, el cual es fundamental para la unión de las micelas de para-caseína, y **iv)** impedimento estérico de los agregados de caseína/ proteína del suero para el acercamiento y fusión de las micelas de para-caseína (Grappin y Beuvier, 1997; Rynne y col., 2004). Las principales consecuencias de estos fenómenos son un incremento en el tiempo de coagulación y una reducción de la sinéresis (Pearse y Mackinlay, 1989; Grappin y Beuvier, 1997). La disminución de la sinéresis conduce a un mayor contenido de humedad en el coágulo, lo que a su vez ocasiona una disminución de la firmeza y del esfuerzo de fractura (Rynne y col., 2004).

Dado que en el presente trabajo se comprobó que los tratamientos térmicos a 67°C y 69°C perjudicaron la coagulación, se decidió pasteurizar la leche empleada en las elaboraciones a 65°C durante 30 min. En efecto, el tratamiento a esta temperatura no causó modificaciones en la transformación casearia, y al ser ligeramente más energético que la pasteurización convencional de baja, favorece la obtención de una leche de quesería de buena calidad microbiológica.

Tabla 1.2. Aptitud a la coagulación de la leche sometida a diferentes tratamientos térmicos.

Tratamiento térmico	Tiempo de coagulación (min)	Consistencia del coágulo	Tratamiento térmico/ Observaciones
63°C – 30 min	30	Óptima	Estándar
65°C – 30 min	32	Buena	Más energético, mantiene la calidad del gel
67°C – 30 min	38	Regular	Enérgico, coágulo débil y formación de finos
69°C – 30 min	42	Mala	Muy enérgico. Coagulación muy lenta y coágulo muy débil.

3.1.2. Composición química y curva de acidificación

La composición global y el pH de los quesos Cremoso miniatura a los 3 días de maduración se muestran en la Tabla 1.3. Todos los valores estuvieron dentro del rango normal establecido para queso Cremoso estándar (Código Alimentario Argentino, ANMAT, 2008), lo que indicó que el modelo de queso Cremoso miniatura era representativo de la matriz alimentaria real. Asimismo, el pH y el contenido de humedad, materia grasa y proteínas totales no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los quesos elaborados en el mismo día con la misma leche, o en días diferentes con distinta leche, lo que demostró que el método de preparación del modelo era preciso y daba como resultado unidades experimentales repetitivas y reproducibles. Shakeel-Ur-Rheman y col. (1998a) y Hynes y col. (2000) diseñaron protocolos para la elaboración de quesos miniatura tipo Cheddar y Saint Paulin (queso de pasta lavada), respectivamente, e informaron que los valores de composición global fueron semejantes a los del queso convencional, y que no se encontraron diferencias significativas entre los quesos elaborados en diferentes días. Resultados similares fueron observados por Di Cagno y col. (2006) quienes elaboraron quesos miniatura tipo Caciotta utilizando el método de Shakeel-Ur-Rheman y col. (1998a) adaptado a la tecnología de fabricación de esta variedad.

Tabla 1.3. Composición global y pH de quesos Cremoso miniatura provenientes de cuatro elaboraciones realizadas en diferentes días y con distinta leche; los ensayos se realizaron a los 3 días de maduración.

Día de elaboración	1	2	3	4
Humedad (%)	53,54 ± 1,13	53,46 ± 2,03	52,83 ± 2,56	51,94 ± 2,25
Materia grasa (%)	23,02 ± 0,16	22,71 ± 1,50	24,10 ± 2,11	23,94 ± 2,32
Proteína total (%)	18,25 ± 0,32	18,23 ± 0,90	19,42 ± 1,00	19,28 ± 0,73
pH	5,25 ± 0,04	5,24 ± 0,03	5,23 ± 0,07	5,21 ± 0,05

Se informa el promedio y la desviación estándar de cuatro quesos (réplicas) obtenidos por elaboración.

La curva de acidificación de los quesos Cremoso miniatura durante la elaboración se muestra en la Figura 1.1. El pH de los quesos al comienzo de la etapa de incubación en cámara caliente fue de ~ 6,65, pero luego comenzó a decrecer en forma gradual hasta alcanzar

valores de 5,2 – 5,3. La evolución del pH durante la elaboración fue similar en todos los quesos, y semejante a la obtenida en la elaboración de queso Cremoso a escala industrial.

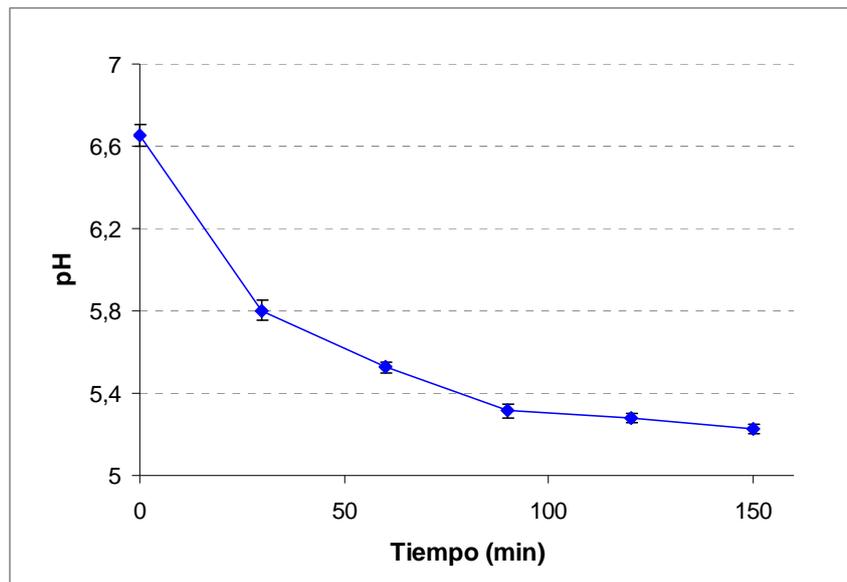


Figura 1.1. Curva de acidificación de los quesos Cremoso miniatura elaborados con un fermento primario de *Streptococcus thermophilus*.

3.1.3. Recuentos microbiológicos y tiempo de maduración

La Figura 1.2 muestra los recuentos del fermento primario y de la microflora adventicia en los quesos Cremoso miniatura, luego de 0, 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

Durante la elaboración el fermento primario aumentó desde 10^6 UFC/ml de leche hasta 10^8 UFC/g de cuajada en la etapa de moldeo. En los primeros tres días de maduración, la población del fermento primario creció 1 orden log (10^9 UFC/g), y luego permaneció constante hasta los 60 días. La evolución del fermento primario durante la maduración de los quesos Cremoso miniatura fue similar a la observada por Bude-Ugarte y col. (2006) para quesos Cremoso comerciales.

El recuento inicial de NSLAB en los quesos miniatura fue bajo ($\sim 10^2$ UFC/g), y si bien luego se incrementó gradualmente, estos microorganismos se mantuvieron siempre por debajo de 10^4 UFC/g durante un periodo de 60 días. Hynes y col. (2000) informaron que los recuentos de los lactobacilos adventicios permanecieron por debajo de 10^2 UFC/g en quesos miniatura de pasta lavada elaborados bajo condiciones microbiológicas controladas, pero dichas muestras fueron maduradas solamente por 28 días. Di Cagno y col. (2006) observaron en quesos Caciotta miniatura recuentos máximos similares a los que se encontraron en el

presente trabajo, aún para un periodo de maduración mucho más breve (36 días). Por otro lado, el recuento de NSLAB en el queso Cremoso modelo fue notablemente inferior que el detectado en quesos Cremoso del mercado. En efecto, se ha informado que quesos Cremoso comerciales elaborados con leche pasteurizada exhibieron recuentos de NSLAB de alrededor de 10^7 y 10^8 UFC/g luego de 10 y 70 días de maduración, respectivamente (Bude-Ugarte y col., 2006). Esta diferencia de aproximadamente 4 ciclos log en los recuentos de NSLAB entre quesos Cremoso miniatura y comerciales, demuestra la efectividad de la técnica de elaboración en condiciones asépticas para el control del crecimiento de los lactobacilos adventicios durante la maduración.

El recuento de coliformes luego de la etapa de elaboración fue sorprendentemente elevado ($\sim 10^4$ UFC/g), pero luego disminuyó rápidamente durante la maduración alcanzando valores de aproximadamente 10^2 UFC/g a los 60 días. Dado que los quesos se obtuvieron bajo condiciones microbiológicas controladas, la fuente de bacterias coliformes fue probablemente una leche cruda altamente contaminada. Sin embargo, dado que no se habían programado recuentos microbiológicos de la leche de elaboración, fue imposible confirmar esta hipótesis.

El recuento de hongos y levaduras mostró una tendencia contraria a la observada para las bacterias coliformes, dado que se incrementó gradualmente a lo largo de la maduración desde valores muy bajos ($\sim 10^1$ UFC/g) hasta 10^4 UFC/g hacia los 60 días.

Como se indicó anteriormente, el tiempo de maduración de los quesos miniatura se fijó en base a la evolución de los grupos de microorganismos estudiados, teniendo en cuenta además la finalidad de los modelos. En efecto, un tiempo de maduración extendido favorece la detección de cambios bioquímicos debidos a los agentes enzimáticos presentes en el queso, pero debe limitarse si se verifica el crecimiento de microflora no láctica, capaz de producir modificaciones atípicas y enmascarar los fenómenos estudiados. En nuestro caso, la disminución del número de bacterias coliformes con el avance de la maduración y el mantenimiento de recuentos de NSLAB bajos permitieron prolongar el tiempo de maduración del queso modelo hasta 60 días. La maduración no se extendió por un periodo de tiempo mayor por dos razones: **i)** los hongos y levaduras alcanzaron valores de 10^4 UFC/g hacia los 60 días, y **ii)** los quesos se ablandaron demasiado, e incluso algunos se volvieron completamente fluidos. Un recuento elevado de hongos y levaduras no representa una característica propia del queso Cremoso y puede conducir a interpretaciones erróneas respecto a los patrones de proteólisis y lipólisis, como así también de la producción de aroma. Por otra parte, los quesos Cremoso demasiado blandos o fluidos se consideran de calidad inferior.

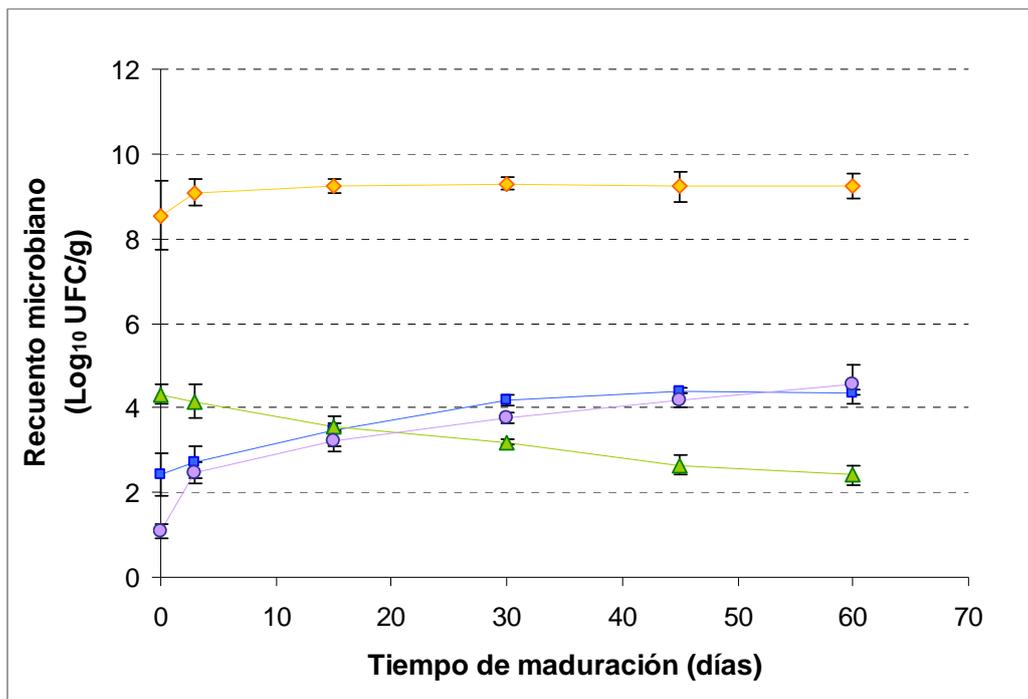


Figura 1.2. Evolución de las poblaciones microbianas durante la maduración de los quesos Cremoso miniatura. *Streptococos* del fermento primario (◆), *Lactobacilos* adventicios (■), bacterias coliformes (▲), y hongos y levaduras (●). Se indica el valor promedio y la desviación estándar de 16 quesos (4 fabricaciones x 4 quesos por fabricación).

3.1.4. Proteólisis primaria y secundaria

La Figura 1.3 muestra la electroforesis urea-PAGE de los quesos Cremoso miniatura a los 3, 30 y 60 días de maduración. Los quesos se caracterizaron por una extensiva y progresiva hidrólisis de la α_{s1} -caseína con el avance de la maduración, y por la consecuente formación del péptido α_{s1} -CN (f24-199), conocido anteriormente como α_{s1} -I-caseína. La β -caseína, aunque en menor extensión que la α_{s1} -caseína, fue hidrolizada durante la maduración con la producción de γ -caseínas. La α_{s1} -caseína es degradada principalmente por la enzima coagulante, mientras que la β -caseína es el sustrato preferencial de la plasmina (principal proteasa nativa de la leche). Dado que el coagulante es sensible al calor, la actividad de esta enzima es particularmente importante en aquellos quesos cuya elaboración no implica una etapa de cocción. La plasmina, por el contrario, es relativamente estable a la temperatura, y en consecuencia su actividad es de especial importancia en las variedades de queso que incluyen el tratamiento de la cuajada a temperatura elevada (Kelly y McSweeney, 2003). La degradación de la α_{s1} -caseína es el principal cambio bioquímico que ocurre durante la

maduración del queso Cremoso (Hynes y col., 1999a; Hynes y col., 2001b), dado que en esta variedad la actividad de la enzima coagulante se ve favorecida por varias razones: **i)** el elevado contenido de humedad, con lo que disminuye la pérdida de coagulante en el suero, **ii)** la ausencia de una etapa de cocción, y **iii)** el pH del queso Cremoso durante la maduración que se mantiene en valores cercanos a 5, lo que es favorable para la acción de la enzima coagulante.

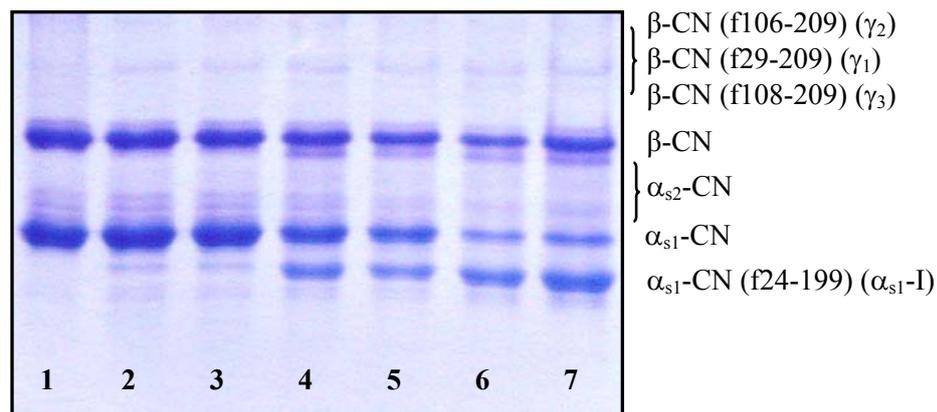


Figura 1.3. Electroforesis urea-PAGE de los quesos Cremoso miniatura. Línea 1: caseinato patrón. Líneas 2 y 3: quesos de 3 días de maduración. Líneas 4 y 5: quesos de 30 días de maduración. Líneas 6 y 7: quesos de 60 días de maduración. A modo de ejemplo se muestran los resultados de dos réplicas de queso, de un total de 16 (4 réplicas x 4 fabricaciones).

Los valores del contenido de NS en las distintas fracciones de los quesos Cremoso miniatura luego de 3, 30 y 60 días de maduración se detallan en la Tabla 1.4. Los quesos elaborados el mismo día o en días diferentes no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los niveles de NS a pH 4,6, en TCA o en PTA. Por otra parte, el contenido de NS a pH 4,6 se incrementó durante el periodo de maduración hasta alcanzar valores de aproximadamente el 15 % del N total. Estos resultados coinciden con los publicados previamente por Hynes y col. (1999b; 2001b). Las fracciones de NS-TCA y NS-PTA, que representan a péptidos de tamaño pequeño a mediano y oligopéptidos y aminoácidos, respectivamente, no evidenciaron un grado avanzado de proteólisis secundaria en los productos. Esto concuerda también con informes previos para queso Cremoso, en los cuales se reportaron valores de alrededor del 7% y 1% del N total, para NS-TCA y NS-PTA, respectivamente (Hynes y col., 1999b). A pesar de que el tiempo de maduración de los quesos

miniatura se duplicó con respecto al periodo estándar, esta medida no llevó a un aumento constante del NS en las distintas fracciones. En efecto, el mayor incremento de NS a pH 4,6 y en TCA se observó durante el primer mes, ya que los valores iniciales se duplicaron en este periodo, mientras que solamente se incrementaron en un 30% en los 30 días subsiguientes. En cuanto al NS-PTA, no mostró un aumento importante durante la maduración, lo que indica un bajo grado de avance de la proteólisis secundaria.

Tabla 1.4. Contenido de nitrógeno de las fracciones solubles a pH 4,6 (NS-pH 4,6), en ácido tricloroacético 12% (NS-TCA) y en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA), expresados como porcentaje del nitrógeno total (NT), de los quesos Cremoso miniatura luego de 3, 30 y 60 días de maduración.

<i>Tiempo de maduración (días)</i>	3	30	60
<i>Fracción de N</i>			
NS pH 4,6/NT (%)	5,52 ± 0,26	11,8 ± 1,15	15,13 ± 2,31
NS-TCA/NT (%)	2,31 ± 0,23	5,04 ± 1,00	6,72 ± 0,77
NS-PTA/NT (%)	0,90 ± 0,62	1,00 ± 0,21	1,03 ± 0,20

Se informa el promedio y la desviación estándar de 16 réplicas de quesos (4 quesos por día de elaboración).

La Figura 1.4 muestra los perfiles peptídicos de los quesos Cremoso miniatura en tres etapas de maduración: 3, 30 y 60 días. Los quesos de 3 días exhibieron cromatogramas simples, caracterizados por una escasa cantidad de picos pequeños, mientras que, con el avance de la maduración, se observó un incremento en el número y área de los picos. Los picos rotulados con caracteres de la “a” a la “l” fueron los que presentaron mayor variabilidad en cuanto al tiempo de maduración. La dispersión de las muestras de distintos días de elaboración fue menor.

Todos los índices de proteólisis estudiados fueron similares entre réplicas y días de fabricación, y resultaron comparables a los de los quesos Cremoso estándar. Los quesos miniatura tipo Cheddar, Saint Paulin y Caciotta también exhibieron patrones proteolíticos comparables a los de los quesos fabricados en forma convencional (Shakeel-Ur-Rheman y col., 1998a; Hynes y col., 2000; Di Cagno y col., 2006).

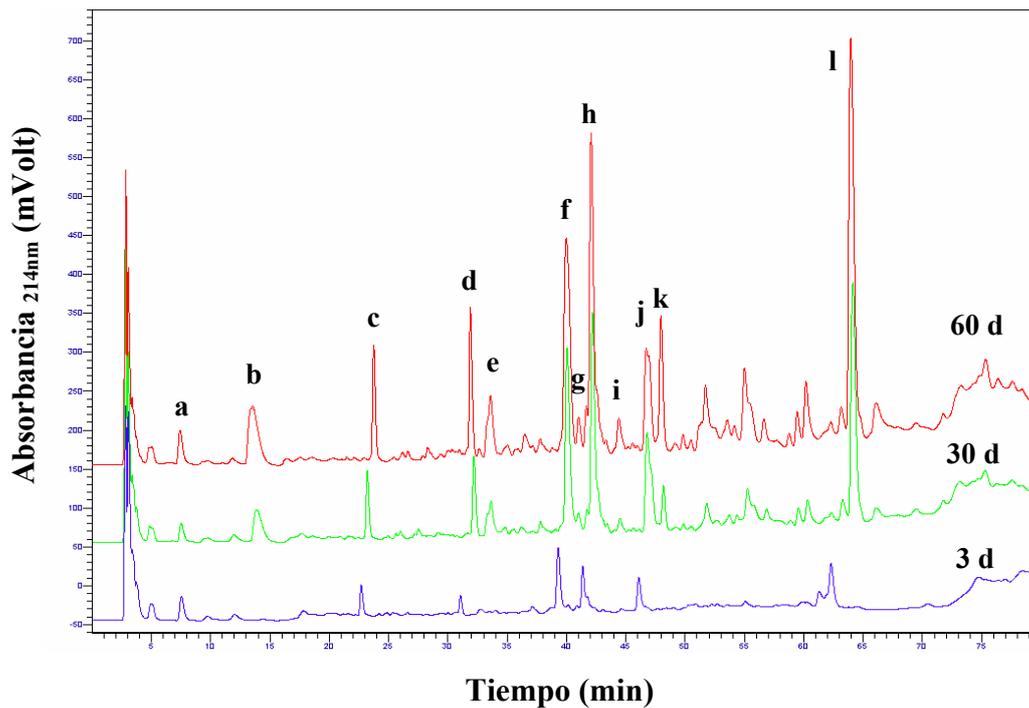


Figura 1.4. Perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC del extracto soluble en agua de un queso Cremoso miniatura luego de 3, 30 y 60 días de maduración. Los cromatogramas del resto de los quesos fueron similares.

3.1.5. Análisis sensorial

Se ha postulado que los quesos obtenidos bajo condiciones microbiológicas controladas no desarrollan un sabor completamente maduro como consecuencia de la reducción de la flora NSLAB (Crow y col., 2001). Sin embargo, en este estudio, los resultados del ensayo triangular simple no mostraron diferencias significativas en el aroma de los quesos Cremoso miniatura y estándar ($P \leq 0,05$). Shakeel-Ur-Rheman y col. (1998a) informaron que los quesos Cheddar convencionales recibieron puntajes más altos para el atributo *flavor* que los quesos miniatura luego de dos meses de maduración, pero que no hubo diferencias con relación al atributo cuerpo. Asimismo, reportaron que luego de cuatro meses los quesos miniatura recibieron mejores puntajes para *flavor* y cuerpo que los quesos convencionales.

3.2. Modelos representativos de queso duro

3.2.1. Pasta de queso Reggianito

La composición química de la pasta de queso Reggianito antes de la aplicación de los tratamientos térmicos fue la siguiente: pH: 5,03; sal en la humedad: 3,62 % (p/p), proteína

total: 17,69 % (p/p). Los valores consigna para el pH y la sal en la humedad eran 5,2-5,3 y 5%, respectivamente, como se indicó en la sección de materiales y métodos. En la Tabla 1.5 se presentan los valores medidos de pH, humedad, NaCl en la humedad y proteína total de las pastas de queso control luego del ajuste del pH y del % de NaCl, y de los diferentes tratamientos térmicos. La composición química no resultó afectada por los tratamientos térmicos dado que los valores de las distintas muestras fueron comparables. Los valores de composición global, sal y pH fueron similares a los informados por otros autores para sistemas representativos de queso Cheddar. En efecto, Farkye y col. (1995) prepararon un *slurry* de queso Cheddar que resultó con un 58% de humedad, 16,5% de materia grasa, 18% de proteínas, 3% de NaCl en la humedad, y un pH de 4,85 – 5,32, mientras que el modelo propuesto por Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999) mostró un 59% de humedad, 22% de materia grasa, 15,5% de proteínas, 4% de sal en la humedad, y pH comprendido entre 4,8 – 5,1.

Tabla 1.5. Composición química de las pastas de queso Reggianito luego de la aplicación de los tratamientos térmicos. C: control no sometido a tratamiento térmico, TL: pasta de queso tratada con vapor fluente a 85°C – 30 min, TM: pasta de queso tratada con vapor fluente a 95°C – 30 min, TA: pasta de queso esterilizada a 115°C – 30 min.

<i>Pasta</i>	<i>pH</i>	<i>Humedad (%)</i>	<i>NaCl en la humedad (%)</i>	<i>Proteína total (%)</i>
C	5,23 ± 0,02	61,23 ± 1,28	5,66 ± 0,12	17,69 ± 0,58
TL	5,25 ± 0,01	60,42 ± 2,67	5,30 ± 0,29	17,85 ± 0,33
TM	5,26 ± 0,01	59,14 ± 2,81	5,28 ± 0,27	17,75 ± 0,64
TA	5,25 ± 0,02	60,79 ± 2,95	5,27 ± 0,32	17,96 ± 0,51

Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de preparación de pastas de queso Reggianito.

Los perfiles peptídicos de la fracción soluble en agua de las pastas de queso Reggianito de 1 día de incubación se presentan en la Figura 1.5. Se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas en los cromatogramas de las muestras sometidas a diferentes tratamientos: tanto el número de picos en los perfiles como el área de los ya existentes aumentó con la intensidad del tratamiento térmico (picos señalados en la Figura 1.5 con letras). Estos resultados sugieren que el incremento de la temperatura condujo a un aumento en la hidrólisis de las proteínas, que puede deberse a una mayor susceptibilidad de las mismas a la acción de proteasas, o a una mayor lisis de las bacterias ácido lácticas (LAB) presentes conducente a su vez a la liberación

de enzimas intracelulares (Wilkinson y Kilcawley, 2005). Rynne y col. (2004) quienes estudiaron el efecto del incremento de la temperatura de pasteurización de la leche sobre las propiedades fisicoquímicas de quesos Cheddar reducidos en materia grasa, observaron un fenómeno similar. Los investigadores informaron que la degradación de la α_{s1} -caseína a α_{s1} -CN (f24-199) se incrementó con el aumento de la temperatura de pasteurización, durante las etapas tempranas de la maduración (≤ 120 días). Asimismo, en etapas más avanzadas (≥ 120 días), los autores observaron que a mayor temperatura de pasteurización, mayor era la velocidad de hidrólisis de la α_{s1} -CN (f24-199). En los trabajos de investigación previos dirigidos al diseño de *slurries* de queso, no se ha indagado el efecto del tratamiento térmico sobre los perfiles de proteólisis.

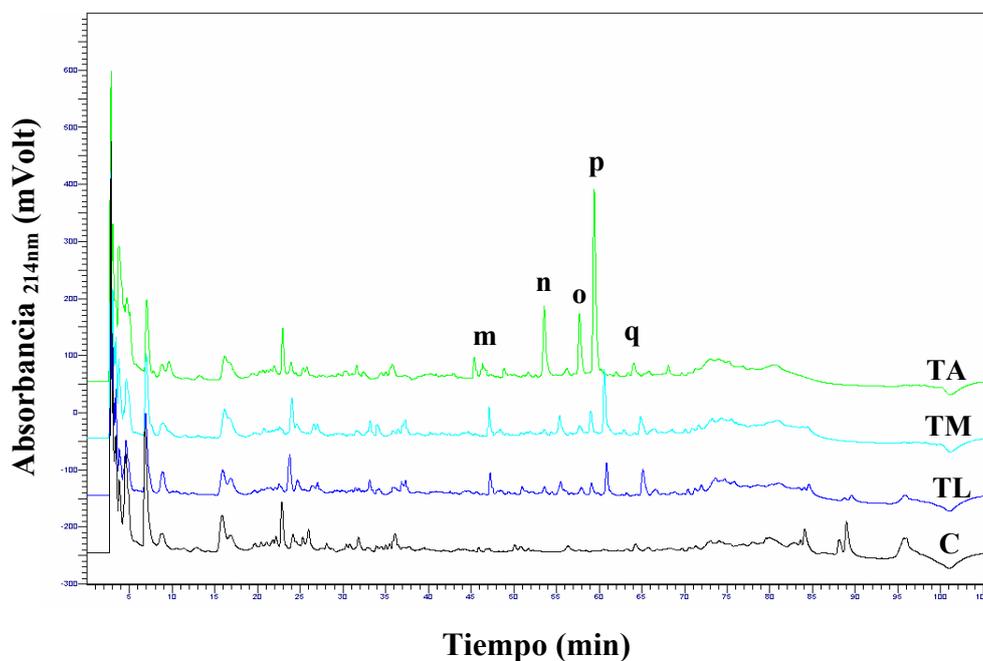


Figura 1.5. Perfiles peptídicos de la fracción soluble en agua de las pastas de queso Reggiano de 1 día de incubación. C: control no sometido a tratamiento térmico, TL: pasta de queso tratada con vapor fluente a 85°C – 30 min, TM: pasta de queso tratada con vapor fluente a 95°C – 30 min, TA: pasta de queso esterilizada a 115°C – 30 min. Los cromatogramas de las pastas del segundo ensayo fueron similares.

La Figura 1.6 muestra la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos totales en las pastas de queso Reggiano control y sometida a los diferentes tratamientos térmicos, durante la incubación a 34°C. Los recuentos iniciales en las pastas control, y tratadas a 85°C – 10 min (TL), 95°C – 10 min (TM) y 115°C – 30 min (TA) fueron de $4 \cdot 10^4$, $7 \cdot 10^3$, $4 \cdot 10^3$ y 2

10^2 UFC/g, respectivamente. Los recuentos en las pastas control, TL y TM se incrementaron en 2 órdenes log luego de 7 días y en 1 orden a los 14 días de incubación. Por el contrario, en la pasta de queso TA, los recuentos se incrementaron en un total de 2 órdenes log durante los 14 días de incubación. Por otra parte, si bien se observó una disminución en los recuentos de los microorganismos aerobios mesófilos totales con el incremento de la intensidad del tratamiento, ninguno de los procedimientos aplicados permitió obtener una pasta estéril. Este hecho podría deberse a un efecto protector de la materia grasa y de la matriz de caseína hacia los microorganismos.

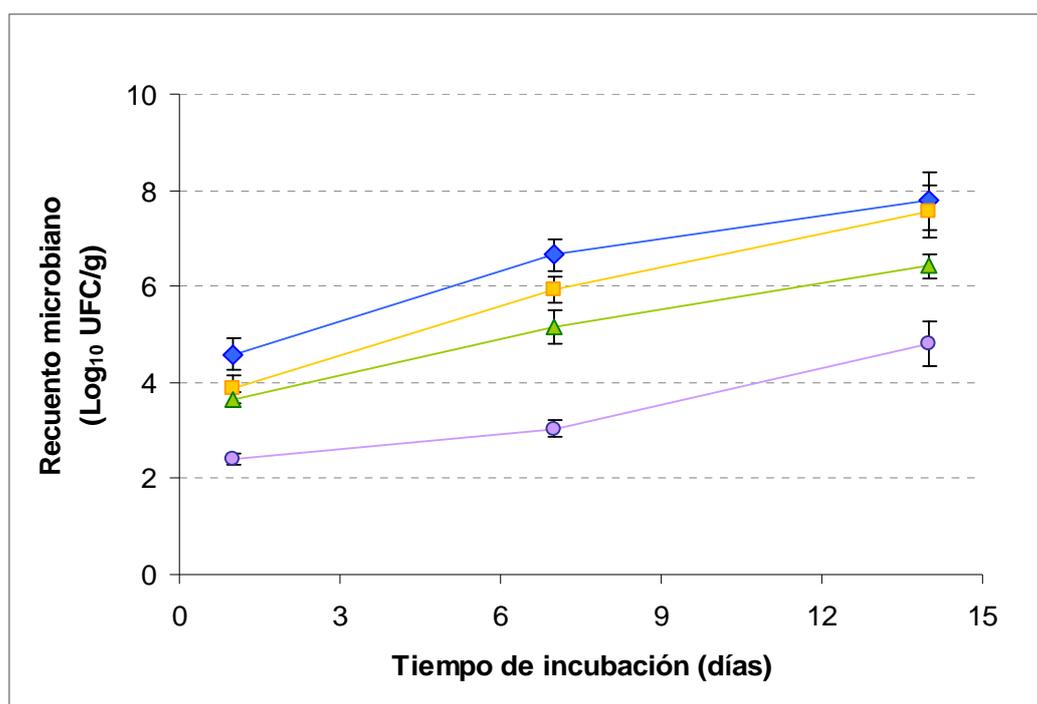


Figura 1.6. Evolución de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales en las pastas de queso Reggianito, luego de 1, 7 y 14 días de incubación a 34°C. C: control no sometido a tratamiento térmico (◆), TL: pasta de queso tratada con vapor fluente a 85°C – 30 min (■), TM: pasta de queso tratada con vapor fluente a 95°C – 30 min (▲), TA: pasta de queso esterilizada a 115°C – 30 min (●). Se informa el promedio y la desviación estándar de dos réplicas de preparación de las pastas de queso Reggianito.

En su estudio sobre queso Cheddar, Farkye y col. (1995) informaron que las NSLAB adventicias alcanzaron recuentos elevados (10^8 UFC/g) en el *slurry* preparado a partir de cuajada (obtenida sin mantener condiciones de asepsia), e incubado a 32°C durante 5 días. Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999), por el contrario, encontraron que los *slurries* de

queso permanecieron libres de NSLAB, coliformes, hongos y levaduras durante 12 días de incubación a 30°C, pero en este caso la pasta se obtuvo en condiciones microbiológicas controladas desde la preparación de la materia prima (cuajada) hasta su procesamiento final. Resultados similares fueron observados por Roberts y col. (1995) quienes desarrollaron un *slurry* de queso aséptico con un 73% de humedad y un 3% de sal en la humedad, el cual permaneció libre de bacterias contaminantes durante 15 días de incubación a 30°C.

La pasta de queso Reggianito desarrollada en el presente trabajo se descartó como modelo experimental para el estudio de LAB, dado que los microorganismos adventicios desarrollaron durante la incubación hasta alcanzar recuentos elevados. Es fundamental que los recuentos de microorganismos adventicios (NSLAB, coliformes, hongos y levaduras, etc.) permanezcan por debajo de 10^4 UFC/g en el modelo, a fin de evitar interferencias e interpretaciones erróneas de los resultados.

3.2.2. Extracto soluble de queso Reggianito

El único antecedente divulgado en literatura científica sobre un modelo de queso consistente en la fase acuosa de este alimento es el presentado por Crow y col. (2001). La información que los autores brindan sobre el sistema es muy breve: se trata de un extracto acuoso de queso Cheddar esterilizado por un tratamiento de ultra alta temperatura del tipo directo, es decir con inyección directa de vapor. Los autores han estudiado el crecimiento y actividad proteolítica de varias cepas de origen NSLAB en este sustrato, pero han restringido los datos sobre la obtención y caracterización del mismo, probablemente porque forman parte de un desarrollo protegido del Fronterra Research Group (Palmerston North, Nueva Zelanda). En el presente trabajo, se ha buscado obtener un sustrato comparable y mejorar algunos aspectos que, *a priori*, parecen alejar el sistema del alimento que busca modelar, como el tratamiento térmico intenso, reemplazándolo por la esterilización por filtración.

La composición química del extracto soluble de queso Reggianito se presenta en la Tabla 1.6. El pH estuvo dentro del rango deseado por lo que no fue necesario ajustar su valor. El contenido de NaCl se ajustó a 5% (p/v) mediante el agregado de cloruro de sodio.

Tabla 1.6. Composición química de los extractos solubles de queso Reggianito.

	Extracto soluble
pH	5,20 ± 0,05
NaCl (%)	2,17 ± 0,11
Proteína total (%)	7,07 ± 0,16

Se informa el promedio y la desviación estándar de tres réplicas de preparación de los extractos solubles de queso Reggianito.

El pH del extracto soluble de queso Reggianito permaneció aproximadamente constante, y no se detectó desarrollo de microorganismos aerobios mesófilos totales durante 21 días de incubación a 34°C (Tabla 1.7).

Tabla 1.7. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y pH de los extractos solubles de queso Reggianito durante la incubación a 34°C.

Tiempo de incubación (días)	1	3	7	14	21
pH	5,18 ± 0,04	5,15 ± 0,02	5,15 ± 0,01	5,16 ± 0,01	5,17 ± 0,02
Recuento mesófilos totales (UFC/ml)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Se informa el promedio y la desviación estándar de tres réplicas de preparación de los extractos solubles de queso Reggianito.

Los perfiles peptídicos de un extracto soluble de queso Reggianito antes de la incubación (tiempo 0) y luego de 3, 7, 14 y 21 días se presenta en la Figura 1.7A. Se observó un incremento en el área de la mayor parte de los picos con el tiempo de incubación, probablemente debido a una hidrólisis enzimática de las proteínas y péptidos presentes, causada por la actividad de proteasas y peptidasas existentes en el sistema, tanto de origen no microbiano (quimosina y plasmina) como provenientes de las bacterias.

Para confirmar esta hipótesis, y descartar que los cambios en el perfil tuvieran un origen químico, se repitió la experiencia de incubación a 34°C del mismo extracto soluble de queso, pero luego de efectuar un tratamiento térmico del extracto ya filtrado. Este tratamiento se llevó a cabo en un baño de agua a 70°C durante 30 min, y tuvo el objetivo de inactivar la

mayor parte de las enzimas presentes (Wilkinson y Kilcawley, 2005). La Figura 1.7B muestra los perfiles peptídicos del extracto soluble de queso Reggiano sometido a tratamiento térmico previo a la incubación y luego de 0, 3, 7, 14 y 21 días. No se detectaron variaciones en el área de los picos con el tiempo de incubación, excepto para aquellos que eluyeron en el intervalo de tiempo de retención comprendido entre 65 y 77 min (señalados en el recuadro de la Figura 1.7B). El incremento en el área de este conjunto de picos, presentes en la región hidrofóbica de los cromatogramas, probablemente sea consecuencia de la acción hidrolítica de la plasmina sobre las proteínas y péptidos. Kelly y O'Donnell (1998) y Upadhyay y col. (2004) compararon los perfiles peptídicos de quesos Cheddar con actividad de plasmina modificada y reportaron que los péptidos que eluyen en la región hidrofóbica de los cromatogramas corresponden a los componentes de la fracción proteosa peptona, que en su mayoría constituyen productos de degradación de la β -caseína por acción de la plasmina. Se ha demostrado que la plasmina es una enzima muy estable al calor dado que su actividad en la leche resulta poco afectada por los tratamientos de pasteurización y de ultra alta temperatura (por ejemplo, 140°C por 4 s) (Bastian y Brown, 1996). También en los quesos que requieren de una etapa de cocción a elevadas temperaturas, tales como los quesos suizos o Reggiano, la plasmina permanece activa y es la principal responsable de la proteólisis primaria durante la maduración (Visser, 1993; Zalazar y col., 1999). Metwalli y col. (1998) estudiaron la resistencia al calor de la plasmina en presencia o en ausencia de las proteínas de la leche. Los investigadores observaron que en ausencia de caseínas, el calentamiento a temperaturas superiores a los 65°C condujo a una inactivación extensa de dicha enzima, mientras que en presencia de caseínas su actividad permaneció prácticamente inalterada luego del tratamiento a 77°C. En el modelo de extracto soluble de queso Reggiano desarrollado en el presente trabajo, la concentración de caseínas es muy baja, y por lo tanto es probable que el tratamiento térmico aplicado haya reducido la actividad de la plasmina, aunque no lo suficiente para lograr su completa inactivación.

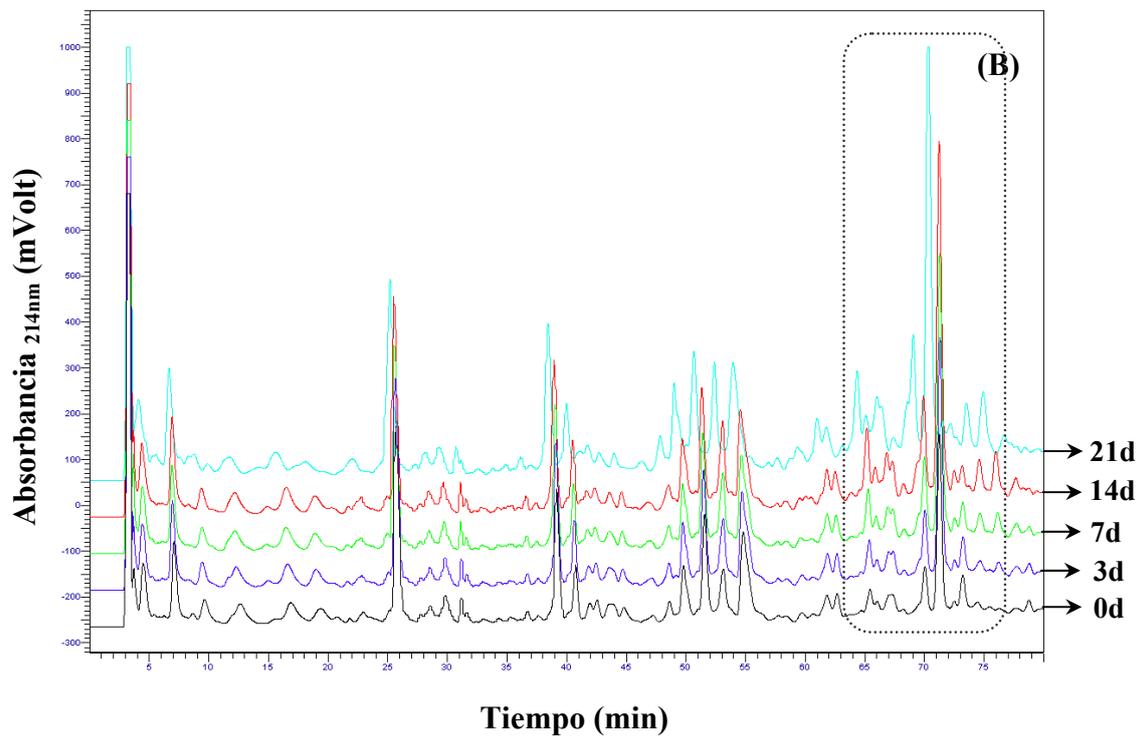
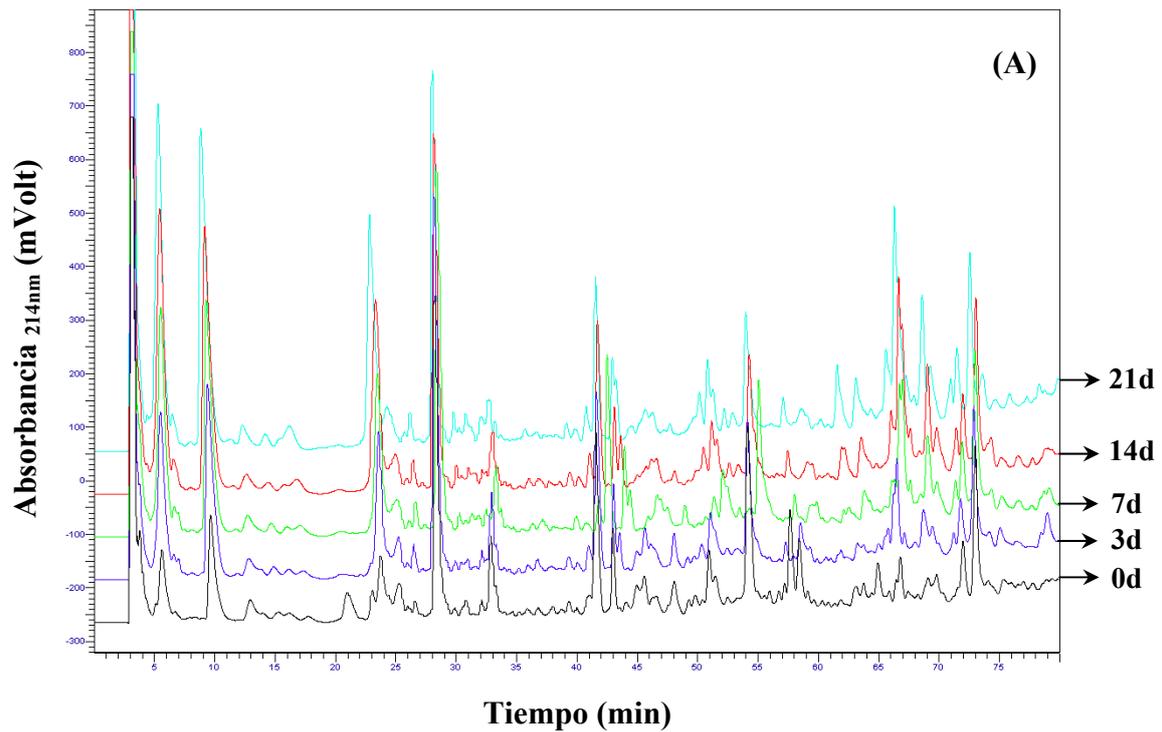


Figura 1.7. Perfiles peptídicos del extracto soluble de queso Reggiano luego de 0, 3, 7, 14 y 21 días de incubación a 34°C. **A)** Extracto soluble esterilizado por filtración no sometido a tratamiento térmico. **B)** Extracto soluble esterilizado por filtración y tratado a 70°C durante 30 min. Los cromatogramas de las réplicas de estos extractos fueron similares.

El extracto soluble de queso Reggianito desarrollado para la presente tesis demostró ser un modelo experimental adecuado para el estudio de los agentes que intervienen en la maduración del queso, ya que presentó una composición química similar a la fase acuosa del alimento que representa y logró esterilizarse de manera eficaz, sin recurrir a tratamientos térmicos intensos. Esta característica del sustrato es una de sus fortalezas como modelo alimentario por varios motivos: **i)** las proteínas de suero y péptidos de mayor tamaño no precipitan y/o sufren transformaciones debidas al tratamiento térmico intenso, lo que a su vez luego puede favorecer los ataques enzimáticos debido a una mayor disponibilidad de la cadena peptídica al ataque de los agentes proteolíticos y peptidolíticos, **ii)** no se producen cambios en el equilibrio salino, especialmente la precipitación de fosfato de calcio, usual durante los calentamientos intensos, y que afecta tanto la solubilidad de las proteínas como el pH, **iii)** las enzimas provenientes de la leche, el coagulante y las LAB del fermento se encuentran activas, al igual que en el alimento original.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se desarrollaron dos sistemas modelo, representativos de quesos de pasta blanda y de pasta dura, que probaron ser adecuados para su aplicación a una gran variedad de estudios bioquímicos sobre la maduración de quesos.

En ambos sistemas, se obtuvieron matrices alimentarias de composición reproducible y conocida, y se logró controlar el crecimiento de microorganismos adventicios durante tiempos prolongados. La proteólisis que tuvo lugar durante la incubación o maduración de los modelos se caracterizó exhaustivamente.

En esta tesis, se utilizaron los dos sistemas diseñados para el estudio de cepas seleccionadas de lactobacilos no fermento, lo que se describe en los capítulos subsiguientes.

Capítulo 2

“Efecto de cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos sobre la composición química y las propiedades sensoriales de quesos de pasta blanda”

1. Introducción

Las bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB) son microorganismos adventicios que desarrollan espontáneamente en todas las variedades de quesos, ya sea en aquellos obtenidos en ambientes industriales, con leche pasteurizada y cumpliendo estrictas normas de seguridad y calidad, como en los productos artesanales preparados con leche cruda. La existencia de estos microorganismos en el queso es conocida desde larga data, sin embargo, el estudio del impacto de las NSLAB en la calidad del mismo constituye un área activa de investigación, cuya importancia ha generado un creciente interés en el sector quesero (Banks y Williams, 2004). En los quesos obtenidos industrialmente, las NSLAB constituyen el único factor importante que aún no ha sido controlado. Algunos autores las señalan como la causa principal de defectos en el queso (Khalid y Marth, 1990b; Galgano y col., 2001; Crow y col., 2002; Herreros y col., 2007), mientras que otros consideran que tienen una importancia menor (Kleter, 1977; Lloyd y col., 1980), o incluso que pueden favorecer la formación del *flavor* (McSweeney y col., 1994; Hynes y col., 2003a; Poveda y col., 2003; Di Cagno y col., 2006; Irigoyen y col., 2007). Pese al disenso sobre el papel de esta flora en la calidad de quesos, los especialistas acuerdan en que no existen estrategias económicamente viables para mantener a los quesos libres de NSLAB: la flora láctica adventicia proviene de la leche cruda y de la planta láctea, y se desarrolla durante la maduración, especialmente después de que el fermento primario comienza a declinar, y que los lactobacilos se recuperan del estrés térmico ocasionado por la pasteurización. Las NSLAB alcanzan recuentos superiores a 10^6 UFC/g y pueden convertirse en la microflora láctica dominante en el queso (Crow y col., 2001).

En este contexto, la estrategia que se ha delineado para superar los posibles defectos asociados al crecimiento de una flora láctica adventicia, es el agregado de fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos. Para el desarrollo de estos cultivos, se aíslan lactobacilos de quesos de buena calidad, que presenten características sensoriales favorables y ningún defecto, y se estudian mediante ensayos *in vitro* e *in situ* para determinar sus características tecnológicas (Beresford, 2003). Se buscan cepas que contribuyan de manera directa al aroma y sabor del queso, mediante el incremento de la proteólisis secundaria, el catabolismo de los hidratos de carbono y de los aminoácidos libres, y, en menor medida, la expresión de sus actividades esterasas. Sin embargo, aún aquellos adjuntos que no intensifiquen el *flavor* del queso pueden ejercer una influencia indirecta positiva en la calidad, al dificultar el desarrollo de

microorganismos adventicios, potencialmente perjudiciales, lo que contribuye a la inocuidad y calidad del alimento (El Soda y col., 2000).

Los fermentos adjuntos, para ser adecuados, no deben contribuir a la acidificación durante la elaboración del queso, deben crecer rápidamente en la cuajada, alcanzar altas densidades al comienzo de la maduración y mantener altos recuentos ($\sim 10^7 - 10^8$ UFC g⁻¹) durante largos periodos. Asimismo, deben producir un balance de efectos deseables y ningún defecto en el producto final (Crow y col., 2002).

Hasta la fecha, la mayor parte de los trabajos dedicados al estudio de la contribución de cepas seleccionadas de lactobacilos a la calidad del queso, se han realizado en variedades como Cheddar (McSweeney y col., 1994), Danbo (Antonsson y col., 2003), Manchego (Poveda y col., 2003) y Armada (Herreros y col., 2007), entre otros, en cuyos procesos de elaboración se utilizan fermentos primarios mesófilos. Por el contrario, existe escasa información acerca del impacto de lactobacilos adjuntos sobre la maduración de quesos en combinación con fermentos primarios termófilos.

En el presente trabajo se investigó la contribución de dos cepas de lactobacilos mesófilos aisladas de queso (*Lactobacillus plantarum* I91 y *Lb. casei* I90), a la composición química y calidad sensorial de quesos blandos. Para tal fin, los adjuntos seleccionados fueron ensayados como fermentos adjuntos en el modelo de queso Cremoso miniatura desarrollado en la presente tesis. Además, se evaluó la supervivencia de dichas cepas en las condiciones medioambientales que prevalecen en el producto, y su interacción con el fermento primario termófilo empleado en la elaboración.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cultivos adjuntos de lactobacilos

Las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 seleccionadas para el estudio fueron aisladas en nuestro instituto (INLAIN, CONICET, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) a partir de queso Tybo de dos meses de maduración y de buena calidad. Las cepas fueron previamente identificadas y caracterizadas mediante ensayos *in vitro*. Se evaluaron sus propiedades tecnológicas, su resistencia a las barreras biológicas y sus características probióticas, y los cultivos mostraron potencial para su uso como cultivos adjuntos en elaboraciones de quesos (Bude-Ugarte y col., 2006). El cultivo stock correspondiente a cada cepa, se almacenó en freezer a -80°C en caldo

MRS (Britania, Buenos Aires, Argentina) suplementado con glicerol al 15% (v/v). Previo a su empleo, las cepas se cultivaron en dos oportunidades en caldo MRS a 34°C durante toda la noche (~ 16 h). Una alícuota del cultivo *overnight*, suficiente para lograr una concentración de bacterias de 10⁶ UFC/ml en la leche de elaboración, se centrifugó a 8000 g durante 20 min a 4°C. El pellet se lavó por duplicado con buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7), y luego se resuspendió en leche descremada al 10% (p/v) estéril (115°C – 30 min) previo a su inoculación en la leche.

2.2. Elaboraciones de queso

Se realizaron dos experiencias de elaboraciones de quesos; una de ellas para estudiar el impacto de *Lb. plantarum* I91 (experiencia 1), y la otra para evaluar la contribución de la cepa *Lb. casei* I90 (experiencia 2). Cada experiencia consistió en cuatro elaboraciones de queso Cremoso miniatura realizadas en distintos días, con leche diferente, y bajo condiciones microbiológicas controladas, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.1.2 del capítulo 1. La leche cruda utilizada en las elaboraciones se obtuvo de una planta láctea cercana (Milkaut S.A., Franck, Santa Fe, Argentina) y se pasteurizó a 65°C durante 30 min. En ambas experiencias, cuatro quesos Cremoso miniatura fueron preparados cada día de elaboración a partir de 2000 ml de leche: dos quesos controles (rotulados C1 en la experiencia 1 y C2 en la experiencia 2) conteniendo solo fermento primario de *Streptococcus thermophilus*, y dos quesos experimentales con la adición de fermento primario y de *Lb. plantarum* I91 (E1) o *Lb. casei* I90 (E2) como cultivos adjuntos. Los quesos se envasaron al vacío y se maduraron a una temperatura de 5°C durante 60 días. En la etapa de moldeo durante la elaboración (tiempo 0), y luego de 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración se extrajo una muestra de cada tipo de queso para llevar a cabo los análisis químicos y microbiológicos. La toma de muestra se efectuó en condiciones de asepsia como se detalló en el capítulo 1 (sección 2.1.4).

2.3. Análisis de los quesos

La composición química global y el pH se determinaron por duplicado en muestras de queso de 3 días de maduración. Los recuentos del fermento primario y de lactobacilos adventicios y adjuntos en quesos controles y experimentales, respectivamente, se llevaron a cabo por duplicado al finalizar la elaboración (tiempo 0) y luego de 3, 15, 30, 45 y 60 días de

maduración. Estos análisis se efectuaron de acuerdo a las metodologías descritas en el capítulo 1.

La proteólisis se estudió luego de 3, 30 y 60 días de maduración mediante fraccionamiento nitrogenado, electroforesis urea-PAGE y RP-HPLC de los perfiles peptídicos, utilizando las metodologías y los equipamientos mencionados en el capítulo 1. Asimismo, en muestras de queso de 3 y 60 días de maduración se determinó el contenido total de aminoácidos libres (AAL) y se obtuvieron los perfiles de AAL individuales, mediante RP-HPLC utilizando el método AccQ.Tag® (Waters Corporation, Milford MA, Estados Unidos).

La muestra empleada para la determinación de AAL consistió en el mismo extracto de queso soluble en agua utilizado para el estudio de los perfiles peptídicos. A 980 µl de esta fracción, se le adicionaron 20 µl de una solución estándar interna (ácido α -aminobutírico 2,5 mM/L en HCl 0,1 M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), y la mezcla resultante se homogeneizó y se filtró a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Millex, Millipore, San Pablo, Brasil). La reacción de derivatización se llevó a cabo de acuerdo a la metodología especificada en el protocolo del método. En un tubo de reacción se agregaron 20 µl de la solución de la muestra diluida, 60 µl de buffer borato (pH 8,8) y, por último, 20 µl de reactivo de derivatización (6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinilcarbamato 10 mM). El tubo de reacción se tapó con film de parafina, se agitó, y luego de 1 min a temperatura ambiente, se colocó en un baño de agua a 55°C durante 10 min. Finalmente, 20 µl de la muestra derivatizada fueron inyectados en el cromatógrafo.

El equipamiento utilizado fue el mismo que para el análisis de los perfiles peptídicos (sección 2.1.5 del capítulo 1). Se utilizó una columna analítica Nova-Pak™ C18 (150 x 3,9 mm, 4 µm tamaño de partícula; Waters Corporation, Milford MA, Estados Unidos) y un guarda columna C18 (15 x 3,2 mm, 7 µm tamaño de partícula; Perkin Elmer, Norwalk, CT, Estados Unidos). Los datos se recolectaron a través de una interfase conectada a una computadora utilizando el programa Turbochrom® (Perkin Elmer, Norwalk, CT, Estados Unidos). La detección UV se realizó a una longitud de onda de 248 nm, y la separación cromatográfica se llevó a cabo a una temperatura de columna de 37°C y a una velocidad de flujo de 1 ml/min, utilizando dos fases móviles. La fase móvil A_{AAL} se preparó por dilución (2:20, v/v) de una solución suministrada en el kit AccQ.Tag (acetato de sodio trihidrato 19%, ácido fosfórico 6-7%, trietilamina 1-2%, agua 72-73%) con agua bidestilada. El valor de pH de la fase móvil A_{AAL} debe ser $5,02 \pm 0,05$. La fase móvil B_{AAL} se compuso de acetonitrilo – agua bidestilada 60:40 (v/v). La separación cromatográfica se llevó a cabo empleando un gradiente lineal creciente de acetonitrilo en agua, obtenido mediante la mezcla de las dos fases

móviles, según el manual del método AccQ·Tag®, con algunas modificaciones (Bergamini, 2007). El tiempo total fue de 50 min (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Gradiente empleado en la separación cromatográfica de los aminoácidos derivatizados.

Tiempo total (min)	%A _{AAL}	%B _{AAL}
0	100	0
0,5	98	2
15	93	7
19	87	13
32	66	32
33	66	32
34	0	100
37	0	100
38	100	0
50	100	0

Fase móvil A_{AAL}: solución concentrada AccQ·Tag® - agua bidestilada (2:20, v/v), y Fase móvil B_{AAL}: acetonitrilo - agua bidestilada (60:40, v/v); todos los gradientes generados fueron rampas lineales.

La contribución de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 al desarrollo de aroma de quesos blandos se evaluó mediante el método del ensayo triangular simple, detallado en el capítulo 1 (sección 2.1.5). El estudio se llevó a cabo al finalizar el periodo de maduración (60 días) por comparación del aroma de los quesos elaborados con y sin lactobacilos adjuntos. Al igual que en estudios anteriores, el panel se compuso por doce miembros entrenados. Los jurados en este caso, además de indicar la muestra diferente, emitieron opinión respecto a las características sensoriales peculiares de cada muestra.

2.4. Análisis estadístico

Los datos de composición química, recuentos microbiológicos, fraccionamiento nitrogenado y contenido de AAL totales e individuales, de los quesos elaborados con y sin fermento adjunto de lactobacilos, se analizaron mediante ANOVA de una vía utilizando el

programa estadístico SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). El nivel de significancia se fijó en $P \leq 0,05$.

El análisis de los perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC es complejo debido a la gran cantidad de datos que entran en juego. Por esta razón, para abordar este estudio, además del tradicional examen visual de los cromatogramas, se requiere de la aplicación de otros métodos que permitan la reducción de la dimensionalidad de los datos, lo que facilita la comparación de las muestras y la interpretación de los resultados. El análisis estadístico multivariante ha demostrado ser una metodología de gran potencial para lograr una mejor comprensión del proceso proteolítico, como así también, de los factores que intervienen en el mismo (Pripp y col., 2000b).

La metodología elegida para el análisis de los perfiles peptídicos fue el análisis por componentes principales (ACP), que es una técnica tendiente a detectar relaciones entre muestras y variables. El principal objetivo del ACP es la reducción de la dimensionalidad de un conjunto de p variables a un conjunto m de menor número de variables para mejorar la interpretación de los datos, sin pérdida significativa de información. Esto se logra mediante la transformación de un conjunto de variables originales, X_1, X_2, \dots, X_p observadas para las muestras, en un nuevo conjunto de variables, CP_1, CP_2, \dots, CP_p , denominadas componentes principales (CPs). Para aplicar el ACP, las variables originales deben estar correlacionadas entre sí, mientras que las nuevas variables deben ser ortogonales (Coker y col., 2005). Algebraicamente, los CPs son combinaciones lineales de las variables originales que explican el máximo de la inercia o variabilidad total, y pueden representarse mediante la siguiente expresión:

$$CP_i = a_{i1} X_1 + a_{i2} X_2 + \dots + a_{ip} X_p$$

donde CP_i representa cada componente principal y los coeficientes a_{ij} , denominados *loadings* o carga factorial, expresan la contribución de cada variable original (X_1, X_2, \dots, X_p) al componente principal.

Geoméricamente, esas combinaciones lineales representan la selección de un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos, en el cual, el primer eje o componente principal está orientado en la dirección de mayor variabilidad de los datos, el segundo eje en la dirección de segunda mayor dispersión, y así sucesivamente. Esto significa que los componentes principales son obtenidos en orden decreciente de su contribución a la variancia total. Existen varios criterios para la selección del número adecuado de componentes principales a retener para el análisis; el más utilizado consiste en seleccionar

aquellos primeros componentes principales que expliquen al menos el 80 o 90% de la variancia total de los datos (Massart y col., 1988a). Por lo general, los dos o tres primeros componentes principales explican la mayor parte de la variabilidad de los datos, y en consecuencia son suficientes para la interpretación de los resultados sin pérdida significativa de información. Esto hace posible la representación gráfica de un conjunto de datos p -dimensional en dos o tres dimensiones, lo que simplifica notablemente el análisis de los resultados. Los nuevos ejes vienen dados por las direcciones de los coeficientes a_1, a_2, \dots, a_{ij} (Massart y col., 1988a).

Los perfiles proteolíticos pueden ser transformados en un conjunto de datos multivariantes mediante el uso de la altura o el área de los picos como variables, y cada cromatograma (muestra) como un objeto (Piraino y col., 2004).

Existen dos formas básicas de aplicar el ACP: utilizando la **matriz de covariancia** o la **matriz de correlación**. La primera se utiliza cuando las variables tienen las mismas unidades de medida y presentan valores medios similares. En este método, las variables son centradas alrededor de la media, pero conservan su variancia original (Massart y col., 1988a). Se utiliza cuando es importante mantener la relatividad de las variancias de las muestras, y permite obtener una huella digital del proceso proteolítico en el queso (Coker y col., 2005). El segundo procedimiento es indicado cuando las variables son heterogéneas en cuanto a las magnitudes que representan, y por ende, a las unidades en que están expresadas (Borgognone y col., 2001). En este caso las variables son estandarizadas a media cero y variancia uno (Massart y col., 1988a). Coker y col. (2005) reportaron que el empleo de la matriz de correlación en el ACP es particularmente útil para enfatizar diferencias menores en los perfiles peptídicos de los quesos, dado que da igual peso a la variancia entre las muestras de todos los picos.

Se debe tener presente que variables de gran variancia respecto a las otras tendrán un peso decisivo en la determinación de las componentes principales. Si no se desea que ello ocurra, es necesario trabajar con variables estandarizadas a fin de resaltar la importancia de las de menor variancia y atenuar la influencia de las más dispersas (Borgognone y col., 2001).

En el presente trabajo, las variables independientes fueron los picos de los cromatogramas. Se seleccionaron aquellos que mostraron mayor variación, de acuerdo al tipo de queso (elaborado con o sin lactobacilos adjuntos) y al tiempo de maduración, mediante la comparación visual de los perfiles peptídicos de las distintas muestras (Pripp y col., 2000b). En cada caso, se utilizó el área expresada en unidades arbitrarias. Asimismo, se verificó la presencia de altas correlaciones entre las variables seleccionadas (Hair y col., 1999a). Por otra

parte, para la aplicación del ACP se utilizó la matriz de covariancia dado que todas las variables presentaban las mismas unidades, y se pretendía que mantengan su variancia original de manera de obtener una mejor descripción de la proteólisis. Según Pripp y col. (1999), el empleo de la matriz de covariancia en el ACP da una mejor expresión de las diferencias entre los cromatogramas de las muestras de queso que la matriz de correlación.

Luego de la aplicación del ACP, los datos cromatográficos se analizaron mediante análisis de cluster (AC) no jerárquico (*K*-means), a fin de detectar posibles agrupamientos entre las muestras; los elementos pertenecientes a un mismo grupo son similares entre sí. El número de clusters para el análisis *K*-means se determinó en un ensayo preliminar del conjunto de datos originales, mediante la aplicación de AC jerárquico (Hair y col., 1999b).

Todos los análisis estadísticos multivariantes se realizaron con el programa SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos).

Los resultados del ensayo triangular simple se interpretaron mediante el análisis estadístico descrito en el capítulo 1.

3. Resultados y Discusión

3.1. Composición global y pH de los quesos

Los datos de composición global y pH de los quesos Cremoso miniatura elaborados con y sin fermentos adjuntos de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 se muestran en la Tabla 2.2. Los quesos controles y experimentales de ambas experiencias no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el pH, humedad, materia grasa y proteínas totales. A su vez, los valores de dichos parámetros fueron similares a los reportados por Milesi y col. (2007) para queso Cremoso miniatura, y estuvieron dentro del rango normal establecido para queso Cremoso comercial.

En la Figura 2.1 se muestra la evolución del pH de los quesos durante el proceso de elaboración. En ambas experiencias, tanto la velocidad de acidificación durante la incubación a 45°C, como el pH alcanzado al finalizar la elaboración, fueron similares en todos los quesos, ya sea elaborados con o sin fermentos adjuntos de lactobacilos.

Tabla 2.2. Composición global y pH de los quesos Cremoso miniatura de 3 días de maduración, elaborados bajo condiciones microbiológicas controladas. C1 y C2: quesos controles correspondientes a las experiencias 1 y 2, respectivamente. E1 y E2: quesos experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, respectivamente.

	C1	E1	C2	E2
pH	5,17 ± 0,05	5,21 ± 0,07	5,29 ± 0,02	5,25 ± 0,02
Humedad (%)	50,54 ± 2,56	51,75 ± 2,25	52,09 ± 1,48	51,37 ± 1,67
Materia grasa (%)	23,60 ± 1,12	24,09 ± 1,33	24,89 ± 0,69	25,67 ± 1,48
Proteínas totales (%)	19,39 ± 0,97	19,23 ± 0,69	19,76 ± 1,10	20,13 ± 1,03

Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos de elaboración de queso.

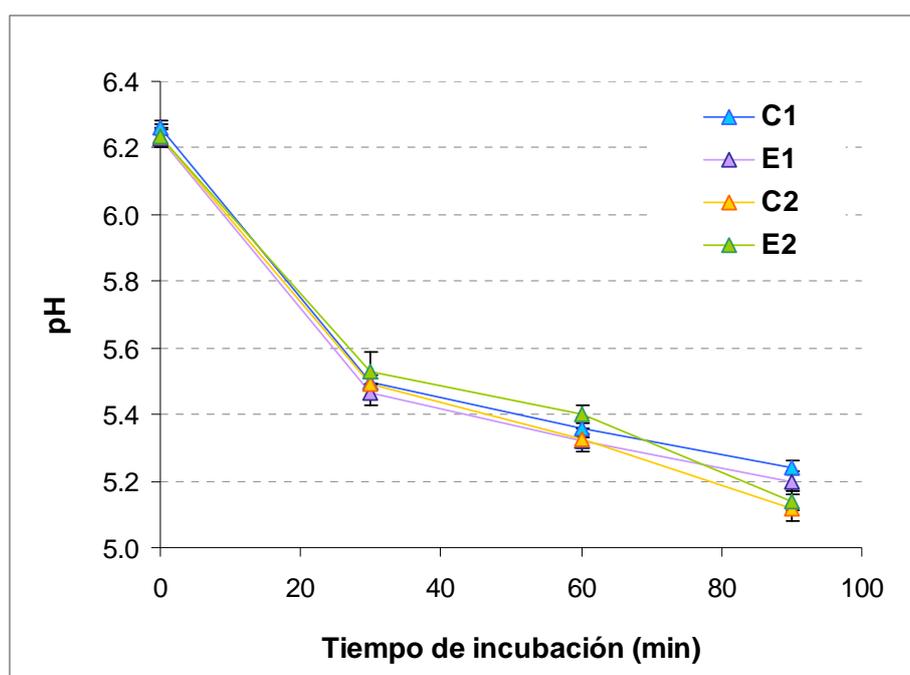


Figura 2.1. Curva de acidificación de los quesos Cremoso miniatura durante la etapa de elaboración. C1 y C2: quesos controles correspondientes a las experiencias 1 y 2, respectivamente. E1 y E2: quesos experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, respectivamente. Se informa el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos de elaboración de queso.

Al seleccionar cepas de lactobacilos para su uso como cultivos adjuntos en elaboraciones de quesos, es de suma importancia que las mismas no introduzcan modificaciones en la

composición química del producto, a fin de garantizar un medio ambiente reproducible, donde las diferencias detectadas entre quesos controles y experimentales sean atribuibles a la actividad bioquímica de los lactobacilos adicionados, y no a factores no controlados de la experiencia. Asimismo, es requisito fundamental que los fermentos adjuntos no contribuyan a la producción de ácido láctico durante la elaboración de los quesos o su maduración, dado que esta característica puede inducir defectos de textura (“arricotado”) y de aroma y sabor.

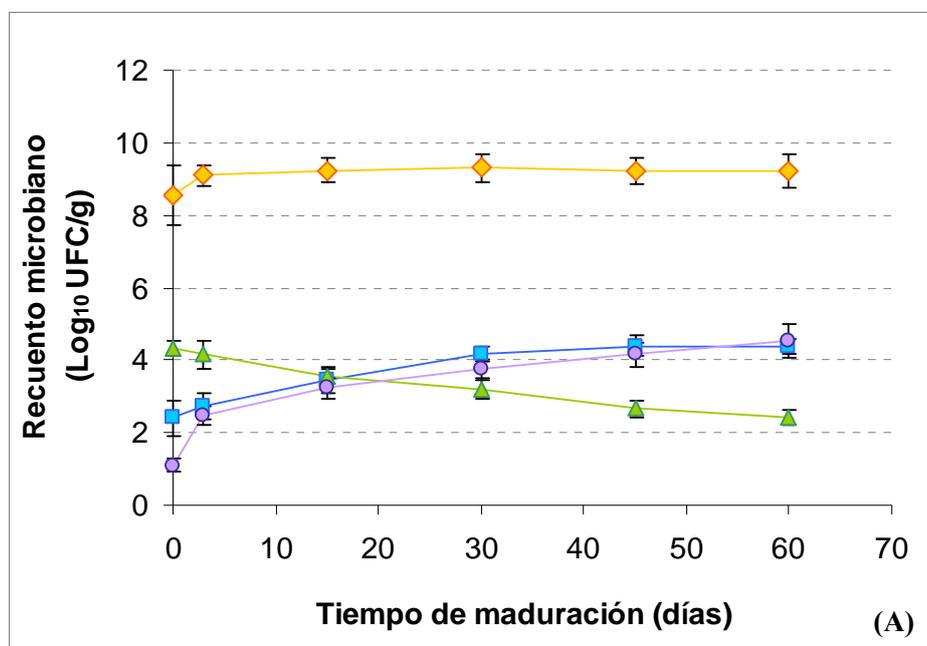
La adición de las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 ensayadas en el presente trabajo, no modificó los valores de pH de los quesos durante la etapa de elaboración, ni introdujo cambios en la composición global de los mismos. Un comportamiento similar fue observado para otras cepas pertenecientes a las especies *Lb. casei* (Broome y col., 1990; Muehlenkamp-Ulate y Warthesen, 1999) y *Lb. plantarum* (Lynch y col., 1999; Poveda y col., 2003); su adición como adjuntos en alta concentración ($> 10^6$ UFC/ml leche) no interfirió con la actividad acidificante del fermento primario, ni modificó la composición química de los productos. Sin embargo, en otros trabajos se evidenció un incremento en la producción de ácido durante la elaboración y/o maduración, asociado a la actividad acidificante de cepas de *Lb. casei* (Lee y col., 1990; Madkor y col., 2000; Menéndez y col., 2000) y *Lb. plantarum* (Lee y col., 1990; Gomez y col., 1996; Menéndez y col., 2000; Herreros y col., 2007) utilizadas como adjuntos. En algunos casos, la sobreacidificación de la cuajada resultó en una modificación de la composición química de los quesos, tales como disminución en el contenido de humedad, y ocasionó defectos de textura y de aroma y sabor, que redundaron en un deterioro sustancial de la calidad sensorial del alimento (Lee y col., 1990; Menéndez y col., 2000; Herreros y col., 2007).

Por otra parte, en ambas experiencias, no se detectaron diferencias significativas en la composición global y pH de los quesos elaborados el mismo día (utilizando la misma leche) o en días diferentes (con leche diferente), lo que es coincidente con lo observado por Milesi y col. (2007) para quesos Cremoso miniatura. Estos resultados confirman la reproducibilidad y fiabilidad del modelo de queso propuesto, y sustentan la utilidad de los sistemas experimentales que simulan el alimento real, como una alternativa eficaz para el estudio de los eventos bioquímicos que tienen lugar durante la maduración del queso.

3.2. Recuentos microbiológicos

La Figura 2.2 muestra la evolución de las poblaciones de la flora láctica y de la flora microbiana adventicia en los quesos controles (A) y experimentales (B) correspondientes a la

experiencia 1, al comienzo de la maduración (día 0) y luego de 3, 15, 30, 45 y 60 días. En los quesos elaborados con o sin fermento adjunto de *Lb. plantarum* I91, el fermento primario alcanzó recuentos de 10^9 UFC/g al finalizar la etapa de elaboración, y luego se mantuvo constante durante todo el periodo de maduración. *Lb. plantarum* I91 se adicionó a la leche de elaboración en una concentración de 10^6 UFC/ml, y luego, durante la elaboración, creció rápidamente en la cuajada alcanzando recuentos de 10^7 UFC/g en los quesos experimentales de 0 días. A los 3 días, el recuento de lactobacilos adjuntos se incrementó en 1 orden log (10^8 UFC/g), y luego permaneció constante hacia el final de la maduración (Figura 2.2B). Por otra parte, en los quesos controles, la población de lactobacilos adventicios permaneció en niveles inferiores a 10^4 UFC/g durante los 60 días (Figura 2.2A). El recuento de coliformes al comienzo de la maduración fue de 10^4 y 10^3 UFC/g en quesos controles y experimentales, respectivamente, pero luego disminuyó 2 ciclos log en ambos quesos, hacia el final del periodo de maduración. Por el contrario, el recuento inicial de hongos y levaduras en ambos tipos de quesos fue prácticamente despreciable (10^1 UFC/g), pero luego se incrementó en forma gradual, alcanzando a los 60 días de maduración, valores de 10^4 y 10^3 UFC/g en quesos controles y experimentales, respectivamente.



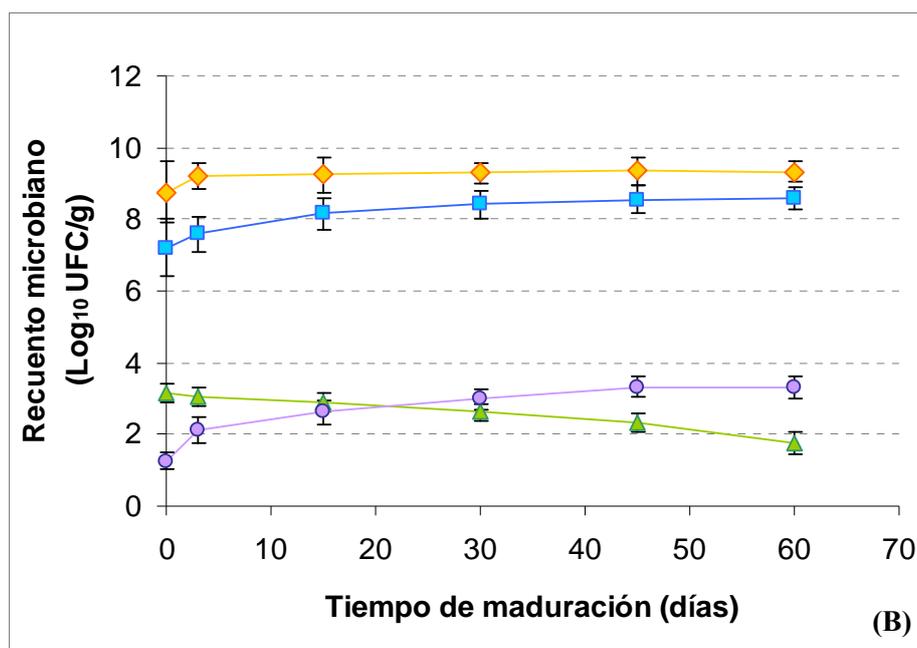


Figura 2.2. Evolución de las poblaciones del fermento primario (◆), coliformes (▲), hongos/levaduras (●) y lactobacilos (■) adventicios y adjuntos (*Lb. plantarum* I91), en los quesos Cremoso miniatura controles (A) y experimentales (B), respectivamente, correspondientes a la experiencia 1. Se informa el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos de elaboración de queso.

Los recuentos de la flora láctica y adventicia en los quesos controles y con agregado de *Lb. casei* I90 (experiencia 2) se presentan en las Figuras 2.3A y 2.3B, respectivamente. El fermento primario de *S. thermophilus* se mantuvo constante en niveles de 10^9 UFC/g durante toda la etapa de maduración, tanto en quesos controles como experimentales. En forma similar a lo observado para la cepa de *Lb. plantarum*, el cultivo adjunto de *Lb. casei* I90 creció rápidamente durante la elaboración (desde 10^6 UFC/ml leche hasta 10^7 UFC/g cuajada) y luego se mantuvo en recuentos elevados (10^8 UFC/g) durante todo el proceso de maduración (Figura 2.3B). En los quesos controles, no se detectó desarrollo de lactobacilos adventicios hasta los 30 días de maduración, pero a partir de entonces, se evidenció un incremento leve en sus recuentos que no superó las 10^2 UFC/g (Figura 2.3A). La población de coliformes y de hongos y levaduras, mostró un patrón de crecimiento similar al observado para la experiencia 1. En efecto, las bacterias coliformes, inicialmente elevadas, disminuyeron 2 órdenes logarítmicos, mientras que los hongos y levaduras, inicialmente bajos, se incrementaron en 3 órdenes logarítmicos con el avance de la maduración. En los quesos elaborados con adjunto de *Lb. casei* I90, los recuentos de ambas poblaciones microbianas adventicias fueron menores que en los quesos controles al final de la maduración.

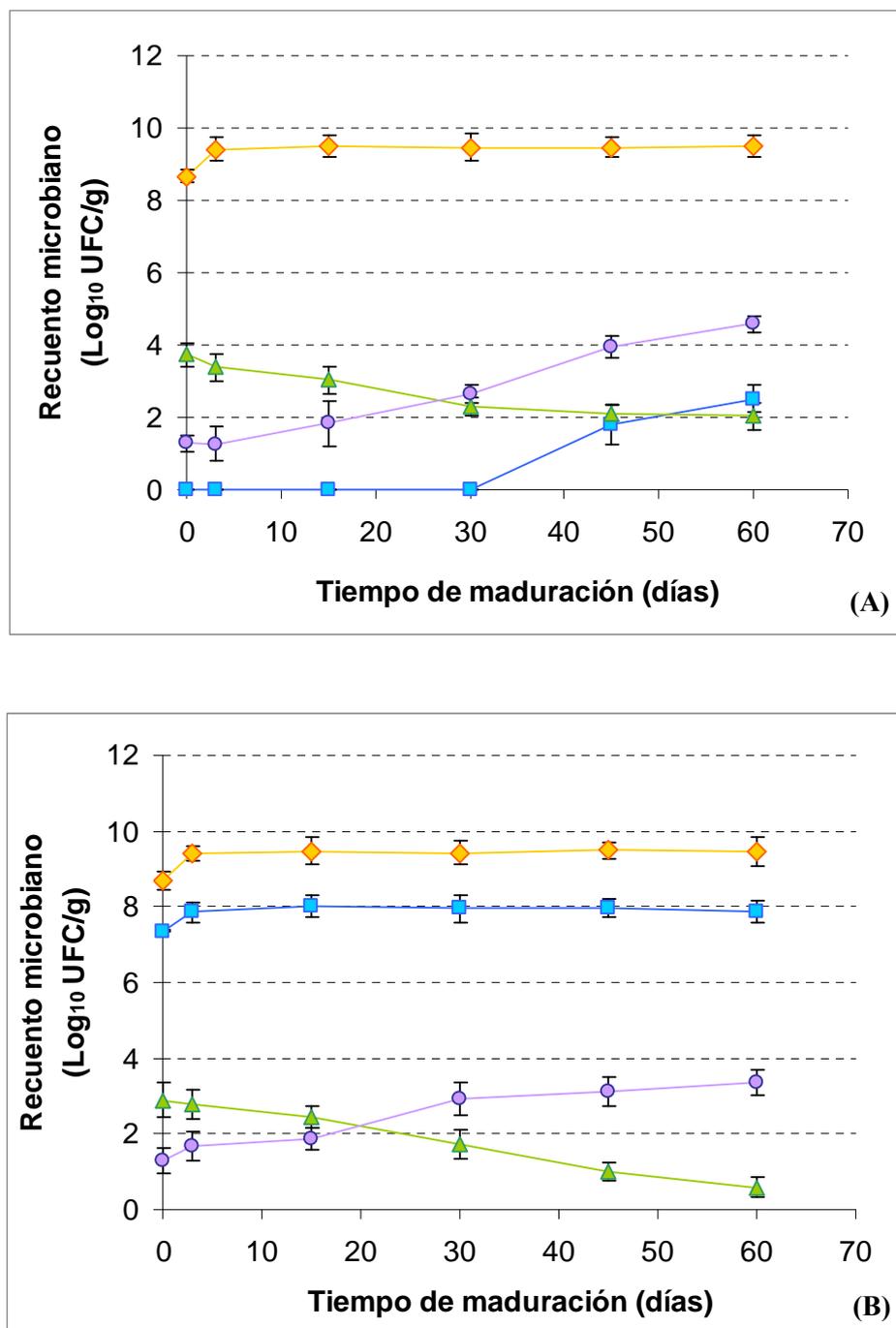


Figura 2.3. Evolución de las poblaciones del fermento primario (◆), coliformes (▲), hongos/levaduras (●) y lactobacilos (■) adventicios y adjuntos (*Lb. casei* I90), en los quesos Cremoso miniatura controles (A) y experimentales (B), respectivamente, correspondientes a la experiencia 2. Se informa el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos de elaboración de queso.

En ambas experiencias, la población del fermento primario alcanzó niveles similares en quesos controles y con agregado de cultivo adjunto, lo que indicó que las cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. casei* estudiadas no interfirieron en el crecimiento y supervivencia del *S.*

thermophilus. Son muy escasos los trabajos de investigación en los que se ha detectado un efecto sinérgico entre el fermento iniciador y el cultivo adjunto. Uno de ellos es el realizado por Hynes y col. (2001a), quienes observaron un efecto sinérgico entre el fermento primario *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2, y el adjunto *Lb. plantarum* 1572, en un queso miniatura de pasta lavada; en presencia del adjunto, el recuento final del fermento primario se incrementó en 1 orden log. Otro estudio en donde se evidenció este tipo de interacción es el Ortigosa y col. (2006); los autores indicaron que el fermento primario (constituido por cepas de *L. lactis* susp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*) alcanzó recuentos más elevados en quesos tipo Roncal elaborados con adjuntos de *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum*, en comparación con aquellos no inoculados. Por otra parte, sólo un trabajo reportó una interacción del tipo antagónica entre los fermentos iniciadores y adjuntos. En efecto, Broome y col. (1990) informaron que la presencia de las cepas *Lb. casei* CV1A y MIL2B, propició una disminución más acentuada en el número de la población del fermento primario (*L. lactis* subsp. *cremoris*), el que fue hacia el final de la maduración, 2,5 ciclos menor comparado con los quesos sin adjuntos.

Con respecto a los lactobacilos adjuntos estudiados en el presente trabajo, ambas cepas crecieron rápidamente en la cuajada durante la maduración, y mostraron una supervivencia favorable en las condiciones ambientales definidas en el queso. En general, las cepas pertenecientes a las especies *Lb. casei* y *Lb. plantarum*, han mostrado un desarrollo y una adaptación favorables, no sólo en distintas variedades de quesos (blandos, semiduros, duros, reducidos en grasa, de pasta lavada, etc.), y en consecuencia, en presencia de condiciones de elaboración y maduración muy diferentes (McSweeney y col., 1994; Gomez y col., 1996; Menéndez y col., 2000; Broadbent y col., 2003; Poveda y col., 2003), sino también en matrices alimentarias que simulan las condiciones reales que prevalecen en el alimento, como lo son los *slurries* de queso (Farkye y col., 1995; Muehlenkamp-Ulate y Warthesen, 1999) y los quesos miniatura (Antonsson y col., 2003; Hynes y col., 2003a; 2003b; Di Cagno y col., 2006). En la mayoría de los casos, los adjuntos desarrollaron hasta valores máximos comprendidos entre 10^7 y 10^8 UFC/g, y se mantuvieron en estos valores elevados durante todo el periodo de maduración.

En el caso de los lactobacilos adventicios, si bien se verificó cierto desarrollo en los quesos controles, la población siempre se mantuvo por debajo de 10^4 UFC/g, lo que significó una diferencia de 4 ciclos log en los recuentos de lactobacilos entre quesos controles y experimentales a lo largo de la maduración. Esta gran diferencia en los recuentos, permite atribuir cualquier cambio en los perfiles proteolíticos y/o en las características sensoriales del

producto, a la actividad metabólica del adjunto. En general, la aplicación de condiciones de asepsia o de higiene en la elaboración o preparación de sistemas modelos, permitió controlar de manera eficaz la contaminación con NSLAB adventicias, y por lo tanto, inhibir el desarrollo de este grupo microbiano en el producto a valores superiores a 10^4 UFC/g (Muehlenkamp-Ulate y Warthesen, 1999; Hynes y col., 2003a; 2003b; Di Cagno y col., 2006). Un recuento elevado ($\geq 10^6$ UFC/g) de lactobacilos adventicios en los quesos controles, podría alterar los patrones de maduración, dificultando el estudio del impacto de los lactobacilos adjuntos adicionados.

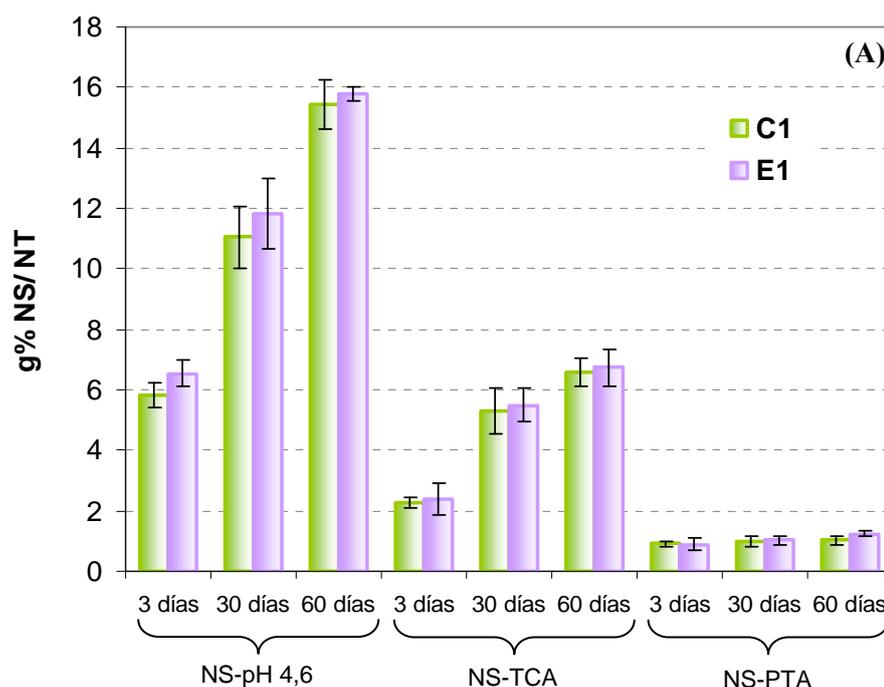
Finalmente, los quesos elaborados con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 exhibieron recuentos de coliformes y de hongos y levaduras inferiores a los de sus respectivos quesos controles. Estos resultados indicaron que las cepas de lactobacilos ensayadas fueron efectivas en controlar el desarrollo de la microflora indeseable, posiblemente al competir por los sustratos de crecimiento presentes en la masa del queso. Esta interacción antagónica entre los adjuntos de lactobacilos mesófilos y la microflora adventicia no láctica, ha sido observada recientemente por algunos investigadores. En efecto, Ortigosa y col. (2006) informaron que las cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* ensayadas como adjuntos en queso Roncal, mostraron un efecto antagónico contra enterobacterias y enterococos, los que disminuyeron más abruptamente en los quesos elaborados con lactobacilos adjuntos. Los autores atribuyeron este fenómeno a la liberación de sustancias antimicrobianas por parte de las cepas ensayadas. Resultados similares fueron observados por Herreros y col. (2007), quienes reportaron que la adición de una cepa de *Lb. plantarum* como adjunto en la elaboración de queso Armada, disminuyó en 1 ciclo log el recuento de enterobacterias. Este fenómeno también fue reportado en un estudio desarrollado por Mangia y col. (2008), en el que se reportó una disminución en el número de bacterias coliformes de 2 ciclos log, en quesos Fiore Sardo elaborados con cepas autóctonas de *Lb. plantarum* y *Lb. casei* subsp. *casei* como adjuntos. Los autores atribuyeron ese efecto inhibitorio a una mayor velocidad de acidificación de la cuajada durante la elaboración, asociada a la presencia de los lactobacilos adjuntos.

3.3. Estudio de la proteólisis

En ambas experiencias, los diferentes índices de proteólisis estudiados revelaron el avance de la hidrólisis de las caseínas con el tiempo de maduración, en los quesos elaborados con y sin lactobacilos adjuntos.

3.3.1. Fraccionamiento nitrogenado

El contenido de nitrógeno en las distintas fracciones solubles (expresado como porcentaje del nitrógeno total) de los quesos controles y experimentales, pertenecientes a las experiencias 1 y 2, se presenta en las Figuras 2.4A y 2.4B, respectivamente. Los valores obtenidos en ambas experiencias fueron similares a los informados para queso Cremoso comercial (Hynes y col., 2001b). Excepto el contenido de NS-PTA, el resto de las fracciones solubles aumentaron en todos los quesos con el tiempo de maduración. Los resultados señalaron que los cultivos adjuntos estudiados (*Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90) no influyeron significativamente en la proteólisis descrita por fraccionamiento de nitrógeno, dado que los valores para quesos con y sin lactobacilos agregados fueron muy similares ($P > 0,05$). Estos resultados son coincidentes con los reportados en otros estudios, en los que la incorporación de adjuntos de lactobacilos no modificó los niveles de las distintas fracciones nitrogenadas (Lane y Fox, 1996; Lynch y col., 1996; Madkor y col., 2000; Poveda y col., 2003). Sin embargo, se han publicado trabajos en los que se evidenció un impacto del adjunto en la producción de compuestos nitrogenados solubles. En efecto, algunas cepas de *Lb. plantarum* (Menéndez y col., 2000; Hynes y col., 2003b) y de *Lb. casei* (Broome y col., 1990; Michaelidou y col., 2003), causaron un incremento en el contenido de NS-PTA (un indicador de péptidos pequeños y aminoácidos libres), lo que sugirió una actividad peptidasa elevada en esos microorganismos.



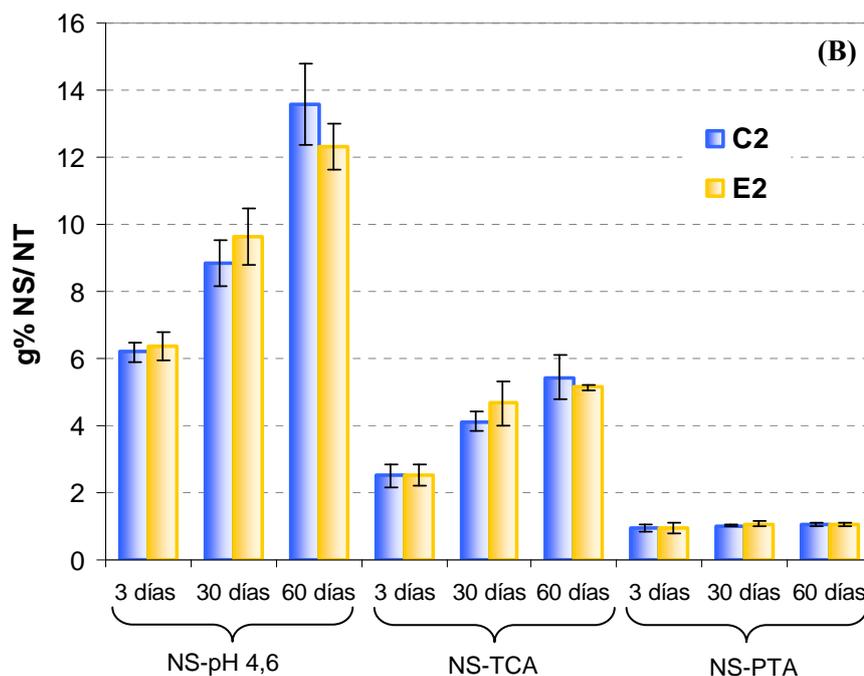


Figura 2.4. Evolución del contenido de nitrógeno en las distintas fracciones solubles (NS-pH 4,6, NS-TCA, NS-PTA), expresado como porcentaje del nitrógeno total (NT), durante la maduración de los quesos Cremoso miniatura controles (C) y experimentales (E), correspondientes a la experiencia 1 (A) y 2 (B). Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos de elaboración de queso.

3.3.2. Electroforesis (urea-PAGE)

En las Figuras 2.5A y 2.5B se muestra la electroforesis de los quesos controles y experimentales de 3, 30 y 60 días de maduración, correspondientes a las experiencias 1 y 2, respectivamente. Los electroforetogramas de las distintas muestras analizadas, mostraron patrones de degradación de las caseínas típicos del queso Cremoso. En efecto, los quesos se caracterizaron fundamentalmente por una hidrólisis progresiva y extensa de la α_{s1} -caseína con el avance de la maduración, con la consiguiente formación del péptido α_{s1} -CN (f24-199). Durante la maduración, también se observó una disminución leve de la banda correspondiente a la β -caseína, cuya hidrólisis resultó en la formación de las fracciones γ -caseínas. Como se mencionó en el capítulo 1, la proteólisis primaria en el queso Cremoso se debe principalmente a la acción de la enzima coagulante residual, ya que la ausencia de una etapa de cocción en el proceso de elaboración favorece la retención y actividad de dicha proteasa (Hynes y col., 2001b). Por otra parte, en las distintas etapas de la maduración, los resultados electroforéticos de los quesos elaborados con y sin lactobacilos adjuntos, pertenecientes a ambas experiencias,

fueron muy semejantes. Este patrón era de esperar, dado que se ha demostrado que en general, los lactobacilos mesófilos poseen una débil actividad proteolítica, y por lo tanto, no contribuyen de manera importante a la hidrólisis de las caseínas intactas durante la maduración (Di Cagno y col., 2006; Morea y col., 2007).

Estos resultados son coincidentes con los reportados en otros estudios, en los que también se evaluó la actividad proteolítica de adjuntos de *Lb. plantarum* (Lynch y col., 1999; Poveda y col., 2003; Di Cagno y col., 2006) y *Lb. casei* (McSweeney y col., 1994; Lane y Fox, 1996; Scolari y col., 1996; Di Cagno y col., 2006) en quesos o sistemas modelo.

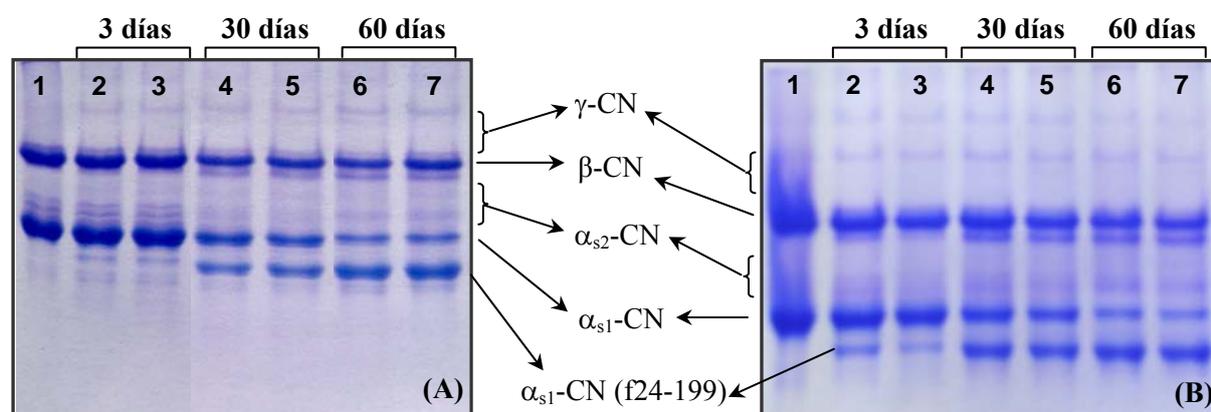


Figura 2.5. Electroforesis (urea-PAGE) de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos Cremoso miniatura controles y experimentales, correspondientes a la experiencia 1 (A) y 2 (B). Línea 1: caseinato patrón. Líneas 2, 4, 6 y 3, 5, 7 corresponden, respectivamente, a un queso control y a un queso experimental a los 3, 30 y 60 días de maduración.

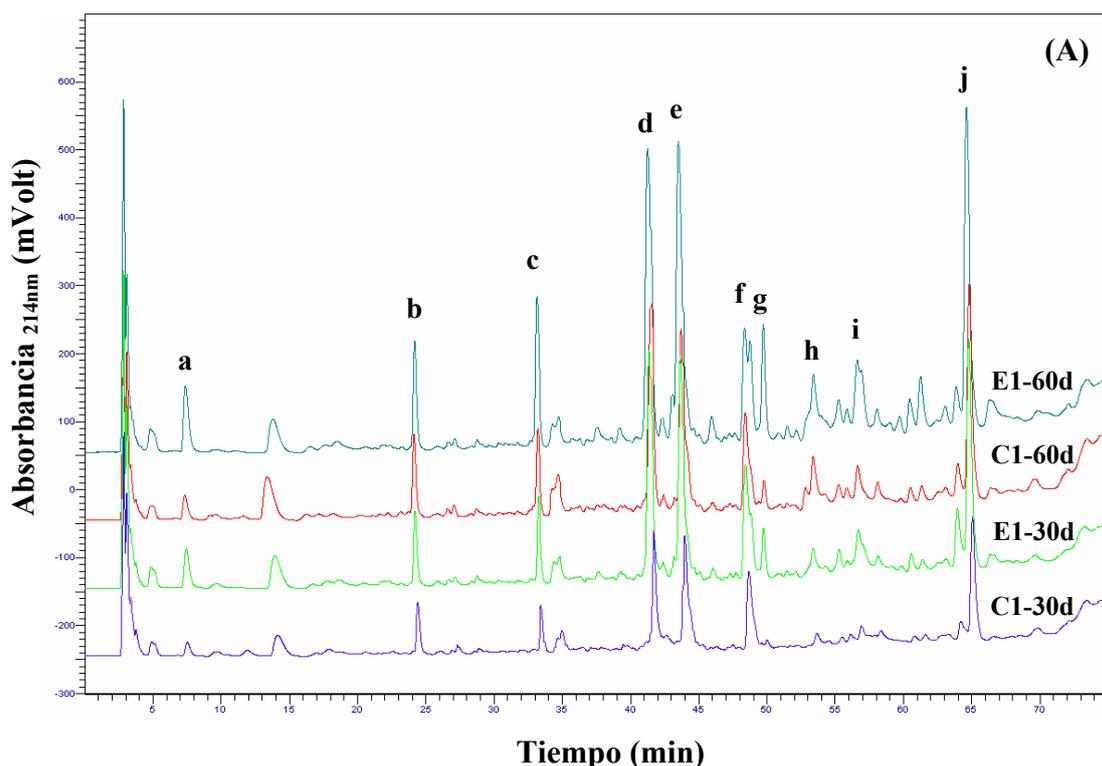
3.3.3. Perfiles peptídicos

Los perfiles peptídicos de los quesos permiten obtener una útil representación visual de las dinámicas de producción y degradación de péptidos con el progreso de la maduración (Muehlenkamp-Ulate y Warthesen, 1999).

En todos los tipos de quesos analizados se detectó una notable modificación en los perfiles peptídicos con el tiempo de maduración. En efecto, todos los quesos de 3 días presentaron cromatogramas muy simples, caracterizados por una escasa cantidad de picos de pequeño tamaño. Con el tiempo de maduración, en general, se observó un incremento en el área de algunos picos, como así también, la presencia de nuevos péptidos. En ambas experiencias, la comparación visual de los cromatogramas de los quesos controles y experimentales, reveló diferencias fundamentalmente cuantitativas, las que fueron más evidentes hacia el final de la

maduración (60 días). En las Figuras 2.6A y 2.6B se presentan los perfiles peptídicos de los quesos elaborados con y sin cultivos adjuntos, pertenecientes a las experiencias 1 y 2, respectivamente, luego de 30 y 60 días de maduración. A los 30 y 60 días de maduración, los picos de los cromatogramas de los quesos elaborados con *Lb. plantarum* I91, exhibieron en general, un área mayor que la de los presentes en las muestras controles (Figura 2.6A). A diferencia de lo observado para los quesos elaborados con *Lb. plantarum* I91, en las muestras de 30 días inoculadas con *Lb. casei* I90, el área de algunos picos fue menor comparado con los quesos controles. Sin embargo, a los 60 días este patrón se invirtió, y los quesos tratados con el adjunto exhibieron péptidos de mayor área que aquellos no inoculados (Figura 2.6B). Por otra parte, la comparación de los perfiles peptídicos de los quesos obtenidos en ambas experiencias, reveló que las mayores diferencias entre los perfiles peptídicos de quesos con y sin adjunto, se obtuvieron con la cepa *Lb. plantarum* I91.

La comparación visual del conjunto de cromatogramas permitió la selección de diez y catorce picos, para las experiencias 1 y 2, respectivamente, que se señalan en las Figuras 2.6A y 2.6B con caracteres. Las áreas de estos picos fueron utilizadas como variables independientes en el ACP; los picos sin rótulo no fueron considerados en el análisis estadístico (Bergamini y col., 2006a). Los picos seleccionados fueron aquellos que presentaron mayor variación entre las muestras, en base al tiempo de maduración y al tipo de queso (con o sin lactobacilos adjuntos).



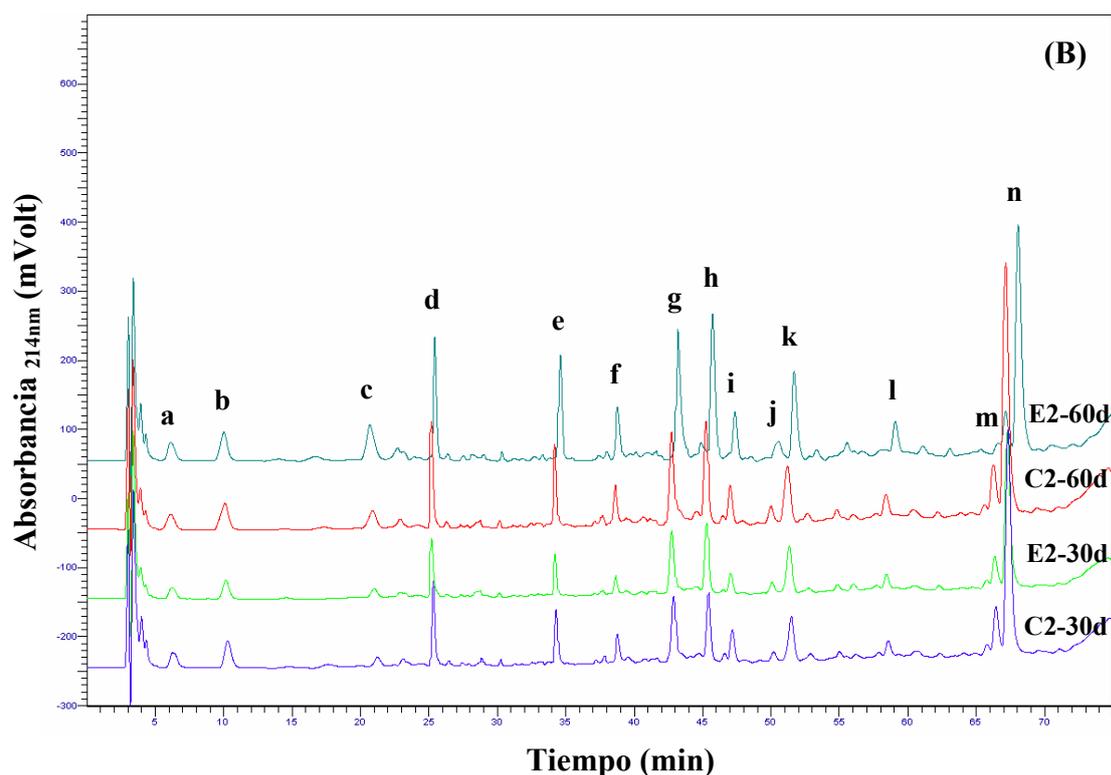


Figura 2.6. Perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4,6 de los quesos Cremoso miniatura de 30 y 60 días, elaborados con y sin lactobacilos adjuntos, correspondientes a las experiencias 1 (A) y 2 (B). C1 y C2: quesos controles correspondientes a las experiencias 1 y 2, respectivamente. E1 y E2: quesos experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, respectivamente.

Para los resultados de la experiencia 1, se retuvieron los dos primeros CPs, que explicaron el 98,3% de la variabilidad total de los datos. El gráfico de los *loadings* de las variables independientes (Figura 2.7A) reveló que todos los picos seleccionados exhibieron una fuerte influencia sobre el eje CP1, mientras que sólo los picos *a*, *f*, *i*, *j*, y en menor medida, *c* y *g*, impactaron sobre el CP2. La Figura 2.7B muestra el gráfico de los *scores* de los quesos Cremoso miniatura elaborados con y sin *Lb. plantarum* I91, luego de 3, 30 y 60 días de maduración. Las muestras se agruparon de acuerdo al tiempo de maduración a lo largo de CP1, y en base al tipo de queso (control o experimental) sobre el eje CP2. En general, los picos *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *g*, predominaron en los quesos inoculados con *Lb. plantarum* I91 de 60 días de maduración. Para el resto de los picos no fue posible establecer su preponderancia en quesos controles o experimentales, ya que la variabilidad de los mismos fue principalmente función del tiempo de maduración. El AC clasificó a las muestras de queso en cuatro grupos diferentes, indicados en la Figura 2.7B con elipses. Todos los quesos de 3 días de maduración fueron agrupados en un mismo cluster (cluster 1), independientemente del tipo de queso. De

manera similar, el cluster 2 incluyó tanto a los quesos controles como a los quesos experimentales de 30 días. Los quesos elaborados con y sin cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91, fueron agrupados en clusters diferentes al final del periodo de maduración (60 días); los grupos 3 y 4 incluyeron a los quesos controles y experimentales de 60 días, respectivamente.

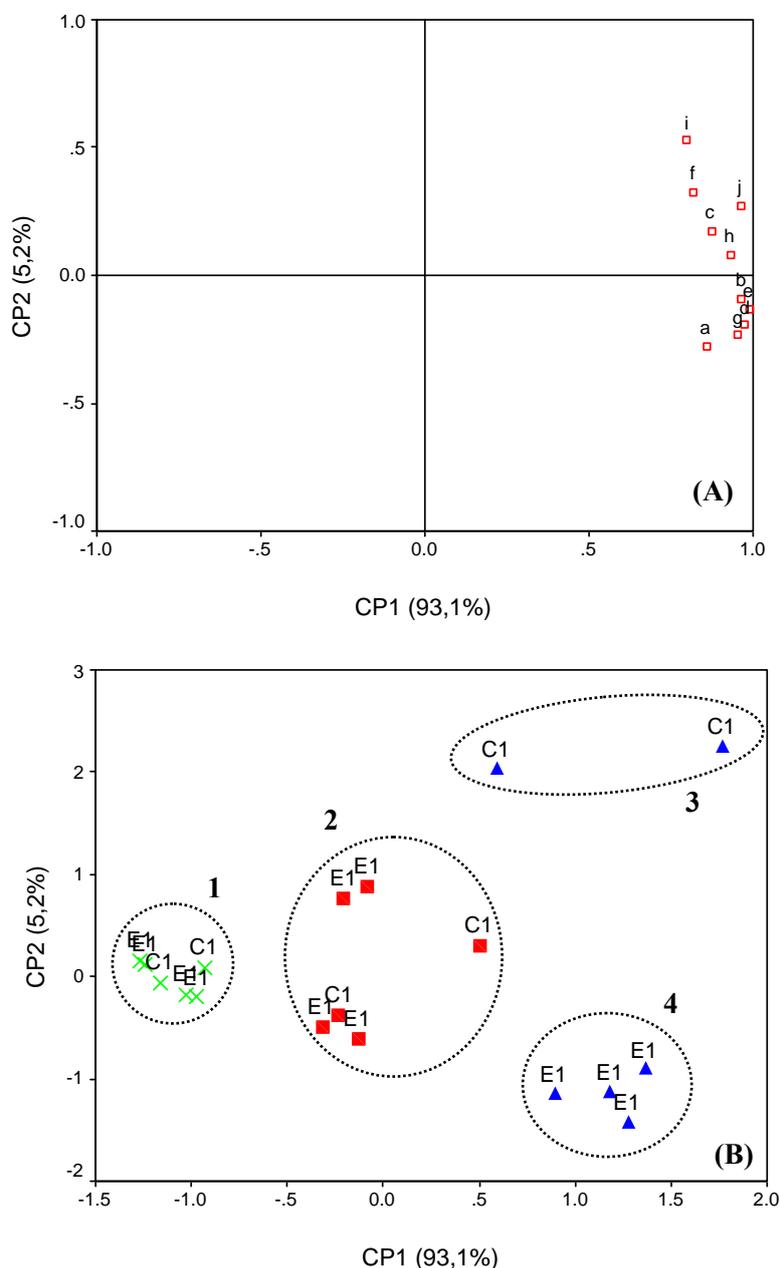
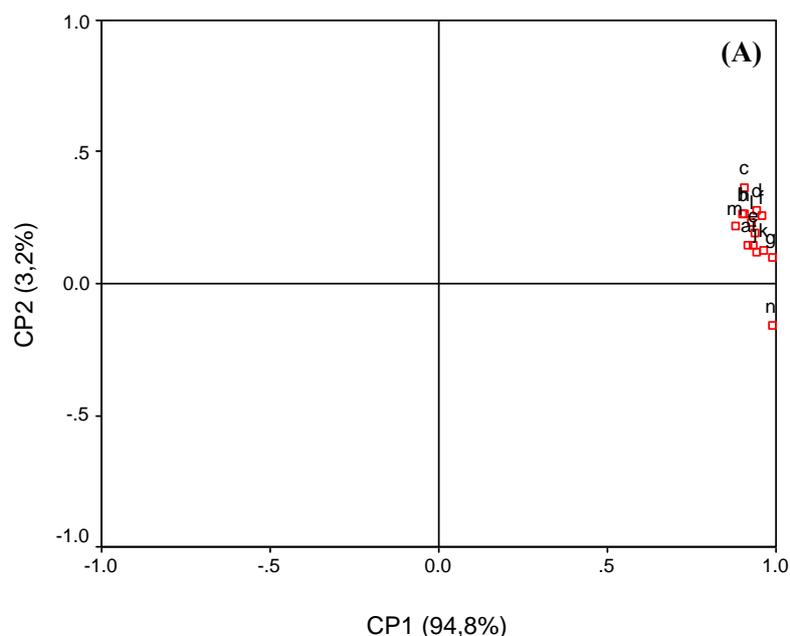


Figura 2.7. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC de los quesos Cremoso miniatura controles y experimentales, correspondientes a la experiencia 1. **A)** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B)** Gráfico de los *scores* sobre CP1 vs. CP2 de los quesos controles (C1) e inoculados con *Lb. plantarum* I91 (E1), a los 3 (×), 30 (■) y 60 (▲) días de maduración. Las elipses agrupan a las muestras de queso en un mismo cluster (*K*-means).

Como en el caso anterior, en la experiencia 2 también se retuvieron los dos primeros CPs, que explicaron el 98% de la variabilidad total de los datos. En el gráfico de los *loadings* (Figura 2.8A) se observó que todos los picos seleccionados impactaron en el CP1, mientras que los picos *c*, *b*, *d*, *f*, *h*, *l*, *m* y *n* ejercieron una influencia relativa sobre el eje CP2. La Figura 2.8B muestra la distribución de los quesos Cremoso miniatura elaborados con y sin cultivo adjunto de *Lb. casei* I90, luego de 3, 30 y 60 días de maduración. Al igual que en la experiencia 1, las muestras se agruparon de acuerdo al tiempo de maduración a lo largo del CP1, y en base al tipo de queso (controles y experimentales) sobre el eje CP2. Los picos *c*, *d*, *e*, *g*, *h*, y *k*, localizados en el cuadrante positivo del CP2, predominaron en los quesos experimentales de 60 días, mientras que sólo el pico *n*, fue característico de los quesos controles de igual tiempo de maduración. El resto de los picos no presentó grandes variaciones en relación al tipo de queso. En forma similar a la experiencia 1, el AC clasificó a las muestras de queso en cuatro grupos, pero a diferencia de ésta, el patrón de agrupamiento fue bastante diferente (Figura 2.8B). El cluster 1 incluyó a todos los quesos de 3 días de maduración, ya sea elaborados con o sin lactobacilos adjuntos. El cluster 2 se compuso por los quesos experimentales de 30 días más un queso control de 60 días de maduración. El cluster 3 agrupó a todos los quesos controles de 30 días, y a dos de 60 días de maduración. Finalmente, los quesos elaborados con *Lb. casei* I90 de 60 días fueron agrupados en un único cluster (cluster 4).



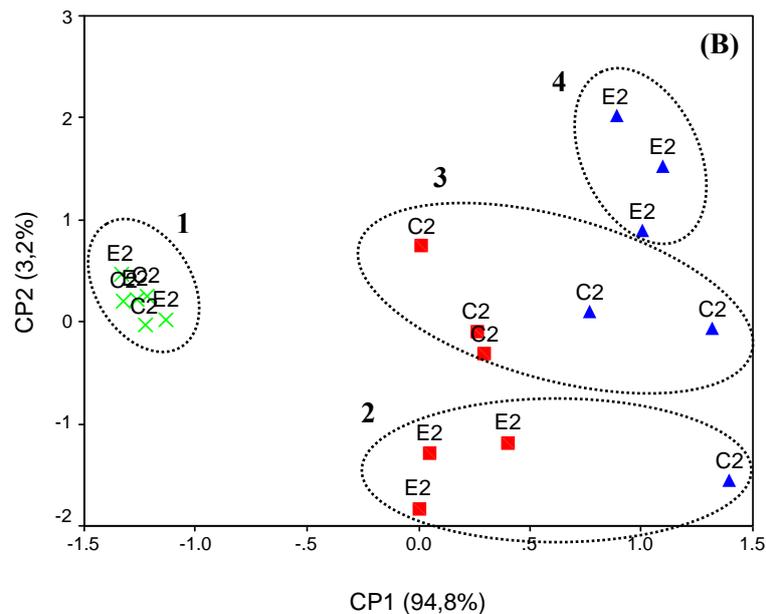


Figura 2.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC de los quesos Cremoso miniatura controles y experimentales, correspondientes a la experiencia 2. **A)** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B)** Gráfico de los *scores* sobre CP1 vs. CP2 de los quesos controles (C2) e inoculados con *Lb. casei* I90 (E2), a los 3 (×), 30 (■) y 60 (▲) días de maduración. Las elipses agrupan a las muestras de queso en un mismo cluster (*K*-means).

El análisis estadístico multivariante indicó que las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 ensayadas, causaron notables modificaciones en los perfiles peptídicos de los quesos Cremoso miniatura, que fueron consecuentes con la aceleración de la proteólisis secundaria durante la maduración. Otros autores han observado un impacto similar sobre la proteólisis evidenciada mediante RP-HPLC de los extractos acuosos u otras fracciones solubles, cuando se ensayaron cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* como adjuntos en elaboraciones de queso o en sistemas modelo. En *slurries* de queso Cheddar, Farkye y col. (1995) y Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999), encontraron diferencias en los perfiles peptídicos de muestras preparadas con y sin cultivos adjuntos, entre los que se encontraban cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum*, y entre *slurries* inoculados con adjuntos de diferentes cepas y especies de lactobacilos; esto último está vinculado a diferencias en los sistemas enzimáticos, característicos de cada cepa. Asimismo, Farkye y col. (1995) reportaron que, en general, las cepas de *Lb. casei* presentaron menor capacidad proteolítica que las cepas de *Lb. plantarum*, lo que fue también constatado en el presente trabajo. Hynes y col. (2003b) también evaluaron el impacto de cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* sobre la proteólisis secundaria de quesos

miniatura de pasta lavada, y detectaron diferencias fundamentalmente cuantitativas entre los perfiles peptídicos de quesos con y sin fermento adjunto. En queso Cheddar elaborado a escala piloto sin fermento primario, acidificado artificialmente, Lane y Fox (1996) encontraron diferencias cuali y cuantitativas en los perfiles peptídicos, asociadas a la incorporación de un cultivo constituido por 6 cepas de lactobacilos, algunas de ellas pertenecientes a las especies *Lb. casei* y *Lb. plantarum*. Los investigadores informaron que algunos de los picos cuyo tiempo de retención estaba comprendido entre 30 y 54 min, no se detectaron o mostraron una concentración relativamente menor en los quesos no inoculados. En queso Manchego también se verificó el impacto de un adjunto de *Lb. plantarum* al nivel de los mapas peptídicos (Poveda y col., 2003). En efecto, la cepa ensayada incrementó el área de algunos picos en los cromatogramas, fundamentalmente aquellos comprendidos en el intervalo de tiempo de retención de 40 a 50 min. Los datos cromatográficos fueron analizados mediante ACP, y los quesos elaborados con *Lb. plantarum* como adjunto se separaron notoriamente de los controles no inoculados. Sin embargo, el grado de actividad peptidolítica es una característica propia de cada cepa, y en consecuencia, algunos investigadores no detectaron o bien observaron sólo pequeñas diferencias cuantitativas en los perfiles peptídicos de quesos elaborados con y sin diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. como cultivos adjuntos (McSweeney y col., 1994; Lynch y col., 1996; 1999; Hynes y col., 2001a; Antonsson y col., 2003; Michaelidou y col., 2003).

3.3.4. Aminoácidos libres totales e individuales

Como se mencionó en el capítulo 1, el proceso proteolítico en el queso culmina con la producción de aminoácidos libres, los que son posteriormente catabolizados a una gran variedad de compuestos de aroma y sabor. De esta forma, el contenido de aminoácidos libres en el queso es el resultado del balance entre su producción y su degradación por diversos sistemas enzimáticos (Pripp y col., 2000a; Sousa y col., 2001). Asimismo, la concentración de los diferentes aminoácidos en un queso está relacionada con diversos factores, a saber: tecnología de fabricación (tipo de cuajada, adición de proteinasas, fermentos primarios, condiciones de maduración), tiempo de maduración, y extensión de la proteólisis (Poveda y col., 2004a).

En las Figuras 2.9A y 2.9B se presentan los perfiles de AAL individuales de los quesos Cremoso miniatura elaborados con y sin lactobacilos adjuntos, correspondientes a las

experiencias 1 y 2, respectivamente, luego de 3 y 60 días de maduración. En todos los quesos analizados, el contenido total de AAL se incrementó con el progreso de la maduración.

En ambas experiencias, los quesos controles y experimentales presentaron niveles similares de AAL totales al comienzo de la maduración (3 días), pero luego de 60 días se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), que fueron notablemente mayores entre las muestras preparadas con y sin fermento adjunto de *Lb. plantarum* I91 (experiencia 1). En efecto, la adición de *Lb. plantarum* I91, duplicó el contenido total de AAL respecto a los controles no inoculados, mientras que, la incorporación de *Lb. casei* I90 incrementó el nivel de aminoácidos sólo en un 42%.

Los AAL más abundantes en los quesos controles y tratados con *Lb. plantarum* I91 de 60 días fueron: arginina, alanina, prolina, lisina, leucina y fenilalanina, los que representaron alrededor del 80% del contenido total de AAL. En la experiencia 2, los aminoácidos arginina, alanina, glutámico, lisina, leucina y fenilalanina, predominaron en los quesos elaborados con *Lb. casei* I90, y representaron aproximadamente el 78% del contenido total de AAL. Excepto por el ácido glutámico, esos mismos aminoácidos, más la tirosina, fueron mayoritarios en los quesos no inoculados de la experiencia 2, y también representaron alrededor del 78% del nivel total de aminoácidos. Los aminoácidos leucina, fenilalanina y lisina fueron también los aminoácidos mayoritarios en otras variedades de queso, tales como Cheddar (Broome y col., 1990), Manchego (Poveda y col., 2004a) y Kefalograviera (Michaelidou y col., 2003), entre otros.

Luego de 60 días de maduración, la concentración de los aminoácidos serina, histidina, arginina, treonina, prolina, tirosina, leucina y fenilalanina fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$) en los quesos elaborados con *Lb. plantarum* I91, en comparación con sus respectivos quesos controles. Los quesos elaborados con el adjunto también presentaron una concentración mayor de ácido aspártico que los quesos controles, aunque las diferencias para este aminoácido no fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, los niveles de ácido aspártico, serina, arginina, leucina y fenilalanina, fueron significativamente mayores ($P \leq 0,05$) en los quesos inoculados con *Lb. casei* I90 de 60 días, en comparación con los controles de igual tiempo de maduración. En esta última experiencia, la concentración de alanina fue mayor en los quesos tratados con el adjunto, aunque el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

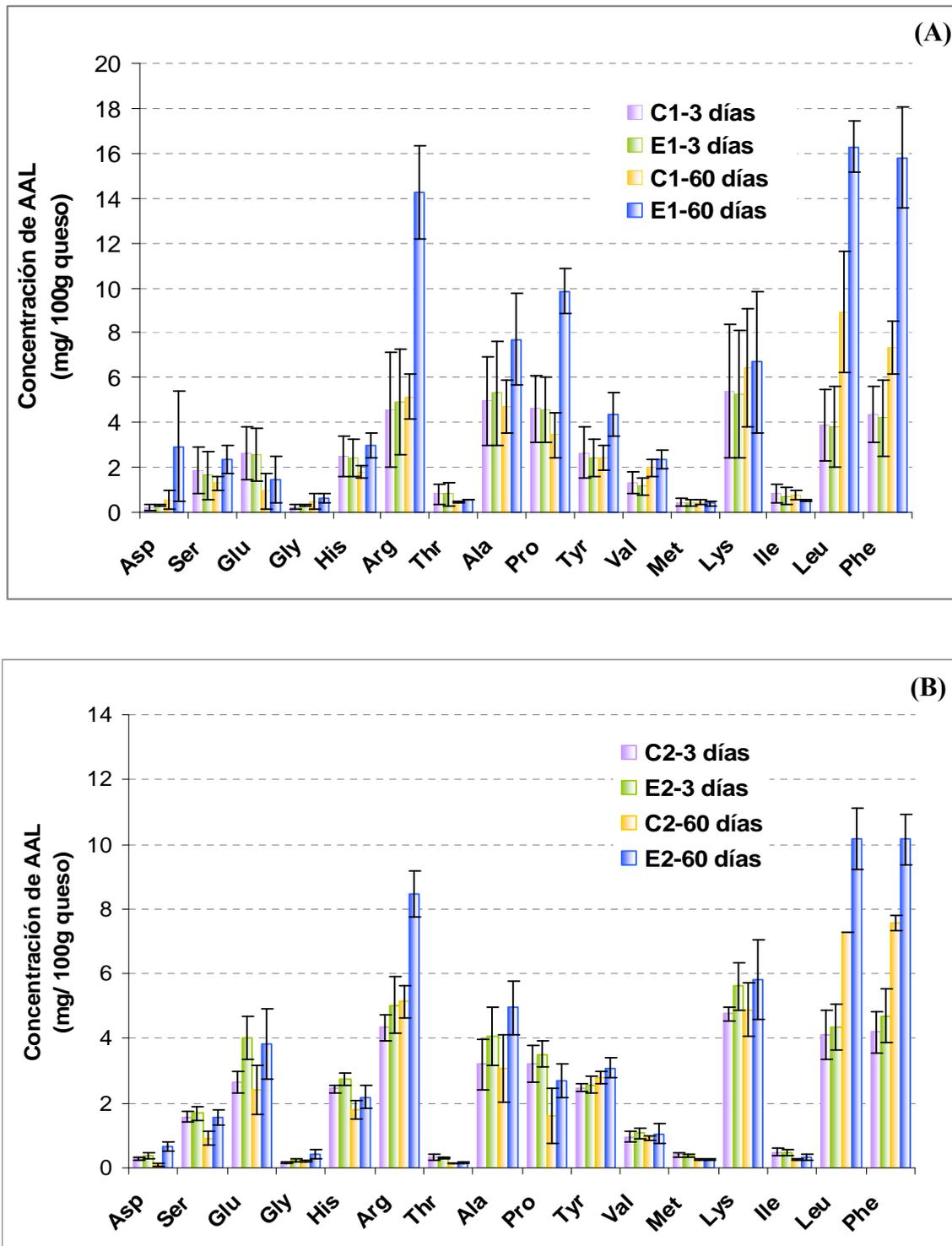


Figura 2.9. Perfiles de aminoácidos libres individuales de los quesos Cremoso miniatura de 3 y 60 días de maduración, elaborados con y sin lactobacilos adjuntos, correspondientes a las experiencias 1 (A) y 2 (B). C1 y C2: quesos controles correspondientes a las experiencias 1 y 2, respectivamente. E1 y E2: quesos experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, respectivamente. Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de cuatro ensayos de elaboración de queso.

Si bien la variabilidad entre los perfiles de aminoácidos libres de las distintas réplicas (quesos elaborados en días diferentes, con leche diferente) fue elevada, el incremento de varios aminoácidos resultó tan alto, que fue posible detectar diferencias con los quesos controles. Esta variación es característica del tipo de experiencia y ha sido observada previamente por varios investigadores (Poveda y col., 2004b; Pripp y col., 2006; Picon y col., 2007).

Para resumir, en el presente trabajo se observó que la adición de *Lb. plantarum* I91 y de *Lb. casei* I90 resultó en un notable incremento de los niveles de AAL totales y ocasionó modificaciones en los perfiles de AAL individuales. Asimismo, la cepa *Lb. plantarum* I91 demostró mayor actividad peptidolítica que el *Lb. casei* I90, dado que produjo un incremento mayor en el contenido de AAL totales e individuales, lo que es coincidente con lo observado en el análisis de los perfiles peptídicos mediante RP-HPLC.

En varias experiencias previas, la adición de adjuntos de lactobacilos mesófilos también condujo a un incremento en la producción de aminoácidos, lo que en muchos casos coincidió con una mayor actividad peptidolítica en los quesos conteniendo el adjunto (Broome y col., 1990; Fernández de Palencia y col., 1997; Morea y col., 2007).

Uno de los primeros trabajos dedicados al estudio de las actividades proteolíticas de lactobacilos mesófilos, fue el desarrollado por Fernández de Palencia y col. (1997), quienes evaluaron la actividad proteinasa y aminopeptidasa de una cepa de *Lb. casei* subsp. *casei*, mediante la adición del extracto de pared celular y de la fracción intracelular de dicha bacteria a un *slurry* de queso. Los autores informaron que la incorporación del material celular de dicha cepa condujo a la hidrólisis de los péptidos hidrofóbicos, y a un incremento en el contenido de los aminoácidos leucina y lisina, durante la incubación de los *slurries*. En un *slurry* de queso Cheddar, Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999) evaluaron la capacidad proteolítica de 10 cepas de lactobacilos de origen NSLAB. Las muestras preparadas con *Lb. casei* presentaron niveles mayores de AAL totales, en comparación con los controles que sólo contenían fermento primario, mientras que, la influencia de las cepas de *Lb. curvatus* y *Lb. paracasei* sobre la proteólisis fue menor. En general, los *slurries* con agregado de lactobacilos adjuntos presentaron niveles mayores de metionina, leucina, lisina, fenilalanina, valina y tirosina, que los *slurries* no inoculados. Los investigadores concluyeron que todas las cepas de NSLAB evaluadas influían en la formación de aminoácidos, pero en una extensión diferente, como resultado de diferencias en sus actividades proteolíticas.

Hynes y col. (2003a) informaron que en quesos miniatura de pasta lavada, varias cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* estudiadas incrementaron el contenido de AAL, aunque el aumento

variaba de una cepa a otra y según el fermento primario utilizado. En un modelo de queso miniatura tipo Caciotta, varias cepas de lactobacilos mesófilos ensayadas incrementaron los niveles de AAL respecto al control; en particular, los quesos elaborados con las cepas de *Lb. parabuchneri* y *Lb. paracasei*, se caracterizaron por una mayor acumulación de lisina, ácido glutámico, fenilalanina, histidina, aspártico y metionina (Di Cagno y col., 2006).

En otros estudios, por el contrario, los fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos no influyeron en la proteólisis secundaria al nivel de la formación de AAL (Poveda y col., 2004a; Mangia y col., 2008), lo que refuerza el concepto de que la actividad bioquímica de estos microorganismos en el queso es cepa dependiente.

3.4. Análisis sensorial

Durante la maduración del queso tienen lugar varias reacciones bioquímicas que están implicadas en la formación de compuestos de aroma y sabor, entre las que se incluyen: glicólisis, lipólisis y proteólisis. La proteólisis es sin duda el principal evento bioquímico que contribuye a la textura, al sabor de fondo y a la formación de precursores de *flavor* en la mayoría de las variedades de quesos (Poveda y col., 2004a). En efecto, el catabolismo de los aminoácidos resultantes de la proteólisis conduce a la formación de hasta el 60 % de los compuestos volátiles que componen el *flavor* del queso, y que le otorgan su aroma característico (Yvon, 2006). Además, la transformación de algunos aminoácidos clave, como el ácido aspártico, los aminoácidos ramificados, los aromáticos o la metionina, conducen a familias específicas de compuestos volátiles que exaltan en el producto determinadas notas de aroma y sabor (Randazzo y col., 2007).

En el presente estudio, el ensayo sensorial triangular demostró que existían diferencias altamente significativas ($P \leq 0,001$) en el aroma de los quesos elaborados con y sin fermentos adjuntos de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90. En la experiencia 1, todos los miembros del panel indicaron que los quesos elaborados con *Lb. plantarum* I91 presentaron un aroma que describieron como “a manteca”, láctico, fresco, más suave y agradable que el de los quesos controles, de aroma más ácido o “a cuajada” más intenso. Por otro lado, en la experiencia 2, se señaló que los quesos experimentales inoculados con *Lb. casei* I90 también presentaron un aroma más agradable y a manteca, pero en este caso, éste era más intenso que el de los quesos controles. El jurado refirió que el aroma de los quesos controles de esta última experiencia era más ácido, “sucio” y de menor intensidad que el de los quesos experimentales.

Los resultados del análisis sensorial indicaron que ambas cepas ensayadas mejoraron los atributos sensoriales del queso Cremoso miniatura, al intensificar la nota “aroma a manteca”, deseable en esta variedad de queso. Se ha informado que el diacetilo y la acetoína son los principales responsables del aroma suave, cremoso y agradable de los quesos Cheddar y de los quesos de pasta lavada (ejemplo, Saint Paulin o Gouda), de corto periodo de maduración (Drake y col. 1999; Hynes y col., 2003a; Kieronczyk y col., 2004).

Son numerosos los estudios realizados a escala piloto o industrial, en los que se ha detectado un impacto positivo de cepas de lactobacilos mesófilos sobre la calidad sensorial del queso. En la mayoría de los casos, los adjuntos de lactobacilos mejoraron las características sensoriales del queso, a través de la intensificación del *flavor*, y/o de la formación de notas de aroma y sabor distintivas, que otorgan tipicidad al producto (Broome y col., 1990; McSweeney y col., 1994; Lynch y col., 1999; Menéndez y col., 2000; Swearingen y col., 2001; Benech y col., 2003). Sin embargo, sólo unos pocos investigadores han evaluado la influencia de este tipo de fermentos en sistemas de queso modelo, en los que es posible identificar y valorar la verdadera contribución del adjunto, minimizando la influencia de otros grupos microbianos en el ecosistema.

En el estudio desarrollado por Hynes y col. (2003a), las cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* ensayadas, influyeron positivamente en la textura y en el *flavor* de los quesos miniatura tipo “Saint Paulin”, pero su grado de contribución fue influenciado por el tipo de fermento primario utilizado (lítico o no lítico). En un sistema de queso modelo, las cepas de *Lb. paracasei* mejoraron los atributos sensoriales del producto, mientras que las cepas de *Lb. plantarum* introdujeron *off-flavors* (Antonsson y col., 2003). Recientemente, Randazzo y col. (2007) evaluaron la habilidad de cepas de *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. rhamnosus* para generar compuestos de aroma y sabor en un sistema de queso modelo. En forma similar a lo observado en nuestro estudio, las cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* estudiadas, intensificaron los atributos sensoriales y le otorgaron al producto un aroma a crema o manteca. En diferentes medios de reacción, como así también en leches fermentadas, algunas cepas pertenecientes a las especies *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. paracasei*, han demostrado capacidad para producir grandes cantidades de diacetilo o acetoína, lo que resultó en una intensificación del atributo aroma a manteca (Drake y col., 1999; Kieronczyk y col., 2004; Skeie y col., 2008b).

Las diferencias detectadas en el perfil de aroma de los quesos controles y experimentales de ambas experiencias, podrían ser atribuidas a la producción, por parte de los fermentos adjuntos adicionados, de compuestos volátiles derivados del catabolismo del citrato o del

aspartato (Kieronczyk y col., 2003). En ensayos realizados *in vitro* (Kieronczyk y col., 2004; Skeie y col., 2008b), como en una pasta de queso (Kieronczyk y col., 2004), se ha demostrado que el diacetilo y la acetoína, responsables del aroma suave a manteca, pueden ser generados por algunas cepas de lactobacilos mesófilos, a partir del metabolismo del citrato o del aspartato.

4. Conclusiones

Las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 ensayadas presentaron potencial para su utilización como fermentos adjuntos en quesería, dado que: **i)** no contribuyeron a la producción de ácido láctico durante la elaboración, ni influyeron en el crecimiento de la flora láctica primaria durante la maduración, **ii)** mostraron un desarrollo y una supervivencia favorables en el ambiente del queso durante los 60 días, **iii)** dominaron la microflora del queso, controlando el desarrollo de la flora indeseable, **iv)** incrementaron la proteólisis secundaria, a través de modificaciones en los perfiles peptídicos y de AAL, y el incremento del contenido total de aminoácidos, y **v)** mejoraron las características sensoriales de los quesos Cremoso miniatura, al evitar la formación de *off-flavors* y al intensificar la nota “aroma a manteca”, típica de esta variedad.

Capítulo 3

*“Influencia de lactobacilos autóctonos
potencialmente probióticos en la proteólisis y
las características sensoriales de quesos
Cremoso y Pategrás”*

1. Introducción

La utilización de cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos es una práctica cada vez más frecuente en la industria quesera moderna (Broome y col., 2003; Johnson y Lucey, 2006; Cogan y col., 2007). Alternativamente, los lactobacilos heterofermentantes pueden formar parte de algunos fermentos primarios mesofilicos mixtos (Herreros y col., 2007, Savoie y col., 2007). En ambos casos, la inclusión de cepas seleccionadas de *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, entre otros, tiene principalmente dos finalidades. En primer lugar, se busca que los lactobacilos, aislados a partir de queso, y que exhiban propiedades tecnológicas deseables, mejoren los estándares de calidad de los productos. La estrategia consiste en que el adjunto incremente el control de la microflora adventicia, y contribuya positivamente a los eventos bioquímicos que tienen lugar durante la maduración (Crow y col., 2001, Di Cagno y col., 2003a). En segundo lugar, varias cepas de lactobacilos aisladas a partir de matrices alimentarias tradicionales, evidenciaron propiedades probióticas (Lei y Jakobsen, 2004; Pedersen y col., 2004; Patrignani y col., 2006), y fueron luego propuestas para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales (Gardiner y col., 1998; Bertazzoni-Minelli y col., 2004; Savoie y col., 2007). Otras cepas de lactobacilos probióticos pertenecientes a las mismas especies pero aisladas de hábitats diferentes, se han ensayado en quesos (Bergamini y col., 2006a; Ong y col., 2007).

Los cultivos de lactobacilos probióticos y adjuntos consisten, en general, en cepas aisladas a partir de diferentes hábitats (intestino versus matrices alimentarias) por lo que, *a priori*, se podría especular que tendrían un comportamiento diferente. Sin embargo, muchos de ellos pertenecen al mismo grupo: el grupo de *Lb. casei*, un grupo estrechamente relacionado desde el punto de vista taxonómico, está compuesto por *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. zaeae*, dentro de los lactobacilos heterofermentantes facultativos (Desai y col., 2006). Tradicionalmente, se ha postulado que las cepas destinadas al consumo humano, deberían tener un origen humano (criterio de especificidad de especies). Sin embargo este criterio ha sido discutido recientemente, ya que las cepas presentes en los productos lácteos y quizás en el ganado, pueden ser fuente de algunas cepas en el ser humano. La importancia del origen puede radicar en la percepción del consumidor, dado que las personas pueden sentir rechazo frente a cepas que se aislaron de animales o heces (Reid, 2005). La obtención de cepas a partir de alimentos fermentados no presentaría este inconveniente.

Además, se observó que las bacterias exógenas (aisladas a partir de productos lácteos) y nativas (aisladas a partir de intestino de ratón), presentaron habilidades semejantes para activar

la respuesta inmune a nivel intestinal (Vinderola y col., 2004). En este contexto, la diversidad de las poblaciones de cepas de origen lácteo o intestinal ha sido estudiada sólo en forma separada (Berthier y col., 2001; Gueimonde y col., 2004; Sánchez y col., 2006). Podría ser entonces posible que muchas cepas aisladas a partir de la microflora láctica no perteneciente al fermento tengan un origen intestinal, lo que las convierte en potenciales candidatos para uso probiótico. En efecto, ambos tipos de cultivos presentan muchas características en común, y no es necesario que su rol en la tecnología de elaboración y en la bioquímica de la maduración del queso sea estudiado en forma separada. Tanto los cultivos adjuntos como los probióticos deben alcanzar y mantener altos recuentos en el queso, no deben ocasionar defectos, y, de ser posible, deben impactar positivamente en la calidad general del producto (Crow y col., 2001; Ross y col., 2002; Di Cagno y col., 2003a). Asimismo, mientras que algunas cepas de lactobacilos aisladas de queso han mostrado potencial como probióticos (Bude-Ugarte y col., 2006; Maragkoudakis y col., 2006; Bertazzoni-Minelli y col., 2007), existe escasa evidencia acerca de la contribución de lactobacilos probióticos comerciales a la maduración del queso (Darukaradhya y col., 2006; Ong y col., 2006; Bergamini, 2007; Ong y col., 2007).

Se ha alcanzado un razonable consenso acerca de la contribución de los lactobacilos probióticos y no fermento a la proteólisis en los quesos. Estos agentes participan en la degradación de la matriz proteica, principalmente a través de su potencial peptidolítico, incrementando la cantidad de péptidos pequeños y aminoácidos libres. Este impacto sobre la proteólisis ha sido principalmente demostrado por cambios en los perfiles de péptidos solubles y en la concentración de aminoácidos libres individuales (Di Cagno y col., 2003a; Poveda y col., 2003; Bergamini y col., 2006a; Ong y col., 2007). Sin embargo, también se ha verificado que algunas cepas no contribuyen significativamente a la peptidólisis (Poveda y col., 2004a; Mangia y col., 2008) o incluso pueden causar defectos al incrementar la formación de péptidos hidrofóbicos amargos (Lee y col., 1990; Antonsson y col., 2003).

Finalmente, recientemente se han presentado evidencias que indican que los lactobacilos mesófilos poseen enzimas claves para la formación del *flavor* a través del catabolismo de los aminoácidos (Kieronczyk y col., 2003; Thage y col., 2005).

En un estudio previo, llevado a cabo en nuestro laboratorio, se identificaron varias cepas de lactobacilos no fermento con potencial probiótico (resistencia a la digestión gastrointestinal simulada y ciertas características fisiológicas deseables) (Bude-Ugarte y col., 2006). En particular, un grupo de siete cepas que mostraron las características probióticas más prometedoras, fueron seleccionadas para estudios posteriores, luego de los cuales se

seleccionaron entre ellas cuatro cultivos, que presentaban además buenas propiedades tecnológicas: *Lb. plantarum* I91, *Lb. rhamnosus* I73 y I77, y *Lb. casei* I90 (Briggiler-Marcó y col., 2007).

En el presente estudio, se evaluó la contribución individual de *Lb. plantarum* I91, *Lb. rhamnosus* I73 y I77, y *Lb. casei* I90 a la proteólisis y perfil sensorial de quesos de pasta blanda y semi-dura elaborados a escala piloto.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cultivos

El fermento primario empleado en las elaboraciones consistió en un cultivo mixto liofilizado de *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina). Cuatro cepas de lactobacilos autóctonos, aisladas en nuestro instituto a partir de queso, se estudiaron en forma individual como cultivos adjuntos: *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90 (cepas de baja actividad acidificante o “lentas”) y *Lb. rhamnosus* I73 (cepa con elevada actividad acidificante o “rápida”). Como se mencionó anteriormente, estas cepas fueron seleccionadas en base a los resultados de los ensayos *in vitro*, en los que demostraron propiedades tecnológicas interesantes y potencialidad probiótica. (Bude-Ugarte y col., 2006; Briggiler-Marcó y col., 2007). La preparación de los fermentos adjuntos se realizó según la metodología detallada en el capítulo 2 (sección 2.1).

2.2. Diseño experimental y elaboraciones de quesos

Se realizaron dos experiencias de elaboraciones de queso, una para quesos de pasta blanda (Cremoso, C) y la otra para quesos de pasta semi-dura (Pategrás, P). En cada experiencia se elaboraron cinco tipos de quesos: un queso control (CC y PC) y cuatro quesos experimentales con el agregado de *Lb. plantarum* I91 (quesos CLb91 y PLb91), *Lb. casei* I90 (quesos CLb90 y PLb90), *Lb. rhamnosus* I77 (quesos CLb77 y PLb77), y *Lb. rhamnosus* I73 (quesos CLb73 y PLb73). Para cada experiencia, se elaboraron dos réplicas de cada tipo de queso en días de fabricación diferentes. Las elaboraciones se distribuyeron al azar en un único bloque.

Los quesos Cremoso y Pategrás se elaboraron a escala piloto, según la tecnología estándar, modificada únicamente por la adición del cultivo adjunto de lactobacilos. La leche cruda utilizada en las elaboraciones de ambas variedades de queso fue suministrada por Milkaut S.A (Franck, Santa Fe, Argentina). Luego de la pasteurización (65°C - 20 min), la leche se enfrió a

37°C y se le adicionó cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Germany) hasta lograr una concentración final de 0,02% (p/v). La leche se dividió en cuatro alícuotas de 40 L que se colocaron en las tinas queseras; dos tinas fueron utilizadas para quesos Cremoso, y las otras dos para quesos Pategrás. Antes de su adición a la leche, el fermento primario se dispersó en 100 ml de leche pasteurizada y se incubó a 37°C durante 5 - 10 min. Los fermentos adjuntos se adicionaron a las tinas de los quesos experimentales conjuntamente con el fermento primario. Ambos fermentos lácticos (primarios y adjuntos) se agregaron a la leche en una concentración lo suficientemente alta para alcanzar recuentos de 10^6 UFC/ml, lo cual se determinó previamente mediante recuentos en placa del fermento primario liofilizado y del cultivo *overnight* de cada una de las cepas de lactobacilos ensayadas. Pasados 15 min desde la adición de los cultivos, 1 g de quimosina activa – producida por fermentación de *Kluyveromyces lactis* genéticamente modificada – (Maxiren 150, Gist Brocades, Francia) se dispersó en 25 ml de agua destilada y se agregó a cada tina.

En los quesos Cremoso la coagulación se llevó a cabo a 37°C. Cuando el coágulo alcanzó una consistencia adecuada, se cortó en cubos grandes, de aproximadamente 2 cm³. 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 mediante el empleo de una bomba y la cuajada se colocó en los moldes, los que fueron incubados en cámara caliente (40°C) hasta que la cuajada alcanzase en 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; una baja temperatura es requerida para frenar la actividad acidificante del fermento primario. Se obtuvieron quesos de ~ 4 Kg, los que se envasaron al vacío y se maduraron a 5°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) durante 60 días (Hynes y col., 2001b).

En lo que respecta al queso Pategrás, la etapa de coagulación se llevó a cabo a una temperatura algo menor: 35°C. Cuando la cuajada alcanzó la firmeza apropiada se cortó en etapas sucesivas (con agitación manual entre cada etapa) hasta lograr un tamaño semejante al del grano de arroz, manteniendo la temperatura en ~ 35°C. La etapa de lirado y agitación demandó aproximadamente 20 min. Luego, la mezcla de suero y partículas de cuajada se agitó suavemente y la temperatura se incrementó a una velocidad de 0,5°C/min hasta alcanzar los 45°C, que se mantuvieron durante ~ 10 – 15 min, a fin de reducir el contenido de humedad de la cuajada. Pasado este tiempo, la cuajada se separó del suero y se colocó en los moldes, que fueron apilados y prensados durante 24 h (0,2 – 0,3 Kg cm²). Los quesos de ~ 4 Kg se

salaron en salmuera (20%, p/v, pH 5,4, 12°C) durante 24 h, y se maduraron por un periodo de 60 días a 12°C y 80% de humedad relativa (Bergamini y col., 2006a).

La regulación argentina establece que las variedades de queso Cremoso y Pategrás se maduren por un periodo mínimo de 30 días (para quesos de 2,5 a 5 Kg) y de 45 días (para quesos de 1 a 5 Kg), respectivamente (Código Alimentario Argentino, ANMAT, 2008). En el presente trabajo, ambas variedades de queso se maduraron por un periodo de 60 días, para facilitar la detección de cualquier actividad bioquímica causada por los lactobacilos adjuntos.

2.3. Análisis de los quesos

El contenido de humedad, materia grasa y proteínas totales de los quesos se determinó a los 7 días de maduración, mediante la aplicación de los métodos normalizados (FIL-IDF, 1982:4A; FIL, 1997:152A; FIL-IDF, 1993:20B, respectivamente) descritos en el capítulo 1. El pH se registró en los quesos Cremoso durante la etapa de incubación en cámara caliente, y en todos los quesos pertenecientes a ambas variedades, luego de 7, 30 y 60 días de maduración.

Los recuentos de estreptococos y de lactobacilos (adventicios en quesos controles y adjuntos en quesos experimentales) se llevaron a cabo al comienzo de la maduración (día 0) y luego de 7, 15, 30, 45 y 60 días, en APC-leche y Agar MRS, por incubación durante 48 h a 37°C y 34° C, respectivamente (Bude Ugarte y col., 2006). En la sección 2.1.5 del capítulo 1, se describe la técnica para el análisis microbiológico.

El estudio de la proteólisis se realizó en muestras de queso de 7, 30 y 60 días, mediante fraccionamiento nitrogenado, electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción insoluble del queso a pH 4,6, y RP-HPLC de los perfiles peptídicos obtenidos a partir de la fracción de queso soluble en agua, utilizando las metodologías y los equipamientos mencionados en el capítulo 1.

2.3.1. Modificación del análisis de aminoácidos libres

La proteólisis secundaria también se evaluó a los 7 y 60 días, a través de la cuantificación de los aminoácidos libres (AAL) totales e individuales por RP-HPLC, empleando la fracción de queso soluble en agua. Las condiciones de ensayo y el equipamiento empleado para este análisis fueron los mismos que se utilizaron en quesos miniatura (capítulo 2, sección 2.3). El volumen de fracción soluble en agua utilizado para la determinación de AAL, varió entre 430 a 980 µl, dependiendo del tipo de queso y del tiempo de maduración. Cuando se empleó una

alícuota menor a 980 μl , se adicionó agua bidestilada hasta completar un volumen final de 1000 μl . De este modo, la concentración del estándar interno en todas las muestras fue de 50 μM .

2.3.2. Análisis sensorial

Las características sensoriales de todos los quesos, elaborados con y sin lactobacilos adjuntos, fueron evaluadas por un panel de ocho integrantes entrenado para el análisis sensorial de quesos Cremoso y Pategrás. Para la selección del panel y en las etapas de entrenamiento, se utilizaron como referencia quesos de las mismas variedades, obtenidas en el mercado. El análisis sensorial de los quesos Pategrás se llevó a cabo al finalizar el periodo de maduración (60 días), mientras que el de los quesos Cremoso se realizó a los 45 días, dado los mismos presentaron una textura demasiado blanda a los 60 días.

Las muestras se rotularon con números de tres cifras seleccionados al azar, y se presentaron a los miembros del panel en ensayos individuales, a fin de minimizar los efectos de arrastre (McBride y Muir, 1999). Los análisis sensoriales se realizaron en una sala de ensayos sensoriales, construida y ambientada según las exigencias de la determinación. Los atributos de aroma y sabor estudiados fueron definidos por consenso por los miembros del panel, en una mesa redonda dirigida por un coordinador. Las características organolépticas de los productos se evaluaron mediante un análisis descriptivo cuantitativo (Candioti y col., 2002). Cada atributo se cuantificó por asignación de un puntaje en una escala no estructurada de 10 cm anclada en los extremos (1 = ausente o débil, 9 = elevado o muy intenso). Los atributos sensoriales evaluados en el presente trabajo fueron: intensidad de aroma, color, textura visual, elasticidad, friabilidad, cohesividad, plasticidad, sabor ácido, picante, a crema y sabor residual. Los análisis se realizaron por duplicado, con un intervalo de tiempo entre ambas sesiones de 20 min.

2.4. Análisis estadístico

Los datos de composición química, pH, contenido de nitrógeno en cada fracción soluble, recuentos microbiológicos y aminoácidos libres individuales, se analizaron mediante ANOVA de una vía, y se aplicó el test LSD para la comparación de medias, cuando se encontraron diferencias significativas. Los perfiles peptídicos se analizaron mediante el análisis por componentes principales (ACP), utilizando área de los picos como variables de ingreso para el análisis estadístico. Las variables se estandarizaron a media cero, pero conservaron su

variancia original (matriz de covariancia) (Pripp y col., 2000b). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos).

3. Resultados y Discusión

3.1. Composición global y pH

La evolución del pH durante la elaboración de los quesos Cremoso fue similar en los controles y experimentales con agregado de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91. Por el contrario, los quesos inoculados con las cepas de *Lb. rhamnosus* mostraron un incremento en la velocidad de acidificación durante la etapa de incubación en cámara caliente, respecto a los quesos no tratados (Figura 3.1). Resultados similares fueron reportados por Lee y col. (1990), quienes observaron una mayor acidificación durante la etapa de elaboración, en quesos Cheddar inoculados con cepas de *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* (actualmente *Lb. rhamnosus*). Asimismo, otros investigadores detectaron una elevada actividad acidificante en cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* (Lee y col., 1990; Gomez y col., 1996; Menéndez y col., 2000; Herreros y col., 2007), lo que no fue observado para las cepas pertenecientes a las mismas especies ensayadas en el presente trabajo.

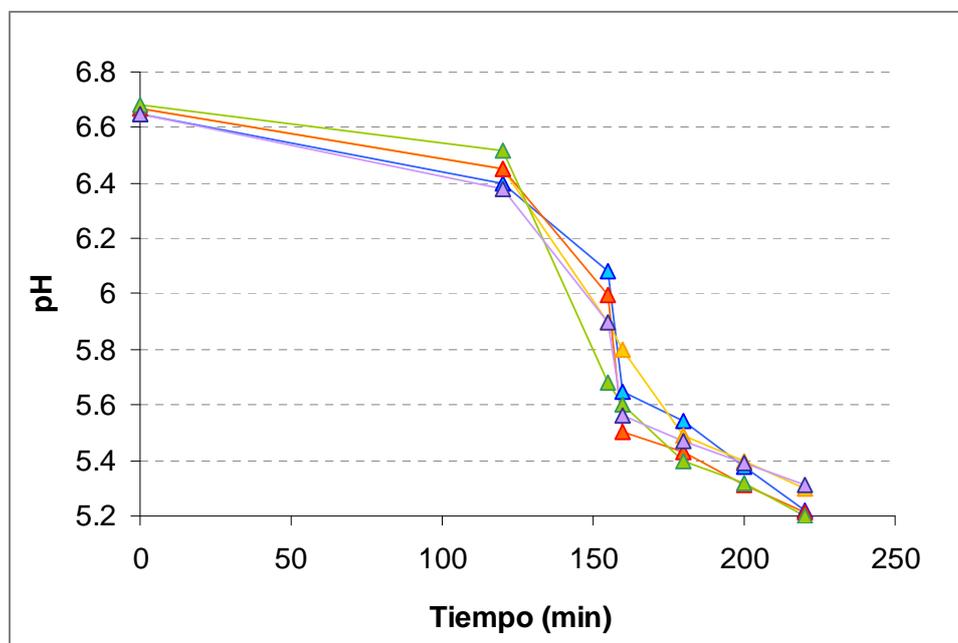


Figura 3.1. Curva de acidificación de los quesos Cremoso durante la elaboración. Símbolos: ▲ = quesos controles, ▲ = quesos con *Lb. casei* I90, ▲ = quesos con *Lb. plantarum* I91, ▲ = quesos con *Lb. rhamnosus* I73, ▲ = quesos con *Lb. rhamnosus* I77.

Los datos de composición global y pH de los quesos Cremoso y Pategrás elaborados con y sin cultivos adjuntos de lactobacilos se muestran en la Tabla 3.1.

Los quesos Cremoso elaborados con *Lb. rhamnosus* I73 y *Lb. rhamnosus* I77 presentaron un contenido de humedad significativamente menor ($P \leq 0,05$) que el resto de los quesos, lo que probablemente sea consecuencia de un incremento en la sinéresis (liberación de suero a partir de la cuajada) causada por la sobreacidificación verificada en estas muestras, en forma similar a lo observado por Herreros y col. (2007). Asimismo, los quesos elaborados con las cepas de *Lb. rhamnosus* exhibieron valores de pH significativamente inferiores ($P \leq 0,05$) a los de los controles luego de 60 días, lo que indica una mayor post acidificación durante la maduración en los quesos inoculados con estos adjuntos. Las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 no contribuyeron a la producción de ácido láctico durante la elaboración de los quesos Cremoso, y en consecuencia, no se evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la composición global entre quesos con y sin adjunto.

Con respecto a los quesos Pategrás, sólo aquellos elaborados con *Lb. rhamnosus* I77 mostraron un valor de pH significativamente menor ($P \leq 0,05$) al final del periodo de maduración; sin embargo no se detectaron diferencias ($P > 0,05$) en la composición global para ninguna de las muestras de queso.

Desde el punto de vista tecnológico, las dos cepas de *Lb. rhamnosus* ensayadas no demostraron un desempeño adecuado como cultivos adjuntos, especialmente en quesos de pasta blanda. Estos cultivos contribuyeron a la producción de ácido láctico durante la elaboración, lo que resultó en una disminución del pH y del contenido de humedad en los productos finales. El fenómeno de sobreacidificación no resultó sorprendente en los quesos elaborados con *Lb. rhamnosus* I73, caracterizado como cepa rápida, pero fue inesperado en los quesos con *Lb. rhamnosus* I77, clasificada como cepa lenta de acuerdo a su habilidad para crecer en leche (Briggiler-Marcó y col., 2007).

Tabla 3.1. Composición global a los 7 días y pH durante la maduración de los quesos Cremoso (C) y Pategrás (P), controles (C) y con lactobacilos agregados: Lb73, Lb77, Lb90 y Lb91, quesos con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente.

Tipos de Quesos					
	CC	CLb73	CLb77	CLb90	CLb91
Humedad (%)	52,12 ± 0,92 ^a	49,75 ± 0,90 ^b	49,9 ± 1,05 ^b	53,76 ± 1,93 ^a	52,44 ± 1,35 ^a
Proteínas (%)	18,34 ± 0,65	19,35 ± 1,09	18,98 ± 0,45	18,54 ± 0,32	19,18 ± 0,70
Grasa (%)	23,70 ± 2,10	24,80 ± 1,96	25,14 ± 3,20	23,70 ± 1,82	24,18 ± 2,05
	PC	PLb73	PLb77	PLb90	PLb91
Humedad (%)	40,77 ± 1,12	41,55 ± 1,39	41,47 ± 0,89	40,63 ± 1,35	41,35 ± 0,80
Proteínas (%)	23,32 ± 0,50	23,31 ± 1,08	23,53 ± 0,61	23,69 ± 1,14	22,97 ± 0,49
Grasa (%)	31,60 ± 2,23	29,7 ± 2,02	32,32 ± 3,24	31,00 ± 1,14	30,86 ± 2,02
pH					
Tiempo de maduración	CC	CLb73	CLb77	CLb90	CLb91
7	5,10 ± 0,10	5,20 ± 0,14	5,15 ± 0,08	5,08 ± 0,16	5,13 ± 0,07
30	5,20 ± 0,12	5,05 ± 0,10	5,05 ± 0,17	5,10 ± 0,09	5,15 ± 0,06
60	5,18 ± 0,10 ^a	4,90 ± 0,06 ^b	4,90 ± 0,09 ^b	5,02 ± 0,16 ^{ab}	5,10 ± 0,07 ^a
	PC	PLbI73	PLbI77	PLb90	PLbI91
7	5,20 ± 0,07	5,18 ± 0,18	5,10 ± 0,10	5,20 ± 0,04	5,05 ± 0,08
30	5,15 ± 0,14	5,20 ± 0,14	5,08 ± 0,06	5,00 ± 0,10	4,98 ± 0,18
60	5,10 ± 0,15 ^a	5,08 ± 0,10 ^a	4,90 ± 0,06 ^b	5,13 ± 0,80 ^a	5,08 ± 0,13 ^a

Valores en una misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($P \leq 0,05$).

Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

3.2. Recuentos microbiológicos

En las Figuras 3.2A y 3.2B se presentan los resultados de los recuentos de estreptococos y lactobacilos en quesos Cremoso y Pategrás, respectivamente, al comienzo de la maduración y luego de 7, 15, 30, 45 y 60 días.

En los quesos Cremoso elaborados con o sin adjuntos de lactobacilos, el recuento de estreptococos al finalizar la etapa de elaboración fue de 10^8 UFC/g, luego aumentó

aproximadamente 1 orden log, y finalmente se mantuvo constante en valores de $\sim 10^9$ UFC/g durante el curso de la maduración. Un patrón semejante de desarrollo fue observado por Bude-Ugarte y col. (2006) en quesos Cremoso del mercado. La evolución del fermento primario en los quesos controles y experimentales tipo Pategrás, fue similar a la observada para queso Cremoso. En ambas variedades, la población del fermento primario alcanzó niveles similares en quesos controles y con agregado de cultivo adjunto, lo que indicó que las cepas de *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90, *Lb. rhamnosus* I73 y *Lb. rhamnosus* I77 ensayadas, no interfirieron en el crecimiento y supervivencia del fermento acidificante (*S. thermophilus*). Bergamini y col. (2006a) elaboraron quesos Pategrás con la adición de cultivos probióticos comerciales, e informaron que la población del fermento primario permaneció en niveles de 10^9 UFC/g a lo largo de la maduración, y que sus recuentos no fueron afectados por la presencia de los lactobacilos ensayados.

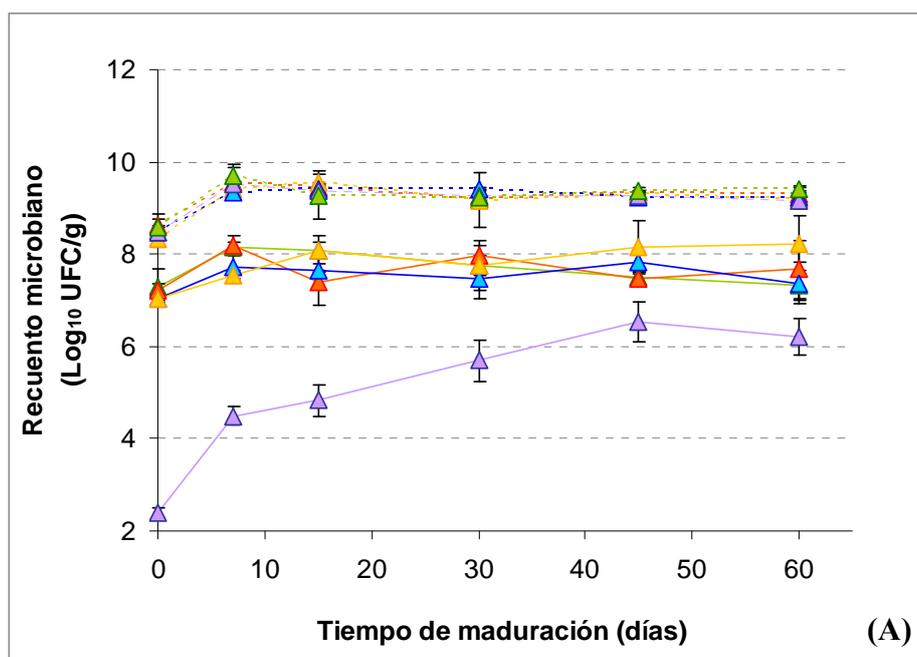
En los quesos Cremoso, todas las cepas de lactobacilos estudiadas presentaron un patrón de crecimiento similar; los recuentos de los adjuntos se incrementaron en ~ 1 orden log durante la etapa de elaboración (desde 10^6 UFC/ml hasta 10^7 UFC/g), y luego, durante la maduración, permanecieron en valores de $10^7 - 10^8$ UFC/g. Con respecto a los quesos Pategrás, todos los cultivos adjuntos de lactobacilos estudiados crecieron rápidamente desde 10^7 UFC/g en la cuajada, hasta $10^8 - 10^9$ UFC/g en los quesos de 7 días de maduración. Durante la primera semana de maduración, los recuentos de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 se incrementaron en 1 y 2 órdenes log, respectivamente; las cepas de *Lb. rhamnosus* presentaron recuentos comprendidos entre 10^8 y 10^9 UFC/g a los 7 días. A los 15 días, todas las cepas ensayadas exhibieron recuentos del orden de 10^9 UFC/g, y luego se mantuvieron aproximadamente constantes en esos niveles elevados, hacia el final del periodo de maduración. En algunos casos, los recuentos de lactobacilos igualaron a los de la población del fermento primario luego de 15 ó 30 días de maduración.

El recuento de las bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB) en los quesos controles tipo Cremoso aumentó gradualmente durante la maduración, alcanzando valores de 10^6 UFC/g luego de 60 días. Por el contrario, en los quesos Pategrás elaborados sin adjuntos de lactobacilos, las NSLAB crecieron desde recuentos bajos ($\sim 10^3$ UFC/g) hasta $\sim 10^6$ UFC/g durante la primera semana de maduración, y luego alcanzaron valores de 10^8 UFC/g en quesos de 15 días. Bude-Ugarte y col. (2006) detectaron niveles similares de lactobacilos adventicios en quesos Pategrás del mercado: el recuento de NSLAB en quesos de 10 días fue de 10^7 UFC/g, luego se incrementó a 10^8 UFC/g y finalmente se mantuvo constante hasta el final de la maduración (60 días). Por el contrario, en ese mismo trabajo, los quesos blandos

elaborados a escala industrial exhibieron niveles algo mayores de lactobacilos adventicios (2 ciclos log de diferencia) que los detectados en el presente trabajo (Bude-Ugarte y col., 2006).

Se ha establecido que la concentración mínima de bacterias probióticas en el alimento debe ser de 10^7 UFC/g o ml al momento de la ingesta, para asegurar un impacto favorable en la salud de los consumidores (De Vuyst, 2000). En nuestro estudio, todas las cepas de lactobacilos estudiadas mostraron un crecimiento y adaptación adecuados en los quesos Cremoso y Pategrás, en los que se mantuvieron viables y en niveles elevados (10^7 a 10^9 UFC/g) durante todo el periodo de maduración. Estos resultados no sólo demuestran que las cepas de lactobacilos ensayadas reúnen los requisitos establecidos para alcanzar los estándares de un alimento probiótico, sino también que los quesos Cremoso y Pategrás pueden considerarse vehículos apropiados para el suministro de estas bacterias potencialmente probióticas a través de la dieta.

En los quesos Cremoso, los recuentos de lactobacilos adjuntos (en los quesos experimentales) y de lactobacilos adventicios (en los quesos controles) fueron 1 y 3 ciclos log menores, respectivamente, que en los quesos Pategrás. Este hecho podría estar relacionado a las diferencias en la temperatura de maduración de ambas variedades de quesos (5°C y 12°C para los quesos Cremoso y Pategrás, respectivamente). Se ha demostrado que la disminución de la temperatura de maduración conduce a una disminución de la velocidad de crecimiento y recuento final de los lactobacilos adventicios (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000b).



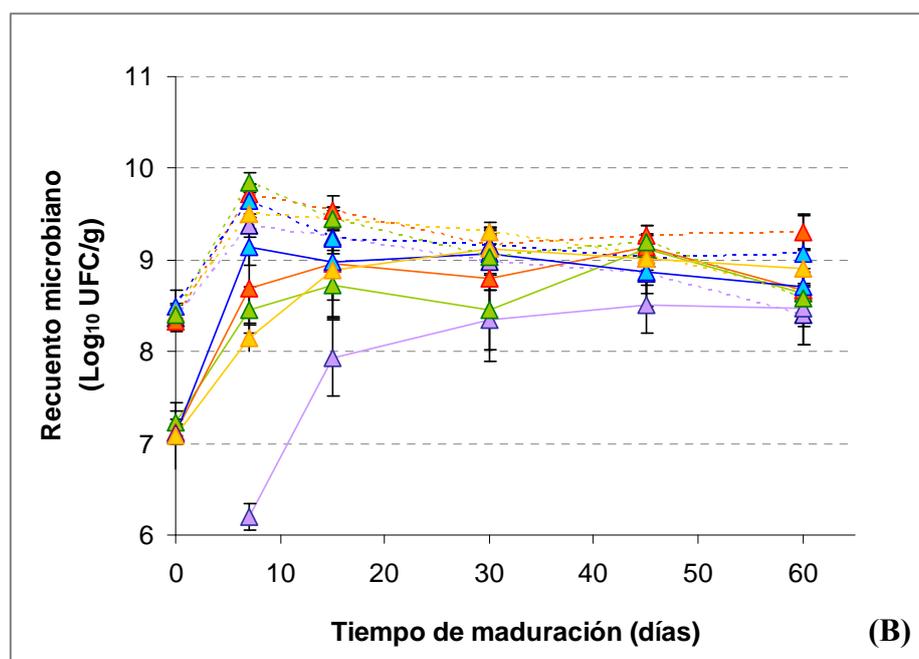


Figura 3.2. Evolución del fermento primario (líneas de puntos) y de los lactobacilos (líneas continuas) en los quesos Cremoso (A) y Pategrás (B) durante la maduración. Símbolos: ▲ = quesos controles, ▲ = quesos con *Lb. casei* I90, ▲ = quesos con *Lb. plantarum* I91, ▲ = quesos con *Lb. rhamnosus* I73, ▲ = quesos con *Lb. rhamnosus* I77. Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

3.3. Electroforesis y fraccionamiento nitrogenado

Los patrones electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos Cremoso y Pategrás de 7, 30 y 60 días de maduración, se presentan en las Figuras 3.3 (A y B) y 3.4 (A y B), respectivamente. En ambas variedades de queso, la proteólisis primaria se caracterizó fundamentalmente por una hidrólisis progresiva y extensa de la α_{s1} -caseína, con la consecuente formación del péptido CN- α_{s1} (f24-199) o α_{s1} -I-caseína. En los quesos Cremoso, la adición de los lactobacilos adjuntos ensayados no contribuyó a la degradación de las fracciones caseínicas durante la maduración, dado que la comparación visual de los patrones electroforéticos de quesos controles y experimentales no reveló diferencias en el tamaño e intensidad de las distintas bandas (Figura 3.3A y 3.3B).

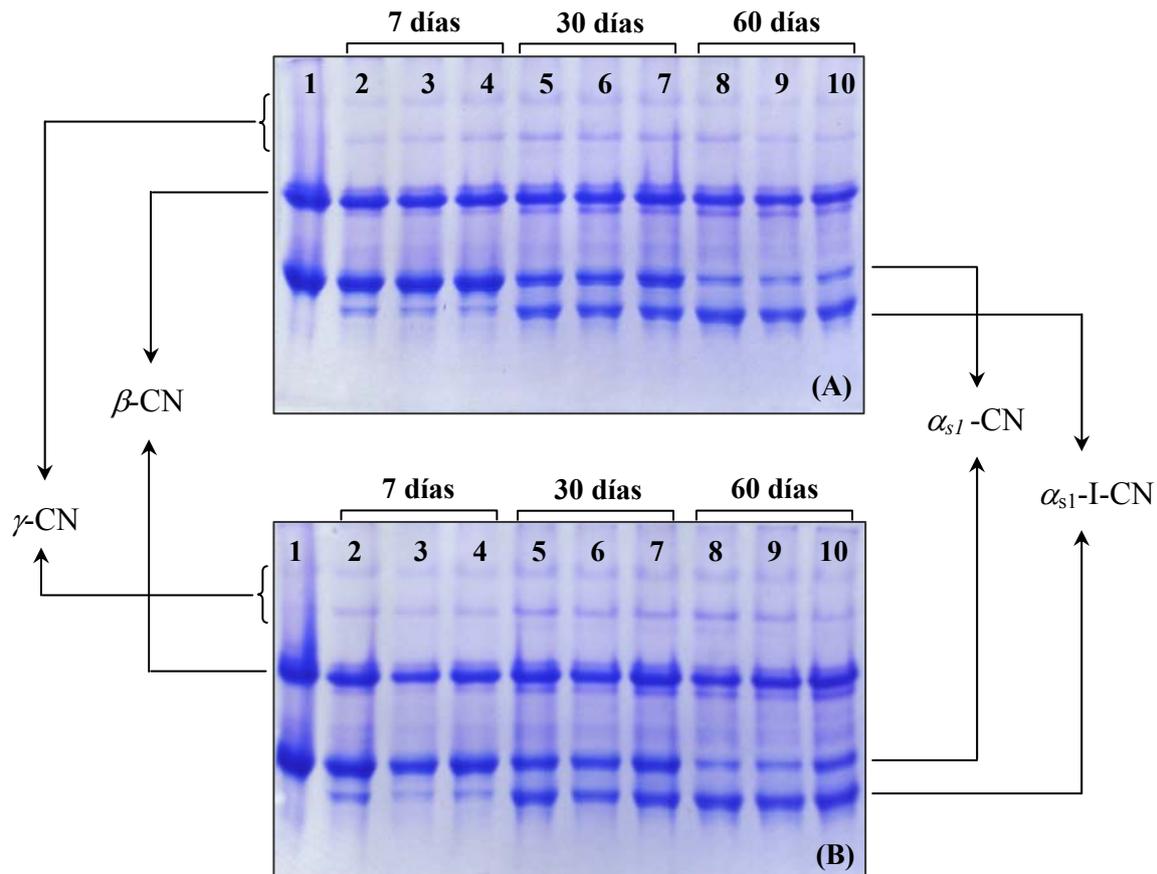


Figura 3.3. Perfiles electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos Cremoso, a los 7, 30 y 60 días de maduración. Quesos controles (líneas 2, 5 y 8 en gel A) y con fermentos adjuntos de *Lb. plantarum* I91 (líneas 3, 6 y 9 en gel A) y *Lb. casei* I90 (líneas 4, 7 y 10 en gel A); y quesos controles (líneas 2, 5 y 8 en gel B) y con fermentos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I77 (líneas 3, 6 y 9 en gel B) y *Lb. rhamnosus* I73 (líneas 4, 7 y 10 en gel B). Línea 1: caseinato patrón en ambos gels.

En los quesos Pategrás, por el contrario, se detectaron diferencias en la proteólisis primaria entre quesos elaborados con y sin lactobacilos adjuntos, las que fueron evidenciadas a partir del primer mes de maduración (Figura 3.4A y 3.4B). En efecto, los quesos controles se caracterizaron por presentar una mayor degradación de la α_{s1} -caseína, lo que se evidenció por una disminución en la intensidad de dicha banda, y por un incremento en la intensidad de la banda correspondiente a su producto de degradación, el péptido CN- α_{s1} (f24-199).

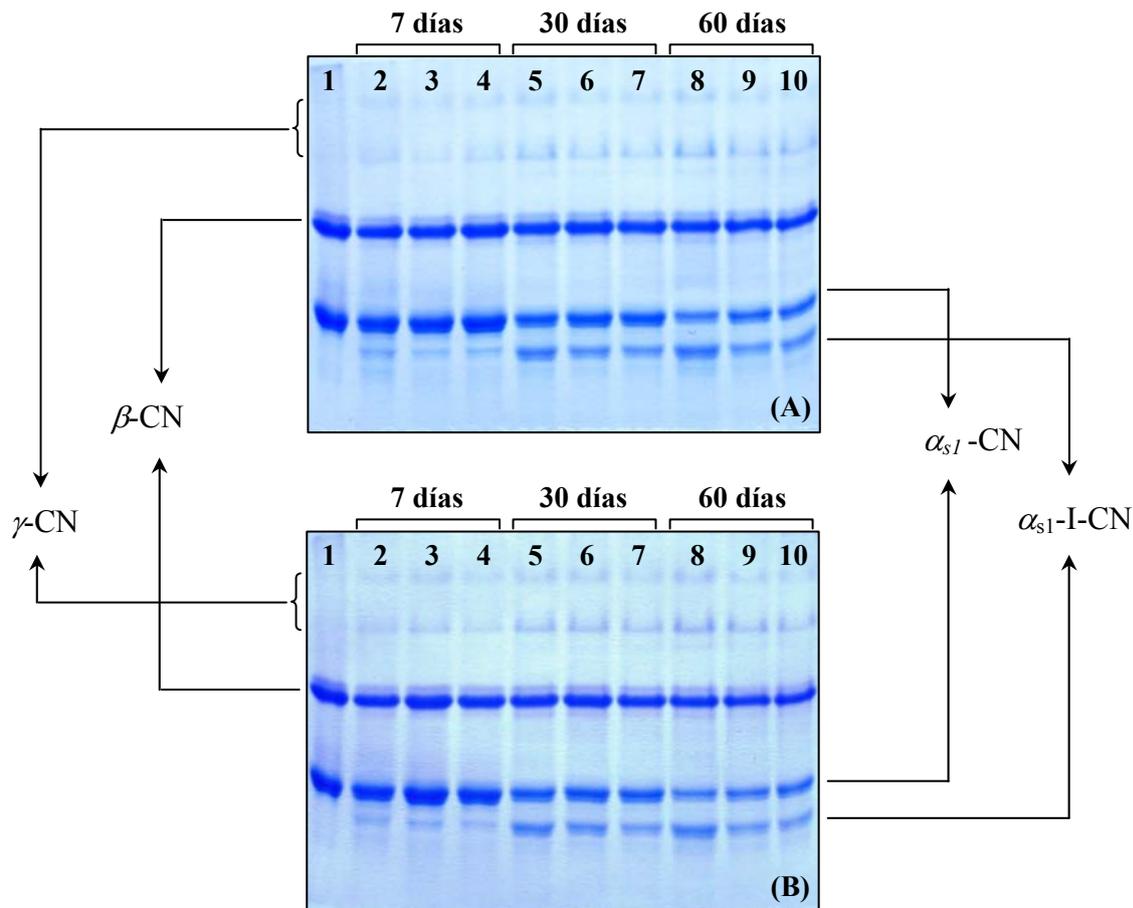


Figura 3.4. Perfiles electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos Pategrás, a los 7, 30 y 60 días de maduración. Quesos controles (líneas 2, 5 y 8 en gel A) y con fermentos adjuntos de *Lb. plantarum* I91 (líneas 3, 6 y 9 en gel A) y *Lb. casei* I90 (líneas 4, 7 y 10 en gel A); y quesos controles (líneas 2, 5 y 8 en gel B) y con fermentos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I77 (líneas 3, 6 y 9 en gel B) y *Lb. rhamnosus* I73 (líneas 4, 7 y 10 en gel B). Línea 1: caseinato patrón en ambos geles.

Los niveles de nitrógeno en las distintas fracciones solubles correspondientes a los quesos Cremoso y Pategrás, luego de 7, 30 y 60 días de maduración, se muestran en las Figuras 3.5A y 3.5B, respectivamente. Todas las fracciones solubles, con excepción del NS-PTA, mostraron un incremento con el tiempo de maduración en todos los tipos de quesos analizados.

Los quesos Cremoso elaborados con y sin adjuntos de lactobacilos no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los niveles de NS a pH 4,6 (Figura 3.5A); en los quesos controles tipo Pategrás por el contrario, esta fracción fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$), en comparación con los quesos experimentales (Figura 3.5B).

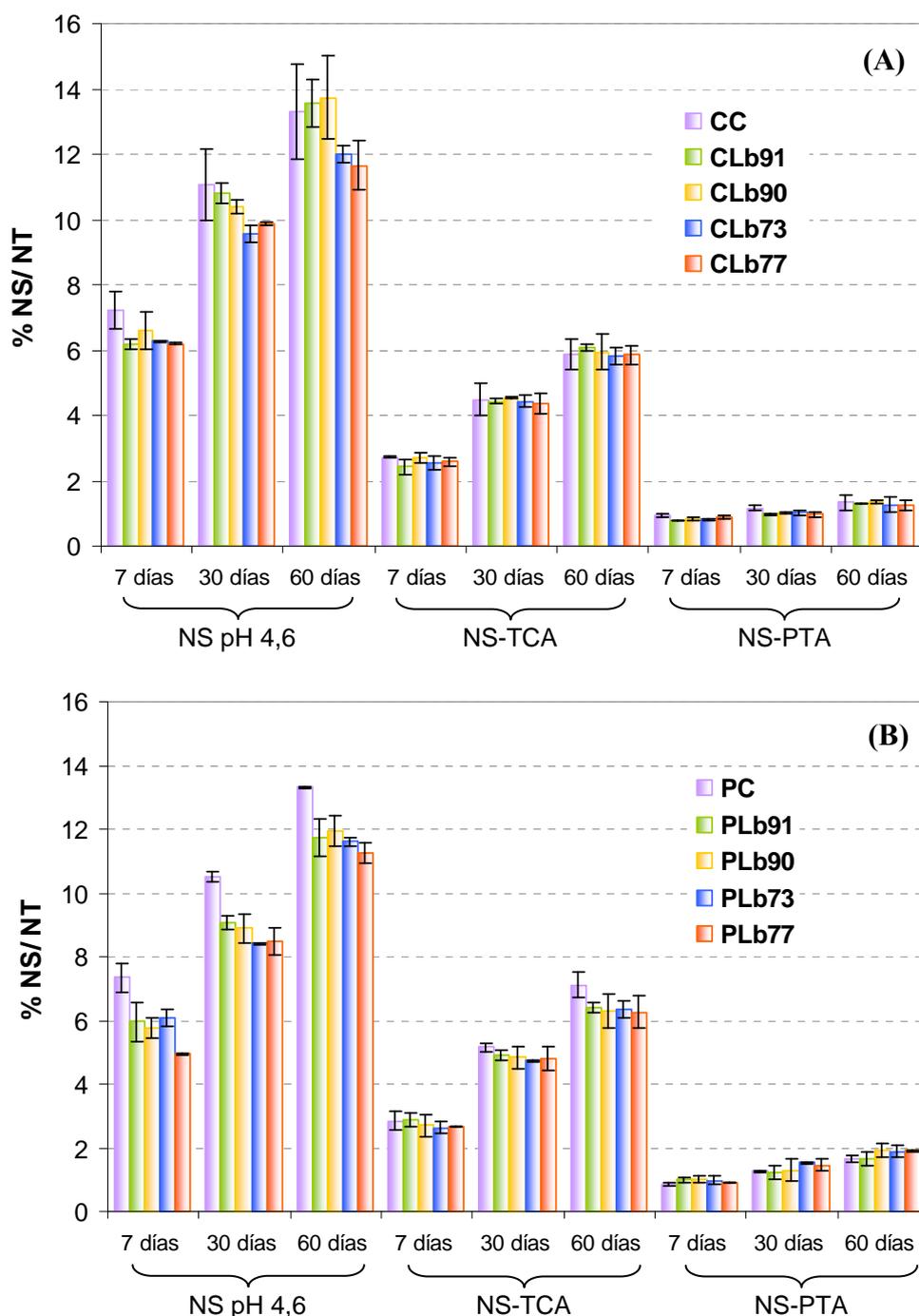


Figura 3.5. Fracciones nitrogenadas en quesos Cremoso (A) y Pategrás (B) luego de 7, 30 y 60 días de maduración. NS-pH 4,6: nitrógeno soluble a pH 4,6, NS-TCA: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (p/v), y NS-PTA: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 2,5% (p/v). CC y PC quesos controles Cremoso y Pategrás, respectivamente. CLb73, CLb77, CLb90 y CLb91, quesos Cremoso elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente. PLb73, PLb77, PLb90 y PLb91, quesos Pategrás elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente. Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

Los resultados de la electroforesis son coincidentes con los de la fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 de los quesos, que representa otro indicador de proteólisis primaria. Sólo unos pocos investigadores han detectado una inhibición parcial de la proteólisis primaria, asociada a la adición de lactobacilos como adjuntos en elaboraciones de queso. Gomez y col. (1996) reportaron que los quesos de pasta semi-dura elaborados con un adjunto de *Lb. plantarum*, presentaron un menor contenido de NS a pH 4,6 y una notable inhibición de la hidrólisis de las α_{s1} - y β -caseínas, en comparación con los controles no inoculados. Los autores atribuyeron este fenómeno a la inhibición de la actividad de la plasmina, como consecuencia de la mayor acidificación observada en los quesos con agregado de la cepa de *Lb. plantarum* ensayada. Sin embargo, un estudio desarrollado por Menéndez y col. (2000) arrojó resultados contradictorios a los reportados por Gomez y col. (1996). En efecto, Menéndez y col. (2000) detectaron un mayor contenido de NS a pH 4,6 y una aceleración de la degradación de la α_{s1} -caseína, en quesos elaborados con adjuntos de lactobacilos, en los que también se observó un mayor nivel de acidificación, respecto a los quesos no inoculados. Los investigadores postularon que el incremento de la proteólisis primaria detectada en los quesos con agregado de fermento adjunto, fue consecuencia de la mayor acidificación verificada en los mismos durante la elaboración, que resultó en una mayor retención de la enzima coagulante en la cuajada. En nuestro trabajo, el incremento de la proteólisis primaria detectada en los quesos controles tipo Pategrás, probablemente se deba a pequeñas diferencias en las elaboraciones de queso, que pueden conducir a cambios en la actividad y retención de la enzima coagulante. Como se mencionó en otra oportunidad, la enzima coagulante residual cataliza la hidrólisis de la α_{s1} -caseína, con la producción del péptido α_{s1} -I-caseína, un evento bioquímico que también tiene un impacto importante sobre los niveles de NS a pH 4,6 (Hynes y col., 2001b; O'Mahony y col., 2005; Hesari y col., 2006). Hynes y col. (2004) informaron que pequeñas variaciones en la tecnología de elaboración, tales como, velocidad de cocción, humedad de los granos de cuajada, y velocidad de disminución del pH, pueden conducir a diferencias en la retención y actividad de la enzima coagulante. Por otra parte, es poco probable que las diferencias observadas estén relacionadas con la actividad proteolítica del fermento primario o de las NSLAB en los quesos controles, ya que dichas bacterias lácticas por lo general, presentan una baja actividad hidrolítica sobre las caseínas intactas, y no influyen en los niveles de NS a pH 4,6 (Crow y col., 2001).

Todos los quesos Cremoso exhibieron niveles similares de proteólisis primaria, aún cuando los cambios en el contenido de humedad y pH debidos al uso de los cultivos adjuntos fueron más pronunciados que en los quesos Pategrás. Probablemente esto se deba a que la

actividad residual del coagulante en los quesos Cremoso – una variedad de queso blando de elevada humedad – tiende a ser siempre alta, aún para diferentes valores de pH en la etapa de incubación en cámara caliente (Aparo y col., 2004).

El contenido de nitrógeno en las fracciones solubles en TCA al 12% y en PTA al 2,5%, que representan a péptidos de tamaño intermedio, y a oligopéptidos y aminoácidos libres, respectivamente, no mostraron diferencias significativas entre quesos controles y experimentales, tanto en los quesos Cremoso, como en los quesos Pategrás (Figura 3.5A y 3.5B).

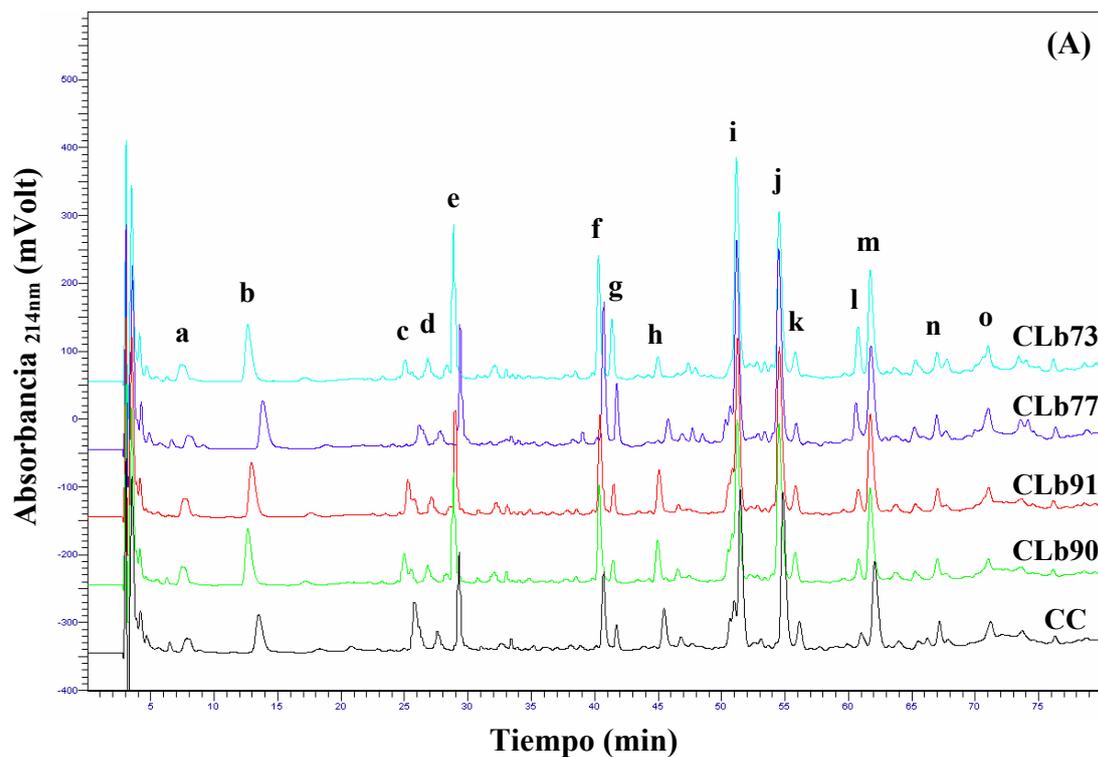
Finalmente, los resultados obtenidos en queso Cremoso son coincidentes con los reportados por otros investigadores (Lane y Fox, 1996; Lynch y col., 1996; Madkor y col., 2000; Poveda y col., 2003), y también con los detectados en el modelo de queso Cremoso miniatura desarrollado, donde la adición de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, no modificó los niveles de las distintas fracciones nitrogenadas, ni contribuyó a la degradación de las caseínas intactas (Milesi y col., 2008).

3.4. Perfiles peptídicos

En las Figuras 3.6A y 3.6B se presentan los perfiles peptídicos de los quesos Cremoso y Pategrás de 60 días, respectivamente, elaborados con y sin fermentos adjuntos. En cada experiencia, la comparación visual de los cromatogramas, reveló modificaciones importantes de los perfiles peptídicos con el tiempo de maduración en todos los tipos de quesos analizados. En ambas variedades de queso, las muestras de 7 días se caracterizaron por presentar cromatogramas muy simples, pero con el avance de la maduración, en general, se observó un incremento en el área de algunos picos, como así también, la presencia de nuevos péptidos. Asimismo, se detectaron diferencias cuantitativas entre los cromatogramas de quesos elaborados con y sin adjuntos de lactobacilos, tanto en quesos Cremoso como Pategrás, que fueron más evidentes hacia el final del periodo de maduración (60 días). Para cada variedad de queso, la comparación visual del conjunto de cromatogramas, tanto en base al tiempo de maduración como al tipo de queso (con o sin lactobacilos adjuntos), permitió la selección de quince picos, que se señalan en las Figuras 3.6A y 3.6B con caracteres. Algunos picos de los perfiles peptídicos de las muestras de queso Cremoso, fueron característicos de los quesos elaborados con las cepas de lactobacilos ensayadas. En efecto, los picos **b** y **h** predominaron en los quesos con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, mientras que los péptidos **e**, **f**, **g**, **i** y **l** fueron característicos de los quesos elaborados con las cepas de *Lb. rhamnosus*

(Figuras 3.6A). Por otra parte, en los perfiles de los quesos Pategrás, los picos *f*, *g*, *h*, *i*, *j*, *k*, *l*, *m*, *n* y *o*, fueron típicos de los controles; los últimos cuatro picos poseen alto tiempo de retención y probablemente se trate de péptidos hidrofóbicos y/o amargos (Coolbear y col., 2008). En los quesos con lactobacilos, por el contrario, predominaron los picos *a*, *b*, *c* y *e* (quesos con cepas de *Lb. rhamnosus*), y *h*, *i* y *k* (quesos con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90), que representan péptidos con menor tiempo de retención, y por lo tanto más hidrofílicos (Figura 3.6B).

Las áreas de los picos seleccionados fueron utilizadas como variables independientes en el ACP; los picos sin rótulo no fueron considerados en el análisis estadístico (Bergamini y col., 2006a).



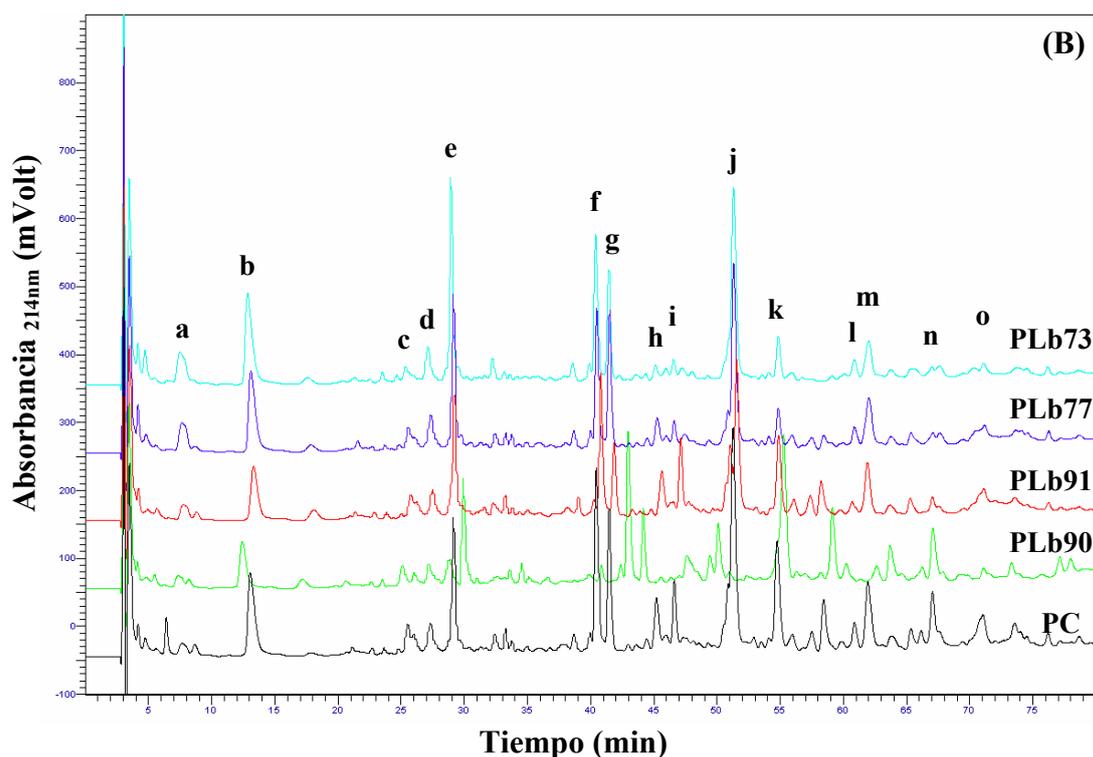
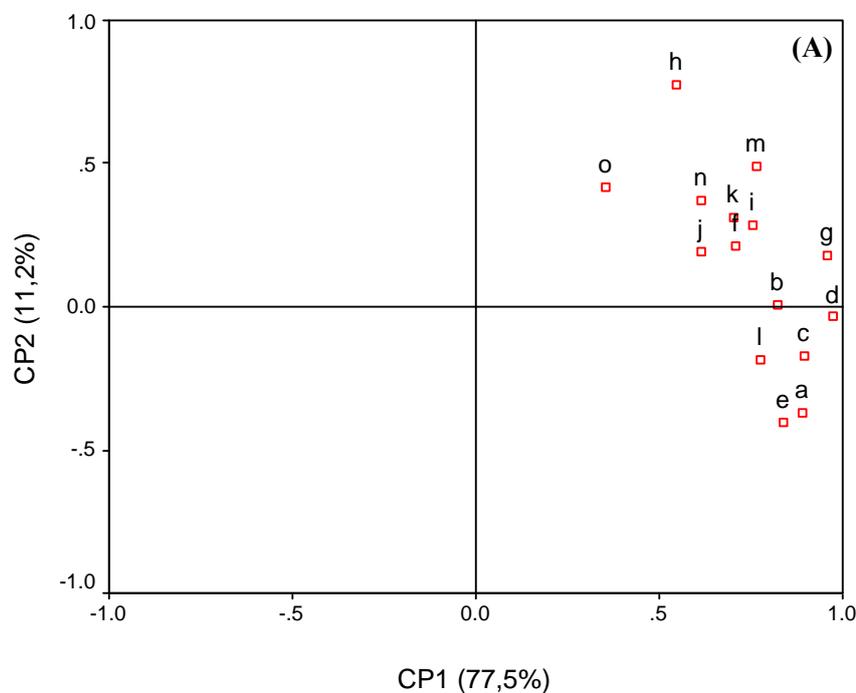


Figura 3.6. Perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4,6 de los quesos Cremoso (A) y Pategrás (B) de 60 días de maduración. CC y PC quesos controles Cremoso y Pategrás, respectivamente. CLb73, CLb77, CLb90 y CLb91, quesos Cremoso elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente. PLb73, PLb77, PLb90 y PLb91, quesos Pategrás elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente.

Luego del análisis estadístico de las muestras de queso Cremoso, se retuvieron dos componentes principales (CPs) que explicaron el 92,4% de la variabilidad total de los datos. El gráfico de los *loadings* (Figura 3.7A), reveló que todas las variables seleccionadas presentaron un elevado impacto sobre el eje CP1, mientras que, sólo las variables *e*, *b* y *n* mostraron una influencia notable sobre CP2. En la Figura 3.7B se presenta el gráfico de los *scores* de las muestras de 7, 30 y 60 días de maduración sobre los ejes CP1 vs. CP2. Las muestras de queso Cremoso se separaron de acuerdo al tiempo de maduración sobre el eje CP1, que explicó la mayor parte de la variabilidad de los datos (87,6%). A su vez, este gráfico reveló una gran variabilidad entre réplicas en base al día de elaboración, que fue particularmente más acentuada entre las muestras de queso Cremoso de 60 días de maduración. Pese a esto, hacia el final del periodo de maduración (60 días) se verificó una tendencia al agrupamiento de los quesos según el fermento utilizado: los controles tendieron a separarse de los quesos con *Lb. pantarum* I91 y *Lb. casei* I90, y a su vez, de los quesos con

cepas de *Lb. rhamnosus*; sin embargo, también se detectó una influencia del día de elaboración entre los quesos con lactobacilos (Figura 3.7B).

El ACP de los perfiles peptídicos de los quesos tipo Pategrás, permitió la selección de dos CPs, que explicaron el 88,7% de la variancia total de los datos. Todos los picos seleccionados, excepto el *o*, exhibieron una fuerte influencia sobre el eje CP1, mientras que las variables *a*, *e*, *h*, *m*, *n*, y *o*, mostraron un alto impacto sobre CP2 (Figura 3.8A). La distribución de las muestras sobre los ejes CP1 vs. CP2 se muestra en la Figura 3.8B. En forma similar a lo observado en la Figura 3.6B, las variables *a*, *b*, *c* y *e*, localizadas en el cuadrante definido por valores positivos de CP1 y negativos de CP2, predominaron en los quesos elaborados con las cepas de *Lb. rhamnosus*, mientras que las variables ubicadas en el cuadrante definido por valores positivos de CP1 y CP2 fueron características de los quesos controles. Las muestras se separaron por tiempo de maduración sobre el eje CP1, y de acuerdo al fermento adjunto agregado sobre el CP2; los quesos controles se separaron de los experimentales, y si bien se observó cierta tendencia a la separación entre cepas de lactobacilos, aquí también se verificó que el día de elaboración impactaba en la variación entre réplicas (Figura 3.8B).



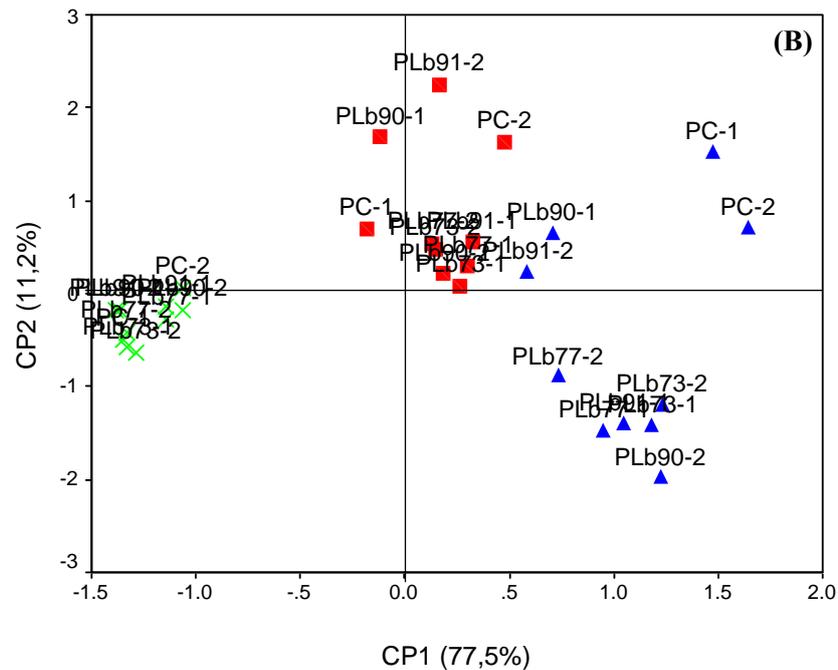


Figura 3.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC de las fracciones solubles a pH 4,6 de los quesos Pategrás. **A)** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B)** Gráfico de los *scores* de las muestras de 7 (×), 30 (■) y 60 (▲) días de maduración. PC: quesos controles, PLb73, PLb77, PLb90 y PLb91, quesos elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente. El número posterior al tipo de queso hace referencia a la réplica de elaboración.

En síntesis, todos los fermentos adjuntos estudiados modificaron los perfiles peptídicos respecto a los controles, pero la magnitud de dichas variaciones difirió según la cepa y la especie de lactobacilo empleada, probablemente debido a diferencias en su grado de actividad peptidolítica. En general, *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 por un lado, y *Lb. rhamnosus* I73 y *Lb. rhamnosus* I77 por el otro, mostraron gran similitud en cuanto a su impacto en la proteólisis secundaria, verificada mediante RP-HPLC de los perfiles peptídicos.

En estudios previos, se ha evidenciado que la acción hidrolítica de los lactobacilos mesófilos sobre péptidos de diverso tamaño y composición aminoacídica depende de la especie y de la cepa, además del estado fisiológico del cultivo, el grado de lisis celular, y las condiciones medioambientales, entre otros factores (Laan y col., 1998; Kieronczyk y col., 2001; Randazzo y col., 2007). Dichas investigaciones se han desarrollado, en general, *in vitro* o en modelos simples; el volumen de información disponible en experiencias de elaboración de quesos es mucho más reducido. Para un grupo de cultivos probióticos estudiados en

experiencias en queso Pategrás, se encontró que las cepas de *Lb. acidophilus* exhibían una acción peptidolítica más fuerte que las cepas del grupo *Lb. casei* cuando se utilizaban como cultivos individuales, y también dominaban la proteólisis secundaria al ser agregadas como parte de cultivos mixtos (Bergamini, 2007). Lane y Fox (1996), Hynes y col. (2003b) y Poveda y col. (2003) también encontraron algunos cambios en los perfiles peptídicos según el tipo de adjunto utilizado, aunque no aplicaron métodos estadísticos para comparar los cromatogramas y, por lo tanto, la magnitud de los cambios atribuibles a cada cepa no fue evaluada. En el presente trabajo, se hicieron evidentes diferencias de peptidólisis entre quesos elaborados con distintos lactobacilos adjuntos, inclusive entre cepas pertenecientes al grupo de *Lb. casei*.

3.5. Aminoácidos libres totales e individuales

En las Figuras 3.9A y 3.9B se presentan los perfiles de AAL individuales de los quesos Cremoso de 7 y 60 días de maduración, respectivamente. Tanto en quesos controles como experimentales, la concentración de la mayor parte de los AAL se incrementó con el tiempo de maduración.

Los quesos controles y experimentales tipo Cremoso presentaron niveles similares ($P > 0,05$) de AAL totales al comienzo de la maduración (7 días). Sin embargo, luego de 60 días, el contenido total de AAL en quesos elaborados con *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90 y *Lb. rhamnosus* I73, fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$) que en los quesos no inoculados. El incremento en el contenido de AAL totales fue: CLb73 (20%) > CLb91 (8%) > CLb90 (3%).

Al final del periodo de maduración, los AAL más abundantes en los quesos Cremoso controles y tratados con *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90, *Lb. rhamnosus* I77 y *Lb. rhamnosus* I73 fueron: ácido glutámico, arginina, tirosina, lisina, leucina y fenilalanina, los que representaron entre el 72 al 76% del contenido total de AAL. Como se indicó en el capítulo 2, estos mismos aminoácidos fueron mayoritarios en los quesos Cremoso miniatura elaborados con los adjuntos *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90.

Luego de 60 días de maduración, la concentración de leucina y fenilalanina fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$) en los quesos Cremoso tratados con las cepas de lactobacilos ensayadas, respecto a los controles no inoculados. Asimismo, los quesos elaborados con *Lb. rhamnosus* I73 presentaron una concentración significativamente mayor de prolina, valina y arginina, comparado con los controles; el contenido de este último aminoácido también fue superior en los quesos con *Lb. casei* I90 y *Lb. rhamnosus* I77. Los

quesos inoculados con *Lb. plantarum* I91 también mostraron una mayor concentración de arginina que los quesos controles, pero debido a la elevada variabilidad entre réplicas, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Como se mencionó en el capítulo 2, en este tipo de experiencia es frecuente encontrar una elevada variabilidad entre perfiles de aminoácidos libres de muestras correspondientes a distintas réplicas (quesos elaborados en días diferentes, con leche diferente) (Poveda y col., 2004b; Pripp y col., 2006; Picon y col., 2007).

Los perfiles de AAL individuales de los quesos Pategrás, luego de 7 y 60 días de maduración, se presentan en las Figuras 3.10A y 3.10B, respectivamente. Al igual que lo observado para queso Cremoso, la concentración de todos los aminoácidos se incrementó con el tiempo de maduración en todos los tipos de quesos, pero a diferencia de éste, el aumento detectado en los quesos tipo Pategrás fue muy superior.

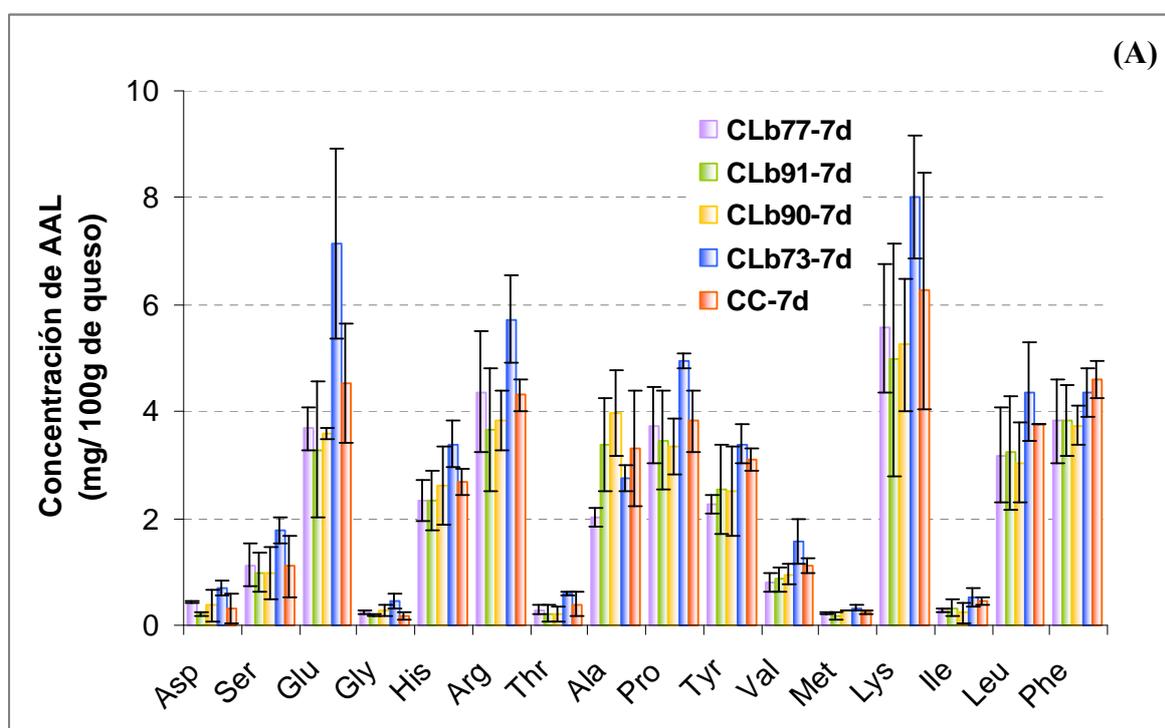
El contenido de AAL totales no mostró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre quesos elaborados con y sin fermentos adjuntos luego de 7 días de maduración. Al final de la maduración, sólo los quesos elaborados con las cepas de *Lb. rhamnosus* mostraron niveles de AAL totales significativamente mayores ($P > 0,05$) que los quesos controles; el incremento fue del 5% y del 34% para los quesos inoculados con *Lb. rhamnosus* I77 y *Lb. rhamnosus* I73, respectivamente. Los quesos tratados con las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, también presentaron valores mayores de AAL totales que los quesos controles, pero el análisis estadístico no reveló diferencias significativas, dado a la elevada variabilidad entre réplicas.

Los aminoácidos mayoritarios al final de la maduración en todos los quesos Pategrás, tanto controles como experimentales, fueron: serina, ácido glutámico, arginina, prolina, valina, lisina, leucina y fenilalanina. Estos aminoácidos representaron aproximadamente el 79 al 83% del contenido total de aminoácidos. Bergamini (2007) informó que los cinco aminoácidos más abundantes en quesos tipo Pategrás, elaborados a escala piloto fueron, ácido glutámico, arginina, lisina, leucina y fenilalanina, en forma similar a lo observado en el presente trabajo.

Al comienzo de la maduración, ya se observaron diferencias notables en la concentración de algunos aminoácidos, entre quesos controles y experimentales tipo Pategrás, y entre quesos elaborados con las distintas cepas de lactobacilos (Figura 3.10A). En efecto, los adjuntos de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 incrementaron los niveles de ácido aspártico y arginina, respecto a los controles. A su vez, los quesos inoculados con *Lb. plantarum* I91 presentaron una concentración significativamente menor ($P \leq 0,05$) de ácido glutámico, arginina, metionina e isoleucina, que los quesos tratados con *Lb. rhamnosus* I73. Por otro lado, los

niveles de ácido glutámico, arginina y prolina fueron mayores ($P \leq 0,05$) en los quesos elaborados con las cepas de *Lb. rhamnosus*, en comparación con los controles no inoculados. Asimismo, en los quesos con *Lb. rhamnosus* I73 también se verificó un mayor contenido de aspártico, histidina, tirosina, valina, lisina y leucina. Resultados similares a los observados al inicio de la maduración, fueron detectados luego a los 60 días (Figura 3.10B). En efecto, los quesos con cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 sólo mostraron niveles superiores de arginina, en comparación con los controles, mientras que ambas cepas de *Lb. rhamnosus* incrementaron la concentración de ácido glutámico, arginina, valina, lisina y leucina, respecto a los quesos no inoculados; los quesos con *Lb. rhamnosus* I73 también mostraron un mayor contenido de serina y prolina. Las mayores diferencias entre quesos experimentales fueron observadas principalmente para las cepas *Lb. plantarum* I91 y *Lb. rhamnosus* I73, en especial para los aminoácidos ácido glutámico, arginina, prolina, valina, lisina y leucina.

Análogamente a lo observado para queso Cremoso, en los quesos tipo Pategrás también se detectó una gran variabilidad entre las muestras en base al día de elaboración, la que fue particularmente elevada en aquellas con *Lb. casei* I90.



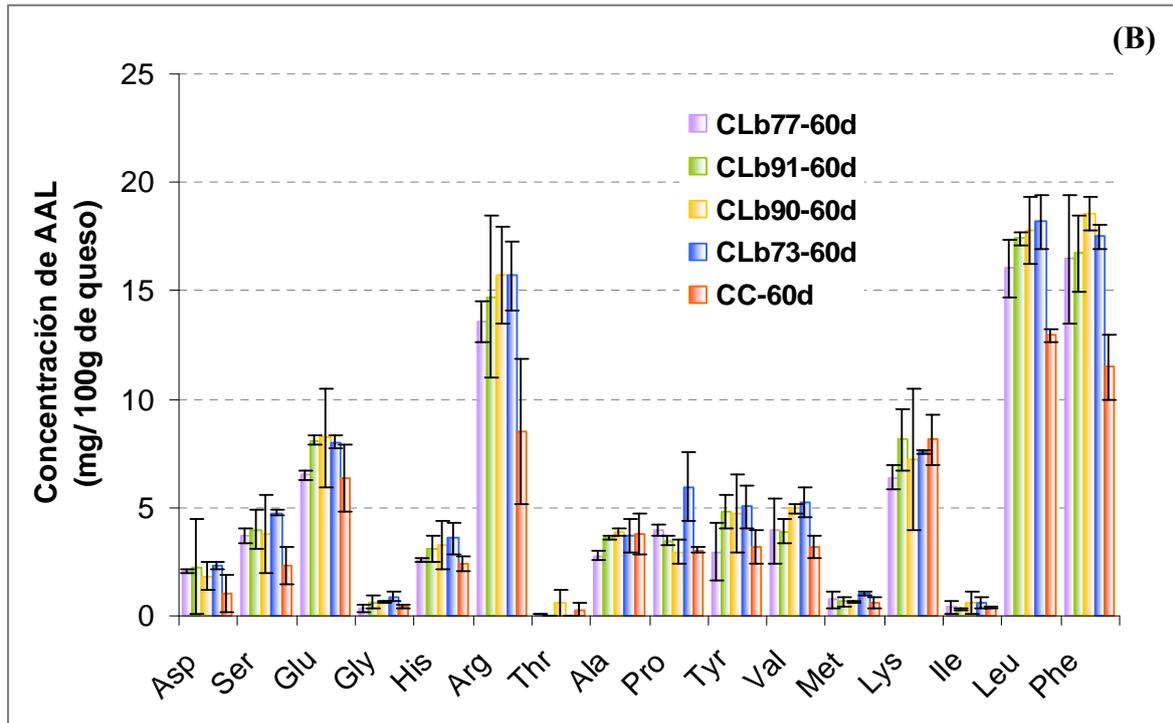
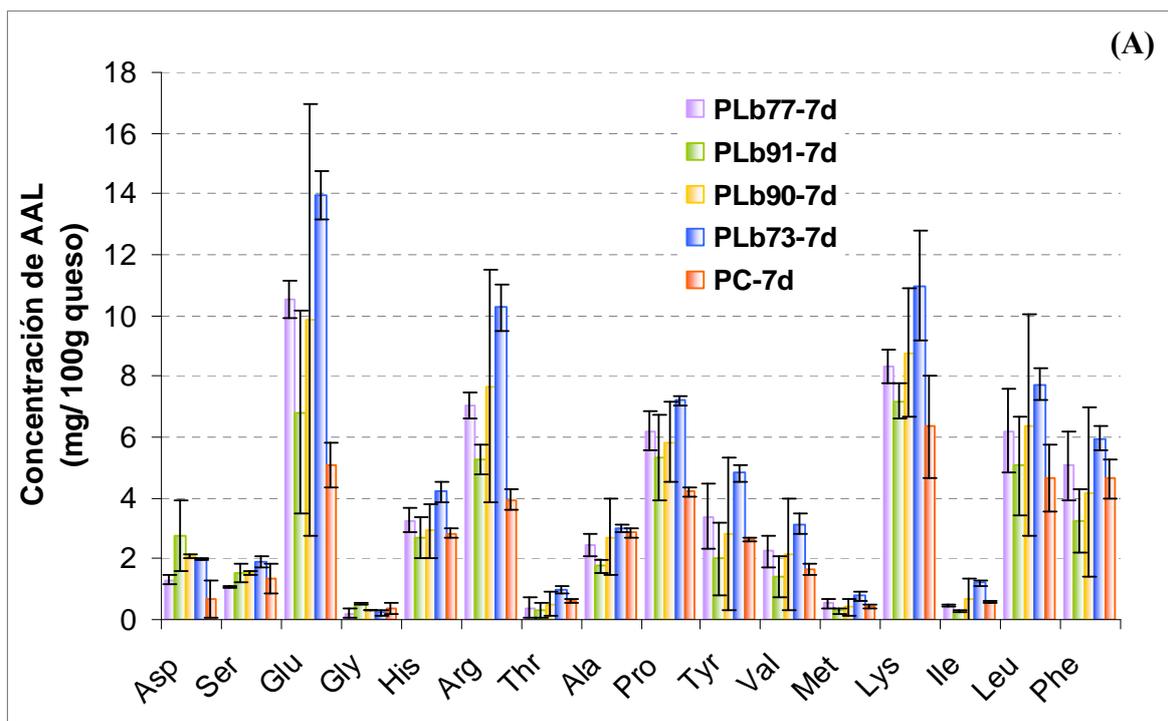


Figura 3.9. Perfiles de aminoácidos libres individuales de los quesos Cremoso de 7 (A) y 60 (B) días de maduración. CC: quesos controles. CLb73, CLb77, CLb90 y CLb91, quesos elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.



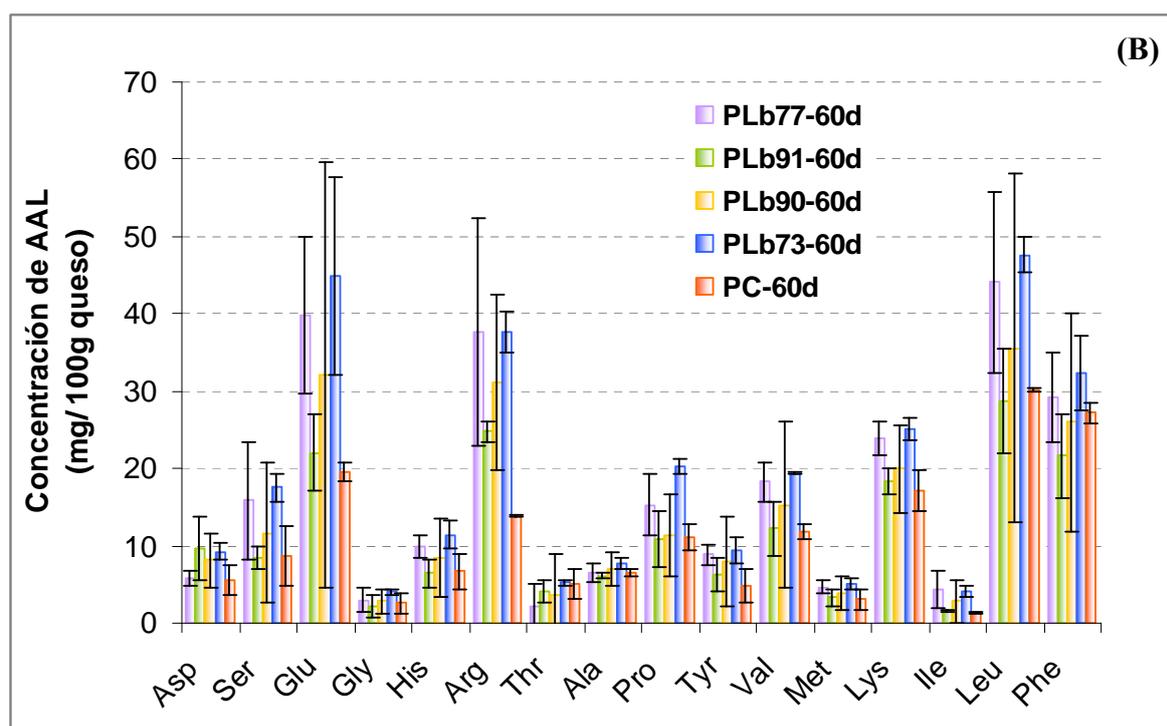


Figura 3.10. Perfiles de aminoácidos libres individuales de los quesos Pategrás de 7 (A) y 60 (B) días de maduración. PC: quesos controles. PLb73, PLb77, PLb90 y PLb91, quesos Pategrás elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. rhamnosus* I73, *Lb. rhamnosus* I77, *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

Como se indicó en el capítulo 2, son numerosos los trabajos en los que se ha observado un incremento en el contenido total e individual de AAL asociado a la utilización de cepas de lactobacilos mesófilos como adjuntos (Broome y col., 1990; McSweeney y col., 1994; Lane y col., 1996; Lynch y col., 1996; Madkor y col., 2000; Michaelidou y col., 2003; Poveda y col., 2003; Irigoyen y col., 2007; Morea y col., 2007).

La mayor parte de los trabajos dedicados al estudio del impacto de adjuntos de lactobacilos mesófilos sobre la proteólisis secundaria, han sido llevados a cabo en queso tipo Cheddar, que representa la variedad de mayor producción y consumo a nivel mundial (Banks, 2003). Uno de los primeros estudios abocados a la caracterización tecnológica de cepas de lactobacilos mesófilos en ensayos de elaboraciones de queso, fue el desarrollado por Puchades y col. (1989). Estos investigadores detectaron niveles elevados de ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina y arginina en quesos Cheddar de 7 meses de maduración, inoculados con cepas de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, y *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*. Más tarde, Broome y col. (1990) informaron que la incorporación de cepas de *Lb. casei* a la leche

de elaboración de queso Cheddar, resultó en un incremento sustancial del contenido total de aminoácidos luego de 12 meses de maduración. Asimismo, en ese trabajo, la concentración de ácido glutámico, asparragina, histidina, alanina, valina, fenilalanina, leucina y lisina en los quesos con cepas de *Lb. casei*, superó en un 50 a 140%, la concentración detectada en los quesos controles. En forma similar, Lynch y col. (1996) detectaron un mayor contenido de ácido aspártico, ácido glutámico, serina, leucina, tirosina, fenilalanina y arginina, en quesos Cheddar inoculados con cepas *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lb. curvatus* y *Lb. plantarum*, luego de 6 meses de maduración. Otros investigadores también han observado un incremento en los niveles totales de aminoácidos en queso tipo Cheddar, asociado a la adición de adjuntos de lactobacilos (Madkor y col., 2000; Swearingen y col., 2001).

En los últimos cinco años se ha generado un creciente interés sobre la utilización de cultivos adjuntos de origen NSLAB en quesería para mejorar los estándares de calidad e inocuidad, lo que ha impulsado el estudio de este grupo microbiano en una amplia gama de variedades de quesos. Gran parte de los trabajos más recientes relacionados con este tema, se han llevado a cabo en experimentos de elaboraciones de quesos del tipo italiano. Uno de ellos es el realizado por Irigoyen y col. (2007), quienes evaluaron, entre otras cosas, la actividad proteolítica de dos cepas de lactobacilos (*Lb. paracasei* y *Lb. plantarum*), en queso Roncal elaborado con leche de oveja. Los autores reportaron que la adición del fermento adjunto mixto condujo a un incremento en los niveles de aminoácidos libres, en particular, leucina, isoleucina, Gaba (ácido γ -aminobutírico), fenilalanina, tirosina, glicina y ornitina. En otro estudio, Morea y col. (2007) elaboraron quesos Caciocavallo Pugliese con y sin la adición de un cultivo adjunto compuesto por dos cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. Los quesos elaborados con el cultivo adjunto, presentaron una mayor actividad peptidasa y un mayor contenido de aminoácidos libres; estos quesos presentaron una concentración más elevada de serina, ácido glutámico, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina, en comparación con los quesos no inoculados.

Cabe señalar que, si bien en la mayoría de los trabajos se evidenció que la adición de cepas de lactobacilos conduce a un incremento en el contenido de aminoácidos, en otros casos, las cepas ensayadas no demostraron tal efecto (Poveda y col., 2004a; Mangia y col., 2008), o incluso promovieron el efecto contrario, es decir, una disminución en la concentración de ciertos aminoácidos (Michaelidou y col., 2003; Kocaoglu-Vurma y col., 2008).

Para resumir, en ambas variedades de queso, la magnitud de la proteólisis secundaria descrita mediante los perfiles peptídicos y el contenido total e individual de aminoácidos, varió de acuerdo al cultivo adjunto utilizado, lo que indica una marcada variación intra- e inter-especie en los niveles de actividad peptidolítica entre las distintas cepas ensayadas. En general, los quesos elaborados con *Lb. rhamnosus* I73, y en menor medida *Lb. rhamnosus* I77, mostraron una proteólisis secundaria más acentuada que los quesos controles y los quesos con agregado de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91. En efecto, el impacto de las cepas de *Lb. rhamnosus* sobre la proteólisis secundaria, se caracterizó por la producción de péptidos más hidrofílicos, y por un incremento en la formación de aminoácidos libres, especialmente serina, arginina, prolina, valina, leucina y fenilalanina en la variedad Cremoso, y ácido glutámico, arginina, prolina, valina, lisina y leucina, en la variedad Pategrás. Por otro lado, los quesos elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 mostraron niveles intermedios de proteólisis secundaria con respecto a los quesos controles y los quesos con adición de las cepas de *Lb. rhamnosus*. Los cambios observados en los patrones proteolíticos, asociados a la incorporación de las cepas de lactobacilos estudiadas, fueron consistentes con la aceleración de la maduración en los quesos (El Soda, 1993; Wilkinson, 1993).

Por otra parte, a pesar de que los quesos controles tipo Pategrás presentaron una proteólisis primaria significativamente mayor, los índices de proteólisis secundaria de quesos controles y experimentales fueron similares, o incluso mayores en estos últimos. Esto sugirió que la proteólisis secundaria causada por los lactobacilos adjuntos compensó, o incluso superó, la producción de péptidos de tamaño intermedio a pequeño y de aminoácidos libres en los quesos controles, independientemente de la extensión de la proteólisis mediada por la enzima coagulante.

Finalmente, otro hecho a considerar es el comportamiento de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, en quesos fabricados a escala de laboratorio y a escala piloto. La tendencia evidenciada por ambos fermentos adjuntos fue la misma en los dos modelos, por lo que puede considerarse que los resultados presentados en el capítulo 2 fueron validados en la experiencia a escala piloto. Sin embargo, el impacto de ambos adjuntos sobre la proteólisis secundaria fue más relevante en los quesos Cremoso miniatura, que en los mismos quesos elaborados a escala piloto. Dado que la miniaturización no implicó modificaciones en la tecnología de elaboración, ni ocasionó cambios en la composición química de los quesos, es posible que las discrepancias sean consecuencia de diferencias en la relación superficie/ volumen del queso o, más probablemente, se deban a que los cambios debidos al adjunto resultan más difíciles de evidenciar en un ecosistema complejo como son los quesos obtenidos en planta piloto. En

efecto, no debe minimizarse el hecho de que en los controles se encontraron altos niveles de NSLAB adventicias, que sin duda contribuyeron a la proteólisis secundaria tanto o más que los adjuntos, mientras que en los quesos controles miniatura, las NSLAB estuvieron siempre en recuentos muy bajos.

3.6. Análisis sensorial

Las características sensoriales de los quesos Cremoso elaborados con y sin lactobacilos adjuntos fueron muy similares. En efecto, la escasa variación entre las muestras no pudo ser explicada por la actividad de los fermentos adjuntos ensayados, dado que no se detectaron diferencias significativas entre quesos elaborados con y sin lactobacilos (resultados no incluidos). En los quesos tipo Pategrás, por el contrario, se evidenció un impacto de los adjuntos en el perfil sensorial del alimento, cuya magnitud varió según la cepa utilizada. En las Figuras 3.11A, 3.11B, 3.11C, 3.11D y 3.11E, se presentan los gráficos estrella que representan los perfiles sensoriales de los quesos Patagrás controles y elaborados con *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90, *Lb. rhamnosus* I77 y *Lb. rhamnosus* I73, respectivamente. Los gráficos revelaron que los quesos inoculados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 fueron los más similares a los controles, aunque mostraron una intensificación del sabor picante y del *flavor* residual. Por el contrario, los quesos Patagrás tratados con *Lb. rhamnosus* I73 y *Lb. rhamnosus* I77 mostraron mayores diferencias con los quesos controles en cuanto a las características sensoriales, especialmente para los atributos textura y sabor ácido. La intensificación del sabor ácido detectado en los quesos elaborados con las cepas de *Lb. rhamnosus*, resulta coherente con la mayor acidificación desarrollada en estos productos. Resultados similares fueron observados por Lee y col. (1990), quienes reportaron que la velocidad de acidificación durante las etapas iniciales de la elaboración del queso, constituye un factor de gran importancia en la determinación de la calidad del queso, a través de su efecto sobre el contenido mineral de la cuajada, cuya perturbación puede originar defectos de textura y de aroma y sabor.

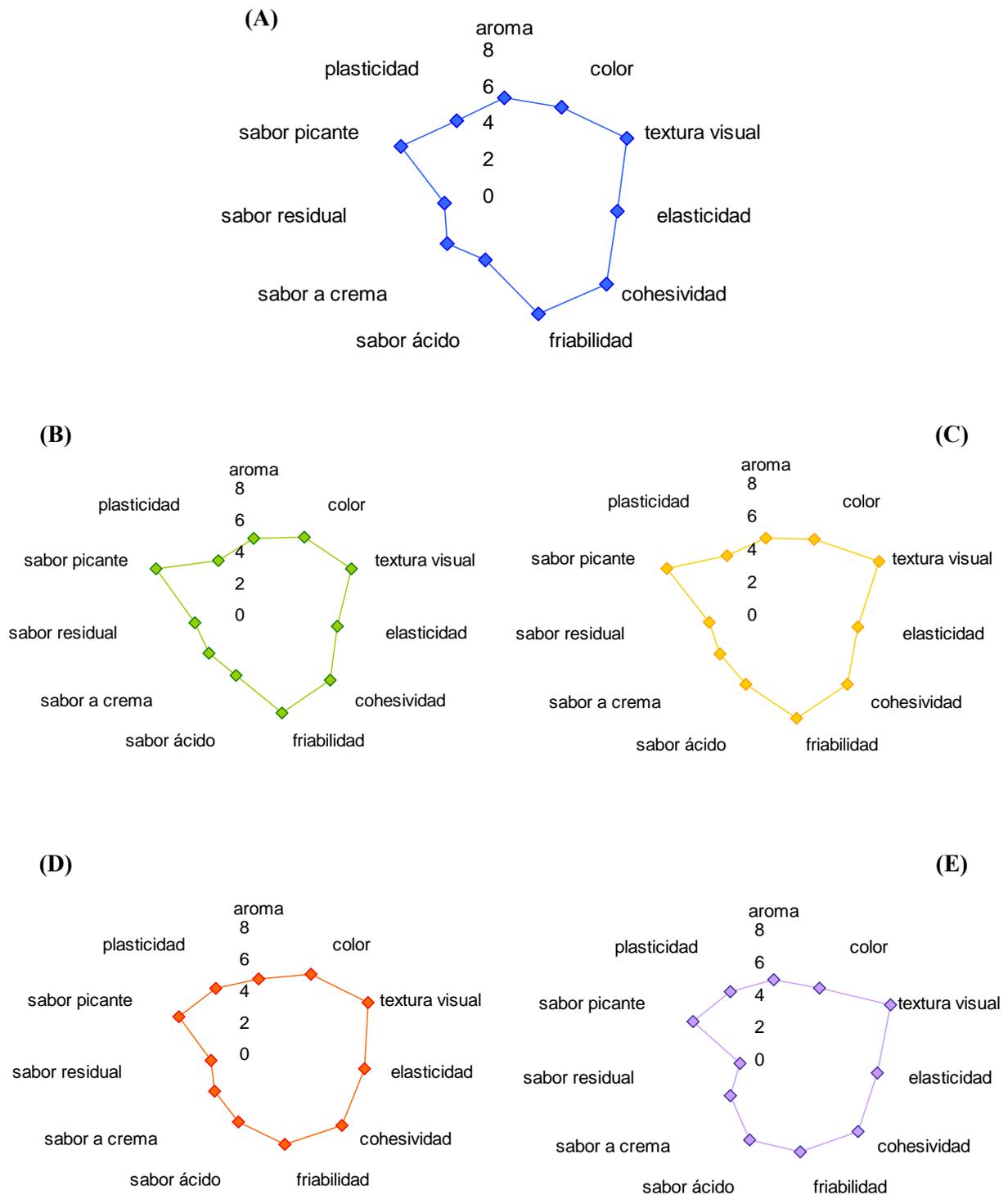


Figura 3.11. Atributos sensoriales de los quesos Pategrás de 60 días de maduración. **A:** Quesos controles. **B, C, D** y **E:** Quesos elaborados con cultivos adjuntos de *Lb. plantarum* I91, *Lb. casei* I90, *Lb. rhamnosus* I77 y *Lb. rhamnosus* I73, respectivamente.

Resumiendo, los quesos elaborados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 presentaron características sensoriales similares o mejoradas respecto a los controles no inoculados, mientras que las cepas de *Lb. rhamnosus* disminuyeron la calidad de los quesos al producir defectos de sabor, relacionados a su elevada actividad acidificante.

Varias cepas pertenecientes a las especies *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* y *Lb. curvatus*, han demostrado capacidad para incrementar el desarrollo y la intensidad del *flavor* en quesos tipo Cheddar (Broome y col., 1990; Lee y col., 1990; McSweeney y col., 1994; Lane y Fox, 1996; Lynch y col., 1996; 1999; Swearingen y col., 2001). Asimismo, *Lb. casei* (Benech y col., 2003) y *Lb. plantarum* (Gomez y col., 1996; Swearingen y col., 2001) impactaron positivamente en la calidad sensorial de queso Cheddar y de un queso semi-duro elaborado con leche pasteurizada, respectivamente, al reducir el sabor amargo de los mismos. Cinco cepas pertenecientes a las especies *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum* y *Lb. casei*, fueron evaluadas por Menéndez y col. (2000) como adjuntos en elaboraciones de queso Arzúa-Ulloa. Los cultivos adjuntos incrementaron el contenido de diacetilo-acetoína y de ácidos grasos libres volátiles, y mejoraron las características sensoriales, otorgándole a los quesos una textura suave y un *flavor* picante y levemente rancio, deseables en este tipo de variedad. Un cultivo mixto de *Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* también incrementó la concentración de ciertos compuestos volátiles de aroma y sabor, tales como diacetilo y acetoína, en quesos tipo Roncal elaborado con leche de oveja, pero en este estudio no se realizó un análisis sensorial para evaluar su impacto en el desarrollo del aroma y sabor (Irigoyen y col., 2007). En queso Kefalograviera reducido en materia grasa, una cepa de *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* (actualmente *Lb. rhamnosus*), influyó positivamente en las características sensoriales, a través del incremento de la intensidad del *flavor* y del mejoramiento del cuerpo y la textura del queso (Katsiari y col., 2002; Michaelidou y col., 2003). Tavaría y col. (2006) reportaron que la adición de una cepa de *Lb. plantarum* a la leche de elaboración de queso Serra da Estrela, condujo a un incremento en los niveles de compuestos volátiles y a una aceleración del proceso de maduración. Recientemente, Randazzo y col. (2008) informaron que la combinación de varias cepas pertenecientes a las especies *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. rhamnosus*, contribuyó a la formación de compuestos volátiles de aroma y sabor típicos, así como también, al desarrollo de características sensoriales más pronunciadas en quesos Pecorino Siciliano.

Como puede observarse, son numerosos los estudios que han demostrado una relación entre la adición de adjuntos de lactobacilos y el mejoramiento de la calidad del queso, ya sea a través de la intensificación del *flavor* típico de una determinada variedad, o bien, a través de

la formación de aromas y sabores novedosos, que permiten obtener productos autóctonos y distintivos de una determinada región. Sin embargo, algunos autores han reportado que la utilización de cepas de *Lb. casei* (Broadbent y col., 2003) o *Lb. plantarum* (Poveda y col., 2003) como adjuntos en elaboraciones de quesos, no influyó en el desarrollo del aroma y sabor, mientras que otros han detectado defectos de textura y de *flavor*, asociados a la incorporación de adjuntos de lactobacilos (Lee y col., 1990; Crow y col., 2001; Gumalla y Broadbent, 2001; Antonsson y col., 2003; Liu, 2003; Herreros y col., 2007).

Los resultados del presente trabajo indicaron que el impacto de los adjuntos de lactobacilos mesófilos sobre las características sensoriales de los quesos, es cepa y especie dependiente. Asimismo, se observó que la contribución de cada cepa ensayada, varió de acuerdo al tipo de queso, de pasta blanda o semi-dura. En efecto, el impacto de los adjuntos estudiados sobre los atributos sensoriales fue más pronunciado en quesos tipo Pategrás. Cabe destacar que el *flavor* del queso está influenciado por numerosos factores, entre los que se pueden destacar: **i**) la calidad de la leche, la cual a su vez depende del tipo y raza del animal del cual proviene, de la alimentación del animal y de las variaciones estacionales; **ii**) el procesamiento de la leche, que incluye, almacenamiento, tratamiento térmico, presión, pH, actividad acuosa, aditivos, etc.; y **iii**) las condiciones de elaboración (tipo y dosis de fermento primario y coagulante, temperatura de cocción, etc.) y maduración (temperatura de maduración, actividad del fermento primario, cultivo adjunto y lactobacilos adventicios, disponibilidad de sustratos, interacciones sinérgicas o antagónicas entre la microbiota del queso). Las diferencias detectadas entre quesos Cremoso y Pategrás, probablemente se deban a las diferencias que existieron en el tiempo y la temperatura de maduración de ambas variedades (Coolbear y col., 2008; Kocaoglu-Vurma y col., 2008).

4. Conclusiones

En este trabajo, dos cepas de lactobacilos mesófilos aisladas a partir de queso, de potencial interés como organismos probióticos, exhibieron propiedades tecnológicas adecuadas para la formulación de cultivos adjuntos para quesería, ellas son: *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90. Ambos adjuntos desarrollaron rápidamente y alcanzaron recuentos elevados en los quesos de pasta blanda y semi-dura, no modificaron la composición global del producto ni produjeron sobre-acidificación, causaron un incremento moderado de la proteólisis secundaria, e impactaron favorablemente en las características sensoriales de los quesos. Los resultados del presente estudio respaldaron la evidencia obtenida previamente acerca del desempeño de *Lb.*

plantarum I91 y *Lb. casei* I90 como fermentos adjuntos, en un modelo de queso Cremoso miniatura. Por el contrario, las dos cepas de *Lb. rhamnosus* estudiadas, si bien mostraron una buena supervivencia y contribuyeron a la proteólisis, presentaron el inconveniente de causar defectos de textura y sabor en los quesos Pategrás, y post-acidificación, especialmente en quesos Cremoso. Una estrategia para la utilización de estas cepas candidatas probióticas en quesería, podría ser su inclusión en el fermento de acidificación.

Capítulo 4

“Interacción entre fermentos lácticos primario y adjunto: Efecto del cultivo iniciador en el crecimiento y la actividad peptidolítica de lactobacilos mesófilos en un modelo de queso duro de pasta cocida”

1. Introducción

Las bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB) desarrollan pobremente en leche debido a la deficiencia de péptidos pequeños y aminoácidos en este medio, y a su débil actividad proteolítica (Stanley, 1998; McSweeney, 2004). Por el contrario, estas bacterias poseen un complejo sistema de peptidasas que se adaptan muy bien a las condiciones medioambientales hostiles del queso en maduración (Laan y col., 1998; Gobbetti y col., 1999b), y contribuyen en gran medida a la formación de aminoácidos y de compuestos de aroma y sabor, luego de la proteólisis primaria mediada por el coagulante, la plasmina y las proteasas de las bacterias del fermento primario (Pritchard y Coolbear, 1993; Williams y Banks, 1997). Di Cagno y col. (2003a), informaron que en un medio químicamente definido, desprovisto de aminoácidos, la cepa de *Lactobacillus plantarum* estudiada fue incapaz de crecer en presencia de las fracciones de α_{s1} -, β - o κ -caseínas. Sin embargo, la adición a ese medio de las proteinasas de pared de diferentes fermentos primarios, parcialmente purificadas, estimuló el crecimiento de la cepa de *Lb. plantarum*, aunque en diferente grado, sugiriendo que el límite al crecimiento estaba dado por la ausencia de actividad proteolítica en la cepa ensayada.

El estudio de las interacciones bacterianas entre el fermento primario y los lactobacilos mesófilos que dominan espontáneamente la microflora de los quesos o que se adicionan como adjuntos, constituye un tema de gran interés, ya que algunos estudios han encontrado que las bacterias del fermento primario pueden influir en el crecimiento y en las actividades peptidolíticas de los lactobacilos, impactando de manera diferente en el desarrollo del aroma y sabor de los quesos (Lane y col., 1997a; Hynes y col., 2001a; Di Cagno y col., 2003a).

La información disponible en la materia es escasa y la mayor parte de los trabajos desarrollados se han abocado al estudio de la interacción entre las NSLAB y los fermentos primarios mesófilos. Sin embargo, poco se conoce acerca de la influencia de los fermentos primarios termófilos (*Streptococcus thermophilus*, *Lb. helveticus*, etc.) que son los que se utilizan mayoritariamente en nuestro país.

Se ha demostrado que los fermentos primarios autolíticos liberan sus enzimas proteolíticas y peptidolíticas a la matriz del queso contribuyendo a un incremento en la formación de péptidos y aminoácidos, y a una aceleración del proceso de maduración (Crow y col., 1995; Kiernan y col., 2000; Hannon, y col., 2003; Kenny y col., 2006). Asimismo, se ha postulado que los péptidos y aminoácidos liberados pueden servir como sustratos de crecimiento para las NSLAB durante la maduración (Thomas, 1987; Tammam y col., 2000; Williams y col.,

2000; Laht y col., 2002). Sin embargo, varios autores han detectado recuentos de NSLAB similares en quesos elaborados con fermentos primarios líticos y no líticos (Lane y col., 1997a; Hynes y col., 2001a).

Estudios más recientes indicaron que los fermentos primarios altamente proteolíticos, más que los autolíticos, estimulan el desarrollo y la actividad peptidolítica de los lactobacilos mesófilos (Lane y col., 1997a; Hynes y col., 2001a; Di Cagno y col., 2003a). Sin embargo, este efecto sinérgico depende del género, la especie y la cepa de las bacterias ácido lácticas (LAB) utilizadas como fermento primario, ya que se ha observado que cepas altamente proteolíticas no influyeron en el crecimiento y expresión bioquímica de las NSLAB (Hynes y Bergamini, 2006).

Otros factores, además del fermento primario, pueden influenciar el crecimiento de las NSLAB. La flora NSLAB que se establece en los quesos no es estable, sino que experimenta fluctuaciones a nivel de cepa y especie durante la maduración, probablemente a causa de cambios medioambientales, composicionales y nutricionales (Lane y col., 1997a; Williams y col., 2000). Una de las principales transformaciones bioquímicas que se producen durante la maduración es la hidrólisis de las caseínas y de los péptidos con la formación de aminoácidos (Sousa y col., 2001; Kongo y col., 2009). Se ha sugerido que el incremento de los productos de la proteólisis con el avance de la maduración podría afectar el desarrollo y/o actividad bioquímica de los lactobacilos al proveer de sustratos de crecimiento y fuentes de energía (Tammam y col., 2000; Williams y col., 2000; Kieronczyk y col., 2001; Laht y col., 2002).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de dos cepas de *Lb. helveticus*, una altamente proteolítica y otra con escasa actividad proteolítica, en el crecimiento y actividad peptidolítica de dos cepas de lactobacilos mesófilos (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91), en un modelo representativo de quesos duros de pasta cocida. Además se valoró la influencia de la edad del queso y, en consecuencia, de su composición peptídica, en el desarrollo y la peptidólisis causada por las mismas cepas. Por otro lado, se estudió el impacto específico que cada una de las cepas ensayadas, *Lb. casei* I90 o *Lb. plantarum* I91, causó en la proteólisis secundaria del sistema modelo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Elaboración de quesos Reggiano

2.1.1. Fermentos primarios

En el presente trabajo se utilizaron dos cepas de *Lb. helveticus* como fermento primario para las elaboraciones de quesos Reggianito, a saber: *Lb. helveticus* SF209 y *Lb. helveticus* SF138. Estas cepas fueron aisladas en el INLAIN a partir de fermentos naturales de suero utilizados en la industria láctea. Las cepas fueron caracterizadas desde el punto de vista tecnológico mediante ensayos *in vitro*: resistencia al NaCl, susceptibilidad al ataque por fagos y actividad proteolítica y acidificante (Reinheimer y col., 1995; Reinheimer y col., 1996; Quiberoni y col., 1997). Asimismo, *Lb. helveticus* SF209 y *Lb. helveticus* SF138 se estudiaron como fermentos iniciadores en experiencias de elaboraciones de quesos a escala piloto, en las que se determinó su influencia en los perfiles lipolíticos, proteolíticos y sensoriales (Candiotti y col., 2002; Hynes y col., 2003c; Hynes y col., 2005; Perotti y col., 2005).

Las cepas de *Lb. helveticus* SF209 y *Lb. helveticus* SF138 fueron seleccionadas en el presente trabajo por presentar diferencias en sus actividades proteolíticas. En efecto, mediante la aplicación de ensayos inespecíficos (fraccionamiento nitrogenado), *Lb. helveticus* SF209 mostró una mayor actividad proteolítica que *Lb. helveticus* SF138.

Las cepas individuales fueron cultivadas en leche descremada estéril (10% p/v) a 45°C durante 24 h previo a su empleo.

2.1.2. Preparación de los cultivos primarios

Para la preparación de los fermentos primarios se utilizó suero “dulce” de quesería, obtenido a partir de una planta láctea cercana (Milkaut Coop. Ltda., Colonia Nueva, Santa Fe, Argentina). El suero fue recolectado al finalizar la etapa de cocción de la cuajada en elaboraciones de queso Reggianito, y luego fue transportado inmediatamente a nuestro laboratorio bajo refrigeración, para limitar la acidificación debida a las LAB existentes en el suero. Una vez en el laboratorio, el pH del suero se ajustó a 6,3 mediante la adición de Na(OH) 40% (p/v), y luego se dividió en dos fracciones de 1,8 L que fueron colocadas en erlenmeyers estériles de 2 L de capacidad. Ambas fracciones fueron sometidas a un tratamiento térmico a 85°C durante 5 min a fin de destruir todas las células vegetativas. Luego del enfriamiento a 45°C, las fracciones fueron inoculadas (2% v/v) con una de las cepas de *Lb. helveticus*: *Lb. helveticus* SF209 o *Lb. helveticus* SF138, e incubadas a 45°C durante 24 h, para obtener los fermentos primarios de suero (suero fermentos) utilizados en la elaboración de quesos duros.

2.1.3. Protocolo de elaboración

La leche cruda (pH $6,60 \pm 0,05$, acidez $18 \pm 1^{\circ}\text{D}$) utilizada en las elaboraciones fue provista por Milkaut Coop. Ltda. (Franck, Santa Fe, Argentina). El contenido de grasa se estandarizó a 2,5% (Alfa Laval Separador Co., Tumba, Suecia) y la leche se pasteurizó a 65°C durante 20 min.

Los quesos Reggianito fueron elaborados en la planta piloto del INLAIN de acuerdo a la metodología estándar de fabricación (Candioti y col., 2002). Cada día se elaboraron dos quesos, uno con la adición de fermento de suero conteniendo *Lb. helveticus* SF209 (Lh209) y el otro con el agregado de fermento de suero inoculado con *Lb. helveticus* SF138 (Lh138).

La leche pasteurizada se distribuyó en dos tinas (50 L en cada una), y cuando alcanzó una temperatura de 33°C se adicionó una cantidad de CaCl_2 para lograr una concentración final de 0,02% (p/v). Posteriormente se determinó la acidez Dornic de la leche y de los sueros fermento mediante titulación con una solución valorada $\text{Na}(\text{OH})$ N/9, utilizando fenolftaleína como indicador. Una vez que los fermentos de suero alcanzaron una acidez comprendida entre 90 y 120°D (lo que garantiza que en el cultivo la concentración de bacterias esté en el orden de 10^8 UFC/ml), se adicionó un volumen del mismo suficiente para incrementar la acidez inicial de la leche de elaboración en 4°D (400 mg ácido láctico/L). El procedimiento de medición de la acidez de la leche en lugar del volumen de cultivo primario es tradicional para los quesos duros como el Reggianito, y permite lograr una mayor uniformidad en el número de células viables por ml de leche. El volumen de inóculo generalmente representa aproximadamente un 4% (v/v) de la leche, en caso de que la acidez del suero fermento se encuentre entre los valores mencionados. Luego de una agitación mecánica durante 10 min, se adicionaron 0,29 ml/L de coagulante de bovino adulto (230 International Milk Clotting Units por ml; Naturen, Chr. Hansen, Quilmes, Argentina). Cuando el gel alcanzó una consistencia firme (~ luego de 18 - 20 min) se cortó a un tamaño de grano adecuado (la mitad de un grano de arroz) mediante el empleo de liras con alambres espaciados 10 mm. La mezcla de suero y partículas de cuajada se agitó suavemente y se calentó a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar una temperatura de 44°C , a fin de reducir la humedad de los granos de cuajada. Luego, la temperatura de la mezcla se incrementó rápidamente ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta alcanzar los 51°C , momento en el cual se frenó la agitación. El suero se descartó mediante el uso de una bomba y la cuajada se colocó en los moldes y se prensó durante 24 h a temperatura decreciente (desde $\sim 52^{\circ}\text{C}$ hasta temperatura ambiente). Posteriormente, los quesos fueron salados por inmersión en salmuera 20% (p/v), pH 5,4, a 12°C durante 4 días; durante este tiempo los

quesos fueron invertidos cada día. Los quesos de 4 Kg obtenidos fueron pintados y madurados a 12°C y 80% de humedad relativa por 6 meses; tiempo mínimo requerido por la legislación Argentina para queso Reggianito (ANMAT, 2008).

2.1.4. Análisis de los quesos

Los quesos fueron muestreados al comienzo de la maduración (día 0) y luego de 90 y 180 días. Cada día de muestreo, una masa de queso de aproximadamente 1,2 Kg fue extraída y triturada finamente. Las muestras de queso trituradas se envasaron en bolsas y se conservaron a -20°C hasta su empleo. Una porción de las muestras (~ 20 g) se destinó para la determinación del contenido de humedad y recuentos microbiológicos, realizados el mismo día.

El contenido de humedad en los quesos Lh209 y Lh138 se determinó luego de 0, 90 y 180 días de maduración de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 1 (sección 2.1.5).

Asimismo, luego de la elaboración se llevaron a cabo los recuentos de lactobacilos termófilos para verificar si el volumen de suero fermento adicionado fue suficiente para obtener una concentración inicial de bacterias del orden de 10^8 UFC/ml. Las muestras de queso para análisis microbiológico se procesaron mediante el procedimiento detallado en el capítulo 1 (sección 2.1.5). Las bacterias se enumeraron en Agar MRS luego de la incubación a 45°C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis ([Gaspak System, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra](#)) (Quiberoni y col., 1998).

2.2. Preparación del extracto soluble de queso Reggianito, inoculación con los fermentos adjuntos e incubación

Los extractos solubles de queso Reggianito se prepararon por duplicado a partir de los quesos Lh209 y Lh138 de 0, 90 y 180 días de maduración, de acuerdo a la metodología especificada en el capítulo 1 (sección 2.2.2). Una vez esterilizados por filtración, los extractos solubles (50 ml) correspondientes a los quesos Lh209 y Lh138 de 0, 90 y 180 días de maduración se colocaron en frascos estériles. Por cada tipo de queso (Lh209 o Lh138) se prepararon 4 tipos de extractos solubles, a saber: dos extractos experimentales, uno con el agregado de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91 (E91) y el otro con la adición de *Lb. casei* I90 (E90), un extracto control (C) sin inocular, y un blanco (B) que consistió en un extracto sin inocular sometido a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 min. A su vez, los extractos controles, blancos y experimentales fueron obtenidos a partir de los quesos

Reggianito de 0 (inicial: i), 90 (medio: m) y 180 (final: f) días de maduración, lo que arrojó un total de 24 unidades experimentales. En la Tabla 4.1 se presenta el diseño experimental y la nomenclatura asignada a cada muestra.

Tabla 4.1. Diseño experimental y nomenclatura asignada a cada muestra.

Tipo de extracto	Tiempo de maduración (días)	Cultivo adjunto	Tratamiento térmico	Nomenclatura
<i>Lb. helveticus</i> SF209				
C-209	0	-	-	C209-i
	90	-	-	C209-m
	180	-	-	C209-f
B-209	0	-	70°C - 30 min	B209-i
	90	-	70°C - 30 min	B209-m
	180	-	70°C - 30 min	B209-f
E90-209	0	<i>Lb. casei</i> I90	-	E90209-i
	90	<i>Lb. casei</i> I90	-	E90209-m
	180	<i>Lb. casei</i> I90	-	E90209-f
E91-209	0	<i>Lb. plantarum</i> I91	-	E91209-i
	90	<i>Lb. plantarum</i> I91	-	E91209-m
	180	<i>Lb. plantarum</i> I91	-	E91209-f
<i>Lb. helveticus</i> SF138				
C-138	0	-	-	C138-i
	90	-	-	C138-m
	180	-	-	C138-f
B-138	0	-	70°C - 30 min	B138-i
	90	-	70°C - 30 min	B138-m
	180	-	70°C - 30 min	B138-f
E90-138	0	<i>Lb. casei</i> I90	-	E90138-i
	90	<i>Lb. casei</i> I90	-	E90138-m
	180	<i>Lb. casei</i> I90	-	E90138-f
E91-138	0	<i>Lb. plantarum</i> I91	-	E91138-i
	90	<i>Lb. plantarum</i> I91	-	E91138-m
	180	<i>Lb. plantarum</i> I91	-	E91138-f

Las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 fueron cultivadas por duplicado en caldo MRS a 34°C *overnight* previo a su empleo, tal como se describió en el capítulo 2 (sección 2.1). Una alícuota del cultivo *overnight* diluido 1/1000 (~ 480 y 143 µl para *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, respectivamente), suficiente para lograr una concentración inicial de células viables de 10⁴ UFC/ml, se adicionó a los extractos experimentales bajo condiciones microbiológicas controladas. A los extractos controles y blancos se le adicionó una alícuota de caldo MRS estéril a fin de asegurar las mismas condiciones en los extractos preparados con y sin cultivo adjunto. Las muestras se incubaron en estufa durante 21 días a 34°C. Un volumen de extracto de 8 ml fue extraído 30 min después de la inoculación (tiempo 0) y luego de 1, 3, 7, 14 y 21 días de incubación bajo condiciones asépticas. Los extractos solubles se fraccionaron en eppendorf rotulados y se conservaron a -20°C hasta su análisis. Una fracción del extracto se reservó para la determinación de pH y recuentos microbiológicos, realizados el mismo día en que se obtuvo la muestra.

2.3. Análisis de los extractos

2.3.1. Evolución del pH y recuentos microbiológicos

El pH y los recuentos de lactobacilos (Agar MRS, 34°C – 48 h) en los extractos solubles preparados con y sin agregado de cultivos adjuntos fueron determinados al comienzo de la etapa de incubación (0 días) y luego de 1, 3, 7, 14 y 21 días, utilizando las metodologías y el equipamiento descritos en el capítulo 1 (secciones 2.2.2 y 2.2.3). Los recuentos microbiológicos también se efectuaron luego de 24 h de incubación (día 1) de los extractos.

2.3.2. Perfiles peptídicos por RP-HPLC

Los perfiles peptídicos de los extractos blancos, controles y experimentales se obtuvieron por RP-HPLC luego de 0, 3, 7, 14 y 21 días de incubación. Las condiciones de análisis y el equipamiento utilizado fueron los mismos que se detallaron en el capítulo 1 (sección 2.2.3).

2.3.3. Análisis de aminoácidos libres por RP-HPLC

La concentración total e individual de aminoácidos libres (AAL) en los extractos solubles de queso Reggianito Lh209 y Lh138 de inicio, mitad y final de maduración, se determinó al comienzo de la etapa de incubación (en extractos controles y blancos) y luego de 3, 7 y 14 días (en todos los extractos), según la metodología especificada en el capítulo 2 (sección 2.3).

En este caso, se utilizó un volumen de extracto comprendido entre 5 a 300 μ l, dependiendo del tipo de extracto (blanco, control o experimental), del tiempo de incubación (0, 3, 7 ó 14 días), del tipo de queso empleado en la preparación del extracto (Lh209 o Lh138), y del tiempo de maduración de estos últimos (inicial, medio o final).

2.4. Análisis estadístico

Los perfiles peptídicos se evaluaron mediante análisis por componentes principales (ACP) como se detalló en el capítulo 1. En este caso, en lugar de la selección visual de los picos de mayor variación, se aplicó una herramienta de cálculo que utiliza la estrategia matemática denominada “*fuzzy approach*”, para la pre-reducción de los datos obtenidos mediante RP-HPLC. Esta metodología fue diseñada por Piraino y col. (2004) con el fin de pre-procesar objetivamente los perfiles cromatográficos, evitando la selección visual y subjetiva de los picos del cromatograma. La técnica ha sido aplicada en diversas situaciones y ha demostrado ser de utilidad, sobre todo para perfiles muy complejos en los que se verifica además buena reproducibilidad en los tiempos de retención (Bergamini y col., 2006b). Mediante este procesamiento, se obtiene un conjunto de datos más reducido, donde los datos de entrada (*input*) son las alturas (o áreas) de los picos y los tiempos de retención, mientras que los datos de salida (*output*) son valores asignados a clases de tiempo de retención. Dentro de cada clase de tiempo de retención, las alturas de los picos se acumulan y el peso de cada pico en la clase está determinado por su distancia al centro de la misma (el pico central presenta mayor peso) (Piraino y col., 2004). El nuevo conjunto de datos fue analizado mediante ACP, utilizando el valor de las clases de tiempo de retención como datos de entrada (Pripp y col., 2000b).

Los datos del contenido individual de AAL también se analizaron mediante ACP, pero en este caso se utilizó la concentración de cada aminoácido como variable independiente (Bergamini y col., 2006a).

Tanto en el análisis de los perfiles peptídicos, como de AAL individuales, el método aplicado varió ligeramente según el efecto a evaluar. Así, para la aplicación del ACP enfocado a evaluar la influencia de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 en la proteólisis secundaria, se utilizó la matriz de covariancia. Esta decisión fue motivada por el hecho de que las variables de los extractos controles, blancos y experimentales presentaban valores medios muy similares. Por el contrario, para evaluar el efecto de la peptidólisis causada por los distintos fermentos primarios (*Lb. helveticus* SF209 o SF138) en la actividad peptidolítica de las cepas en estudio, se aplicó la matriz de correlación, ya que las variables

para los extractos controles y experimentales preparados con ambos quesos (Lh209 y Lh138) fueron heterogéneas en cuanto a las magnitudes que representan.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos).

3. Resultados y Discusión

3.1. Composición química y microbiológica de los fermentos de suero y de los quesos Reggiano

Luego de la incubación a 45°C durante 24 h, el pH y la acidez de los fermentos de suero inoculados con *Lb. helveticus* SF209 y *Lb. helveticus* SF138 fueron $3,53 \pm 0,15$, $103 \pm 5^{\circ}\text{D}$, y $3,30 \pm 0,06$, $109 \pm 1^{\circ}\text{D}$, respectivamente.

Por otra parte, en la Tabla 4.2 se presenta la evolución del contenido de humedad durante la maduración y los recuentos de los lactobacilos termófilos al finalizar la etapa de elaboración, en los quesos Lh209 y Lh138. La humedad de los quesos Reggiano disminuyó con el avance de la maduración como consecuencia de la evaporación de agua; los valores estuvieron dentro del rango establecido por el Código Alimentario Argentino (ANMAT, 2008). El recuento de los lactobacilos termófilos en ambos tipos de quesos fue de $\sim 8 \log_{10}$ UFC/ml, lo que confirmó la presencia de las bacterias del fermento en la concentración deseada.

Tabla 4.2. Recuento inicial de lactobacilos termófilos y evolución del contenido de humedad durante la maduración de quesos Reggiano elaborados con fermentos de suero inoculados con *Lb. helveticus* SF209 (Lh209) y *Lb. helveticus* SF138 (Lh138).

Tipo de queso	Contenido de Humedad (%)			Recuento de lactobacilos termófilos (\log_{10} UFC/g)
	0 días	90 días	180 días	
Lh209	$41,94 \pm 0,99$	$32,08 \pm 0,61$	$29,93 \pm 1,11$	$7,88 \pm 0,14$
Lh138	$42,30 \pm 0,12$	$31,95 \pm 1,01$	$30,31 \pm 0,86$	$8,36 \pm 0,28$

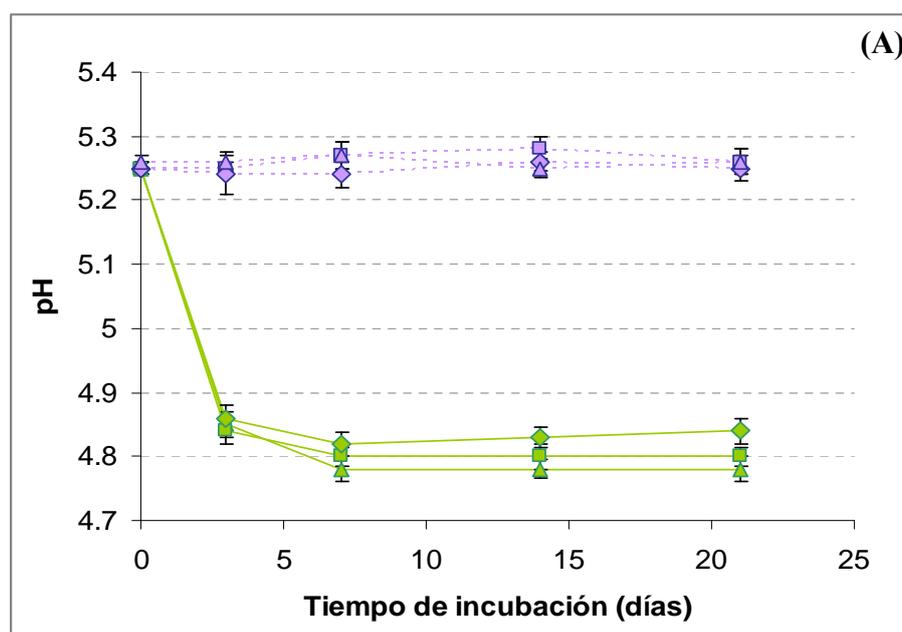
Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

3.2. Evolución del pH en los extractos solubles de queso Reggiano

La evolución del pH de los extractos solubles de queso Reggiano durante la incubación a 34°C por 21 días se presenta en las Figuras 4.1A, 4.1B y 4.2A, 4.2B. Dado que el pH de los extractos se ajustó a 5,25 antes de la incubación, el pH inicial fue similar en todas muestras y los valores estuvieron comprendidos entre 5,23 y 5,26.

En los extractos blancos (Figuras 4.1A y 4.1B) y controles (Figuras 4.2A y 4.2B) elaborados con los quesos Reggiano Lh138 y Lh209 de 0, 90 y 180 días de maduración, el pH se mantuvo constante durante toda la incubación, con valores comprendidos entre 5,24 y 5,30 .

El pH de los extractos solubles de queso Reggiano Lh209 inoculados con *Lb. plantarum* I91 disminuyó 0,4 unidades durante los primeros 3 días de incubación, luego se observó una leve disminución (entre 0,04 y 0,07 unidades) a los 7 días, y finalmente el pH permaneció constante hasta el final del periodo de incubación, con valores comprendidos entre 4,78 y 4,82 (Figura 4.1A). En el caso del extracto de queso Reggiano Lh138, se observaron pequeñas diferencias en la actividad acidificante del adjunto según la edad del queso. En el extracto de queso Reggiano Lh138 de 0 días de maduración, la presencia de *Lb. plantarum* I91 se asoció con un descenso del pH de 0,4 unidades a los 3 días de incubación, seguido por un valor aproximadamente constante hacia los 21 días, alcanzando un pH final de ~ 4,83 – 4,85. En los extractos de quesos Lh138 de mayor edad, la actividad acidificante de *Lb. plantarum* I91 fue algo menor (0,3 unidades a los 3 días) y los valores finales alcanzados (4,96 – 4,97) fueron ~ 0,1 unidades mayores (Figura 4.1B).



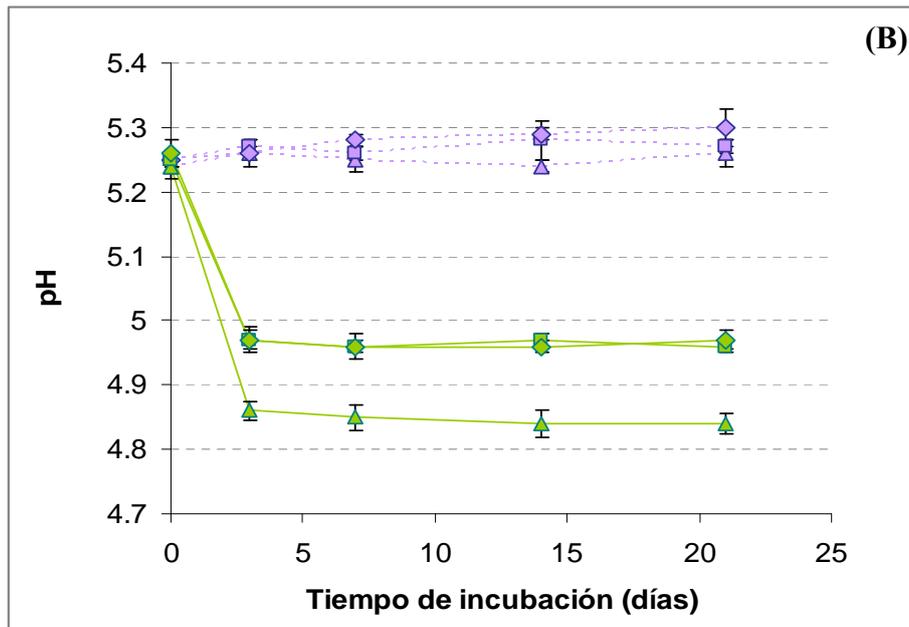


Figura 4.1. Evolución del pH en los extractos solubles blancos (línea de puntos) e inoculados con *Lb. plantarum* I91 (línea continua), preparados con los quesos Reggiano Lh209 (A) y Lh138 (B) de 0 (▲, ▲), 90 (■, ■), y 180 (◆, ◆) días de maduración, durante la incubación a 34°C durante 21 días. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de preparación de extractos.

Con respecto a la actividad acidificante de *Lb. casei* I90, esta fue algo más baja que la verificada para *Lb. plantarum* I91. En los extractos obtenidos de quesos Reggiano Lh209 del inicio y mitad de maduración, el pH disminuyó en 0,2 unidades a los 3 días de incubación, y luego se incrementó 0,1 unidades a los 14 y 21 días, respectivamente, alcanzando valores finales similares (~ 5,10 y 5,11). La disminución del pH fue más lenta en los extractos de queso de 180 días (0,2 unidades a los 7 días), y fue seguida de un valor constante (~ 5,07) sin mostrar un incremento hacia el final de la etapa de incubación (Figura 4.2A). En todos los extractos de queso Reggiano Lh138, independientemente de la edad del queso, *Lb. casei* I90 provocó una disminución en el pH de 0,2 unidades a los 3 días, y luego se observó un leve incremento (0,03 – 0,07 unidades) hacia los 21 días de incubación, con valores finales comprendidos entre 5,07 y 5,16 (Figura 4.2B).

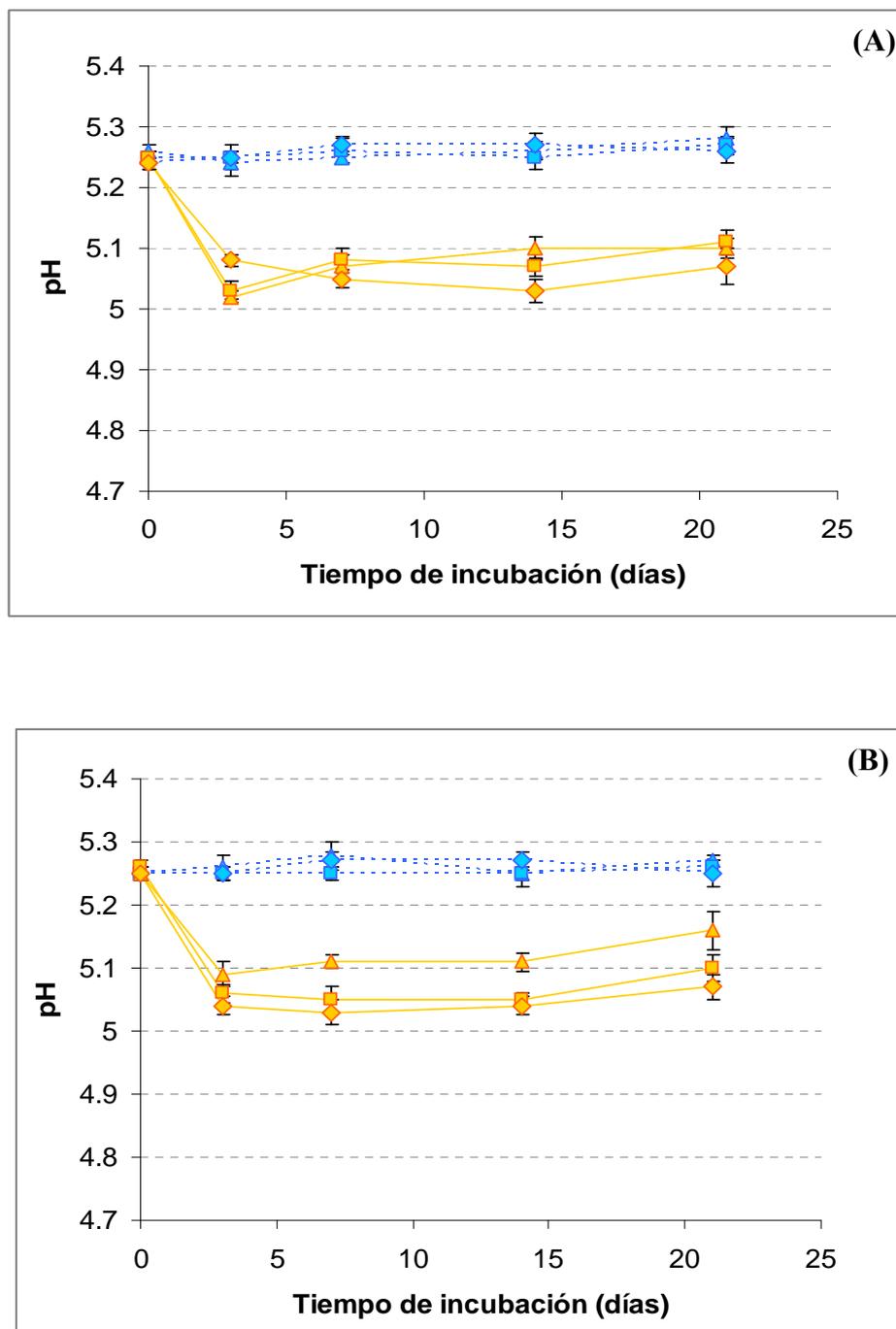


Figura 4.2. Evolución del pH en los extractos solubles controles (línea de puntos) e inoculados con *Lb. casei* I90 (línea continua), preparados con los quesos Reggiano Lh209 (A) y Lh138 (B) de 0 (▲, ▲), 90 (■, ■), y 180 (◆, ◆) días de maduración, durante la incubación a 34°C durante 21 días. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de preparación de extractos.

En general, la velocidad de acidificación de la cepa de *Lb. plantarum* I91 en los extractos preparados con ambos quesos (Lh209 o Lh138) fue similar. Lo mismo se evidenció para la cepa de *Lb. casei* estudiada.

En síntesis, el fermento primario utilizado para la elaboración de los quesos no influyó en la actividad acidificante de los fermentos adjuntos (velocidad y valor final), ya que cada adjunto (*Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90) mostró, en general, patrones similares en ambos tipos de quesos.

La edad del queso, en cambio, sí mostró influencia en la acidificación causada por los adjuntos, lo que podría deberse a diferencias en la concentración de lactosa residual. En estudios preliminares, los extractos de queso del inicio de la maduración mostraron una mayor concentración de lactosa residual, que aquellos preparados con quesos de 90 y 180 días (resultados no incluidos).

Por último, también se encontraron diferencias en la acidificación según la especie y la cepa de fermento adjunto (pH 0,2 a 0,3 unidades más bajos en los extractos inoculados con *Lb. plantarum* I91 respecto a *Lb. casei* I90).

3.3. Recuentos microbiológicos de los extractos solubles de queso Reggiano

En los extractos controles y blancos, tanto de quesos Lh209 como de Lh138, no se detectó crecimiento microbiano (< 10 UFC/ml) durante todo el periodo de incubación. Estos resultados confirman la eficacia de la esterilización por filtración del extracto, y son coincidentes con la tendencia evidenciada por los valores de pH registrados, ya que en dichos medios no se verificó acidificación alguna.

En las Figuras 4.3 y 4.4 se presentan los recuentos de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, respectivamente, en los extractos experimentales preparados con los quesos Reggiano Lh209 (A) y Lh138 (B) de 0, 90 y 180 días de maduración, durante la incubación a 34°C por 21 días.

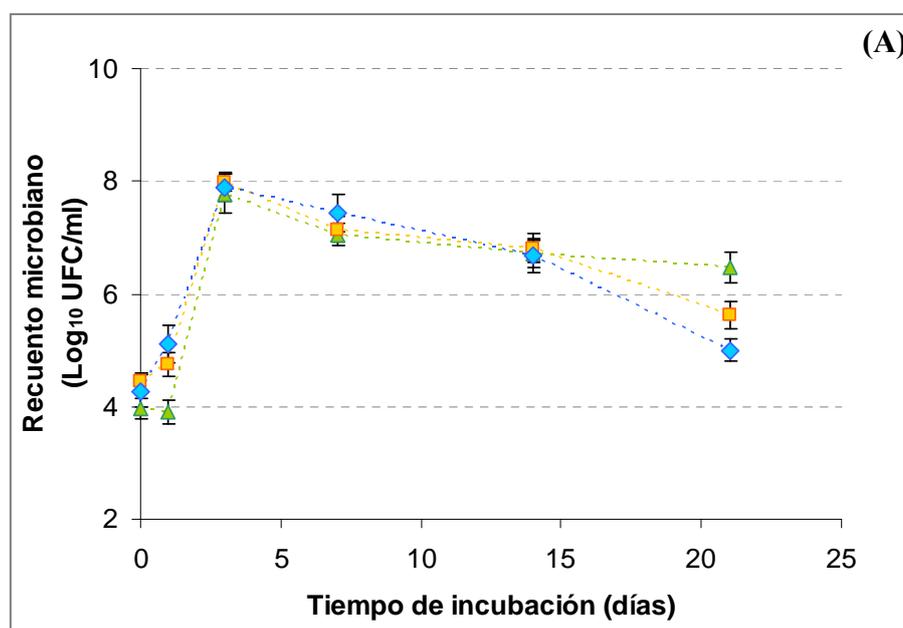
El recuento inicial (tiempo 0) de ambos cultivos adjuntos en los extractos experimentales fue del orden de $\sim 10^4$ UFC/ml.

El recuento de *Lb. casei* I90 en el extracto de queso Reggiano Lh209 de 1 día de incubación fue de $\sim 4 \log_{10}$ UFC/ml cuando se utilizó queso joven, y luego se incrementó en 4 ciclos log alcanzando valores de $\sim 8 \log_{10}$ UFC/ml a los 3 días. Posteriormente, los recuentos disminuyeron gradualmente en $\sim 1,5$ ciclos log hacia el final de la incubación, llegando a valores finales de $\sim 6,5 \log_{10}$ UFC/ml. En los extractos del mismo queso, pero de maduración más avanzada (media y final), el recuento de *Lb. casei* I90 luego de 24 h de incubación fue de

~ 5 log₁₀ UFC/ml. Los recuentos en ambos extractos aumentaron en 3 ciclos log a los 3 días de incubación, alcanzando valores de ~ 8 log₁₀ UFC/ml. Hacia los 21 días de incubación, se observó una disminución en los recuentos de entre 2,5 y 3 ciclos log (Figura 4.3A).

Cuando *Lb. casei* I90 se cultivó en el extracto de queso Lh138 de inicio de maduración, el recuento luego de 1 día de incubación fue de ~ 6 log₁₀ UFC/ml, mientras que en los extractos de la misma muestra madurada 3 y 6 meses, la cepa en estudio alcanzó ~ 7 log₁₀ UFC/ml. A los 3 días *Lb. casei* I90 creció hasta 8 log₁₀ UFC/ml en todos los extractos, permaneciendo luego en estos valores elevados hasta los 7 días de incubación. A partir de este momento se observó una disminución gradual en los recuentos, que fue más pronunciada en los extractos de quesos más jóvenes. En efecto, el recuento final en el extracto de queso Lh138 de final de maduración fue ~ 0,5 y 0,75 ciclos log mayor que en los extractos del mismo queso madurado 0 y 3 meses, respectivamente (Figura 4.3B).

De la comparación del crecimiento de *Lb. casei* I90 en los extractos preparados con los quesos Reggiano Lh209 y Lh138, derivaron las siguientes observaciones: **i)** El uso del fermento primario Lh138 condujo a un medio ambiente más favorable para la cepa de *Lb. casei* I90, dado que los recuentos en los extractos de queso con Lh138 luego de 24 h de incubación fueron ~ 1,5 a 2,5 ciclos log más altos que en los extractos de queso Lh209, y **ii)** También la supervivencia de *Lb. casei* I90 fue mayor cuando se combinó en el modelo alimentario con el uso de Lh138, ya que la velocidad de muerte celular fue menor. Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas durante la etapa de incubación, el número final alcanzado por *Lb. casei* I90 fue similar para los dos fermentos primarios comparados.



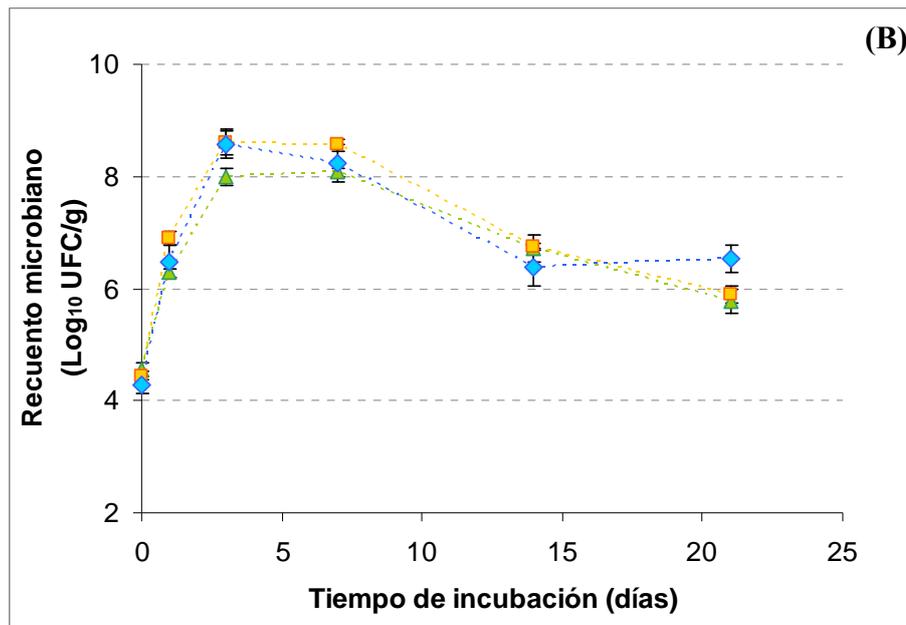


Figura 4.3. Recuento de lactobacilos en los extractos solubles experimentales inoculados con *Lb. casei* I90, preparados con los quesos Reggianito Lh209 (A) y Lh138 (B), de 0 (▲), 90 (■), y 180 (◆) días de maduración, durante la incubación a 34°C durante 21 días. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de preparación de extractos.

En el caso del fermento adjunto de *Lb. plantarum* I91, el recuento luego de 24 h de incubación fue de $\sim 5 \log_{10}$ UFC/ml en el extracto de queso con Lh209, cuando se usó el queso joven, y de $\sim 6 \log_{10}$ UFC/ml en los extractos del mismo queso madurado 3 y 6 meses. La tendencia es coincidente con lo evidenciado por *Lb. casei* I90 para este mismo fermento primario, aunque los valores fueron 1 orden menor en ese caso. *Lb. plantarum* I91 creció hasta valores de $\sim 8 \log_{10}$ UFC/ml en todos los extractos luego de 3 días de incubación. Posteriormente se observó una disminución gradual en los recuentos, con valores finales de $\sim 5 \log_{10}$ UFC/ml en todas las muestras a los 21 días (Figura 4.4A).

En los extractos de queso Lh138, el recuento inicial de *Lb. plantarum* I91 fue siempre de $\sim 6 \log_{10}$ UFC/ml. A los 3 días, los recuentos se incrementaron a $8 \log_{10}$ UFC/ml, y hacia el final del periodo de incubación, se observó una disminución gradual en los recuentos de bacterias viables, que fue más pronunciada en el extracto del queso más joven (Figura 4.4B).

En general, *Lb. plantarum* I91 exhibió siempre el mismo perfil de crecimiento en los extractos preparados con quesos Lh138 y Lh209, aunque se detectaron diferencias notables en los recuentos finales en los extractos de queso del inicio de maduración. En efecto, dichos

recuentos fueron $\sim 1,5$ ciclos log mayores en los extractos de queso elaborados con *Lb. helveticus* SF209.

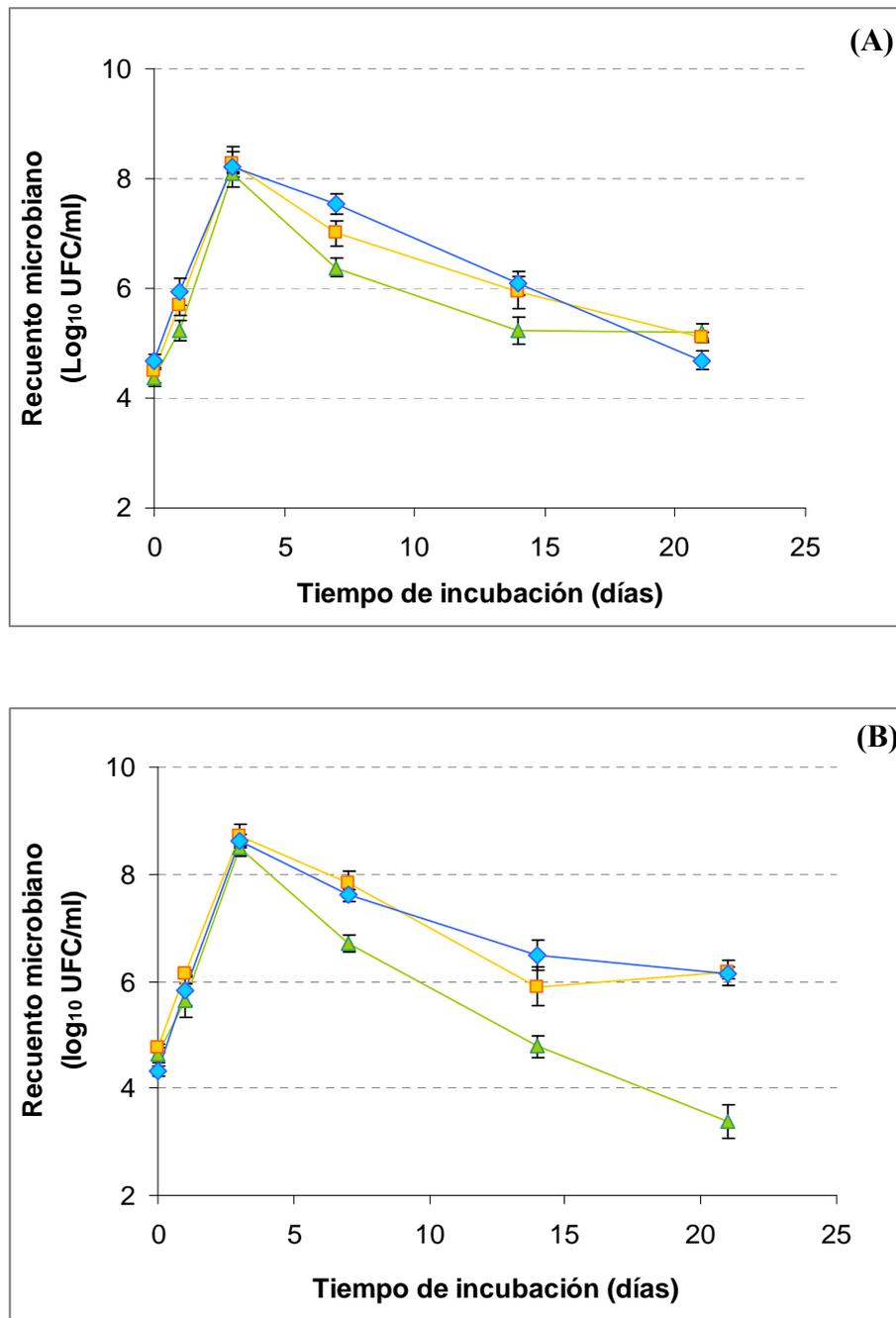


Figura 4.4. Recuento de lactobacilos en los extractos solubles experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91, preparados con los quesos Reggianito Lh209 (A) y Lh138 (B), de 0 (▲), 90 (■), y 180 (◆) días de maduración, durante la incubación a 34°C durante 21 días. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de preparación de extractos.

En síntesis, las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 estudiadas crecieron a valores máximos de $\sim 8 \log_{10}$ UFC/ml en todos los tipos de extractos a los 3 días de incubación, pero luego los recuentos disminuyeron a una velocidad variable dependiendo del tipo de fermento primario utilizado en las elaboraciones (*Lb. helveticus* SF209 o *Lb. helveticus* SF138) y del tiempo de maduración (inicial, medio o final) de los quesos Reggianito utilizados en la preparación de los extractos solubles. La disminución del número de células viables durante la incubación probablemente sea consecuencia de condiciones fisiológicas desfavorables tales como, depleción de la fuente de energía y valores bajos de pH (Kieronczyk y col., 2001).

Los resultados de los análisis microbiológicos indicaron que el uso de fermentos primarios con distinta actividad proteolítica, ya sea, *Lb. helveticus* SF209 o *Lb. helveticus* SF138, no influyó en el desarrollo de los lactobacilos mesófilos estudiados, aunque sí tuvo un cierto efecto en el mantenimiento de la viabilidad.

En un estudio reciente, Kenny y col. (2006) evaluaron el efecto de tres cepas de *Lb. helveticus*, con diferentes grados de capacidad autolítica, en las características fisicoquímicas y sensoriales de queso Cheddar. Los quesos elaborados con la cepa altamente autolítica presentaron un mayor contenido de aminoácidos y de NS-PTA, lo que indicó que las enzimas intracelulares liberadas a la matriz del queso, incrementaron la proteólisis secundaria y aceleraron el proceso de maduración. Sin embargo, los recuentos de las NSLAB adventicias en todos los quesos fueron similares, por lo que la mayor disponibilidad de péptidos y aminoácidos en los quesos elaborados con la cepa autolítica, no afectó el desarrollo de las mismas durante la maduración. Similares resultados ya habían sido informados por Lane y col. (1997a) quienes demostraron que las cepas de *Lactococcus lactis* altamente autolíticas no favorecían el crecimiento de las NSLAB y/o lactobacilos adjuntos, contrariamente a lo sugerido por Thomas (1987).

La hipótesis se desplazó entonces de la capacidad autolítica a la actividad proteolítica como rasgo favorable en un fermento láctico primario para el desarrollo de las NSLAB.

Existen muy pocos antecedentes dedicados al estudio de pares “fermento primario - fermento adjunto” con eje en la actividad proteolítica, pero en ellos se encontró una tendencia que vinculaba actividad proteolítica elevada con mayor desarrollo de las NSLAB (Wilkinson y col., 1994; Hynes y col., 2001a; Di Cagno y col., 2003a).

Di Cagno y col. (2003a) evaluaron el efecto de las proteinasas parcialmente purificadas de *S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris* y *Brevibacterium linens* en el crecimiento de una cepa de *Lb. plantarum*, en leche descremada estéril y en un *slurry* de queso Cheddar. En leche descremada reconstituida, la cepa de *Lb.*

plantarum como cultivo puro creció desde 6 log₁₀ UFC/ml hasta 6,73 log₁₀ UFC/ml luego de la incubación a 30°C durante 37 h. Excepto por *Br. linens*, todas las proteinasas promovieron recuentos finales más altos, aunque con marcadas diferencias entre ellas. En particular, las proteinasas de *Lb. helveticus* y *L. lactis* subsp. *cremoris* disminuyeron la fase de latencia e incrementaron la velocidad de crecimiento y el número final alcanzado por la cepa de *Lb. plantarum*. Por otra parte, en el *slurry* de queso, las proteinasas de *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* incrementaron en ~ 1 orden log el recuento final de *Lb. plantarum* en comparación con el recuento alcanzado en el cultivo puro (sin proteinasas). Asimismo, *S. thermophilus*, y en especial *Lb. helveticus*, disminuyeron la fase de latencia y aumentaron la velocidad de crecimiento de la cepa estudiada. Por otra parte, los autores informaron que a pesar de que *Br. linens* es altamente proteolítico, sus proteinasas no influyeron en el crecimiento de *Lb. plantarum* bajo las condiciones de ensayo.

Con la excepción de este único antecedente, ningún trabajo de investigación ha estudiado la interacción NSLAB - fermentos primarios termófilos. Tampoco se han publicado investigaciones relativas a la flora no fermento en modelos representativos de quesos duros de pasta cocida.

En el presente trabajo, en general, no se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento o número final para los dos fermentos adjuntos ensayados, en los modelos obtenidos con distintos fermentos primarios, lo que indicó que las diferencias en el contenido de péptidos y aminoácidos disponibles en estos extractos, no afectó el crecimiento de los lactobacilos durante la incubación.

Por otro lado, el efecto de las condiciones medioambientales determinadas por la edad del queso (periodo de maduración) tampoco ha sido valorado con anterioridad. Hasta el momento, la variación temporal de la microflora NSLAB durante la maduración de quesos se ha estudiado en un número relativamente escaso de ejemplos (Demarigny y col., 1996; Zárate y col., 1997; Fitzsimons y col., 1999; 2001; Gobetti y col., 2002; Williams y col., 2002; Veljovic y col., 2007). En general se considera que *Lb. plantarum* es un componente de las NSLAB típico del inicio de la maduración del queso (Fitzsimons y col., 1999; 2001; Sánchez y col., 2006; Mangia y col., 2008), y que *Lb. casei* se instala luego del primer mes y predomina en los quesos maduros (Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Mangia y col., 2008).

Los resultados de este trabajo de tesis indican que *Lb. plantarum* I91 alcanzó recuentos similares en modelos representativos de quesos de distintas edades, aunque mantuvo menos su viabilidad en los extractos de queso jóvenes, lo que podría deberse a la mayor acidificación causada por dicha cepa en estos extractos, en los que se detectó una mayor disponibilidad de

lactosa residual. Un patrón similar de crecimiento y disminución en la población de *Lb. plantarum* podría tener lugar en el queso, y es consistente con lo observado previamente para esta especie (Demarigny y col., 1996; Zárate y col., 1997; Fitzsimons y col., 1999; 2001).

En el caso de *Lb. casei* I90, en general, se observó un mejor mantenimiento de la viabilidad, e incluso, un mayor crecimiento de la cepa - en comparación con *Lb. plantarum* I91 - en los extractos de queso de distinta edad. Este comportamiento durante la incubación del extracto esta en acuerdo con la presencia prolongada de esta especie en aislamientos de quesos durante toda la maduración (Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Coppola y col., 2000; Casey y col., 2006; Gala y col., 2008).

3.4. Perfiles peptídicos

En la Figura 4.5 se muestran los perfiles peptídicos de los extractos preparados con los quesos Lh209 y Lh138, sin inocular con lactobacilos adjuntos, y previo a la incubación. Los perfiles peptídicos de los extractos de ambos quesos a 90 y 180 días de maduración mostraron notables diferencias cuali y cuantitativas; las diferencias detectadas entre los extractos de quesos al inicio de la maduración fueron menores, y por lo tanto los perfiles no se incluyeron en la figura. Los extractos de quesos Lh209 presentaron cromatogramas más complejos, caracterizados, en general, por una mayor cantidad de picos y por una mayor área de los picos comunes a ambos extractos de quesos (Lh209 y Lh138). Estos resultados confirmaron las diferencias en las actividades proteolíticas de las cepas de *Lb. helveticus* SF209 y *Lb. helveticus* SF138 reportadas en trabajos anteriores (Candioti y col., 2002; Hynes y col., 2003c).

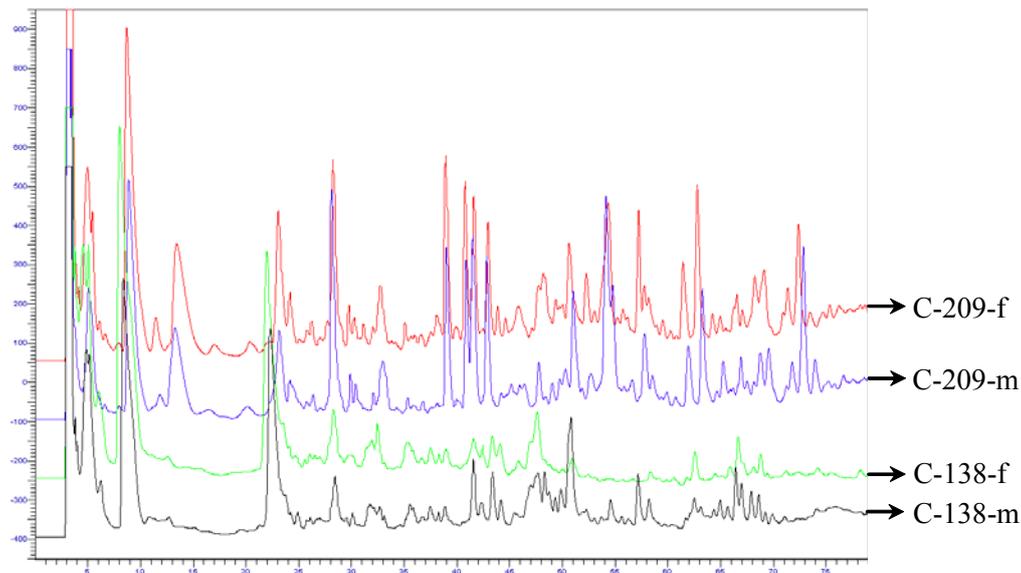


Figura 4.5. Comparación de perfiles peptídicos de extractos de quesos Lh209 y Lh138 de 90 (m) y 180 (f) días de maduración, sin inocular con lactobacilos adjuntos (C: control) y previo a la incubación.

Además, se verificaron importantes cambios en los perfiles peptídicos de los extractos con el incremento del tiempo de maduración de los quesos, lo que puede observarse en las Figuras 4.6A y 4.6B para los extractos preparados con los quesos Lh209 y Lh138, respectivamente.

En los extractos de quesos Lh209, en general se observó un incremento en el número y área de los picos con el tiempo de maduración. Asimismo, desde los 90 a los 180 días de maduración, en general, se observó una disminución del área de los picos localizados en la región hidrofóbica, y un incremento concomitante en el área de los picos que eluyeron en la región hidrofílica de los cromatogramas. Este hecho indica la existencia de un balance entre la formación de péptidos y su subsiguiente degradación.

En los extractos de quesos Lh138, también se observó una disminución en el área de los picos más hidrofóbicos y un incremento en el área de aquellos más hidrofílicos con el tiempo de maduración; sin embargo, en general, el área de la mayor parte de los picos disminuyó con el tiempo de maduración, a diferencia de lo observado en las muestras preparadas con los quesos Lh209. Estas observaciones sugieren que la cepa de *Lb. helveticus* SF138 utiliza los péptidos pequeños presentes en la cuajada para su crecimiento, pero presenta una débil capacidad para generar nuevos péptidos a partir de la hidrólisis de las proteínas y/o polipéptidos.

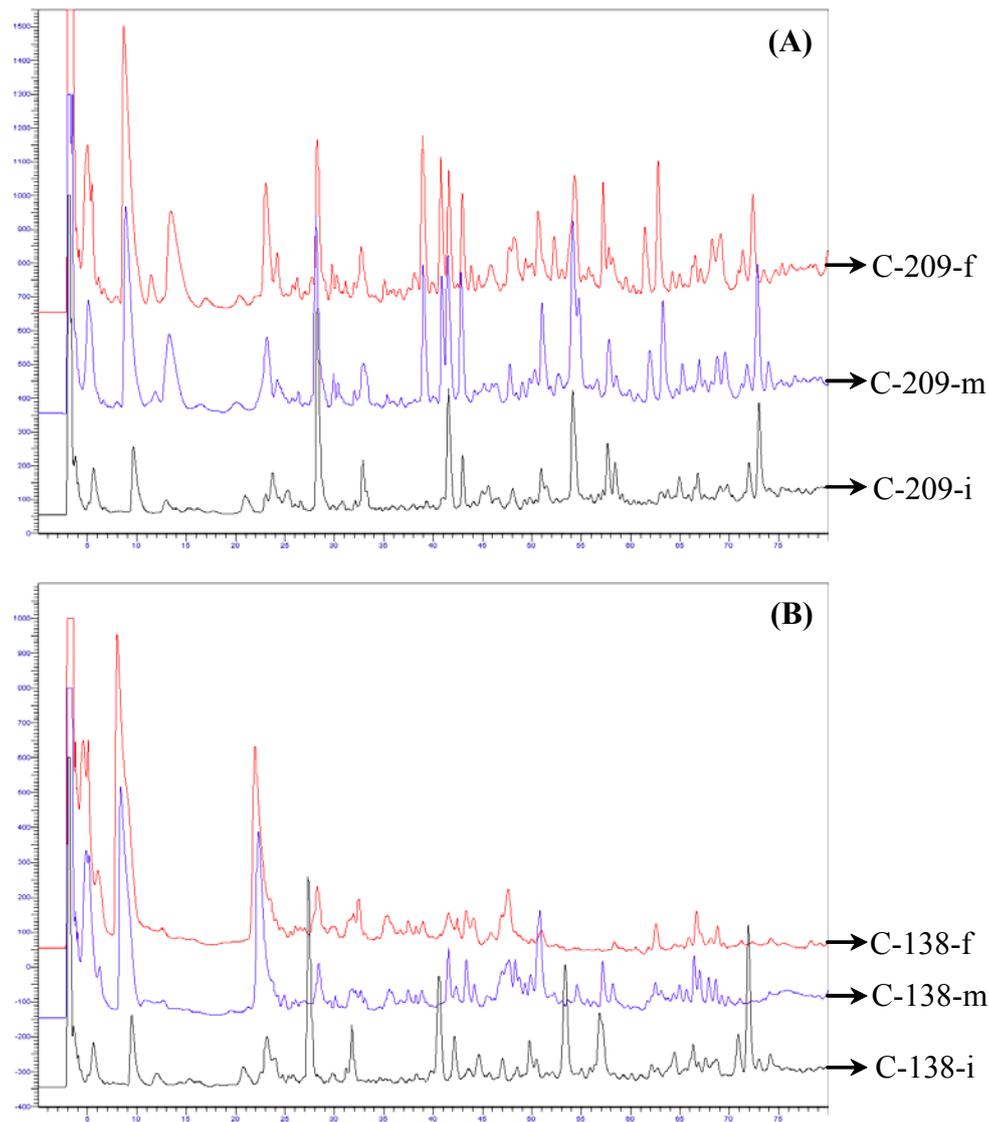


Figura 4.6. Comparación de perfiles peptídicos de extractos de quesos Lh209 (A) y Lh138 (B) de distintas edades, sin inocular con lactobacilos adjuntos (C: control) y previo a la incubación.

A continuación se presentan los resultados obtenidos por comparación de las distintas muestras mediante ACP. Este análisis estuvo fundamentalmente orientado a evaluar dos aspectos vinculados con la actividad peptidolítica de las cepas de lactobacilos mesófilos ensayadas, a saber: **i)** impacto de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 en la proteólisis secundaria, por comparación de los extractos experimentales, controles y blancos, e **ii)** influencia de la peptidólisis causada por las cepas de *Lb. helveticus* SF209 y SF138, en las actividades peptidolíticas de los lactobacilos mesófilos en estudio, mediante comparación de los extractos controles y experimentales preparados con los quesos Lh209 y Lh138.

Para llevar a cabo el análisis se utilizaron en todos los casos 21 variables (clases de tiempo de retención), rotuladas como c1 a c21.

3.4.1. Impacto de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 en los perfiles peptídicos.

a) Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh209 de 180 días de maduración

En el ACP se retuvieron los tres primeros CPs, que explicaron el 77,7% de la variabilidad total de los datos.

Las Figuras 4.7A y 4.7C muestran los gráficos de los *loadings* sobre los ejes CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. Las variables c1, c2, c6, c8, y en menor medida, c12, c18, y c19, predominaron en los extractos controles, es decir, aquellos que no fueron inoculados con lactobacilos mesófilos. Excepto c12, todas las variables aumentaron con el tiempo de incubación en estos extractos. Por otro lado, las variables características de los extractos inoculados con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 fueron c2, c4, c5, c7, c11, c16, y en menor extensión, c3, c9, c13, c14, c15 y c17. A su vez, los extractos inoculados con *Lb. casei* I90 presentaron niveles más altos de c5 y c3, mientras que en las muestras con *Lb. plantarum* I91 predominó la variable c4. Las variables c2, c11, c14 y c17 disminuyeron con el tiempo de incubación, mientras que el resto de las variables aumentaron hacia el final de la etapa de incubación. Finalmente, las variables c10, c11, c15, c20, y en menor medida, c14, c17 y c21, predominaron en los extractos blancos, y mostraron una escasa variabilidad con el tiempo de incubación. El hecho de que algunas variables sean características de los extractos inoculados con adjunto y otras de los extractos controles, es una evidencia de la variación cualitativa entre los perfiles cromatográficos de ambos tipos de muestras. Las variaciones con el tiempo de incubación en cambio, se asocian en general a cambios cuantitativos.

El gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2, evidenció que los extractos controles se separaron de los extractos experimentales (E91 y E90) y de blancos sobre el eje CP1 (Figura 4.7B). A lo largo del CP2, los extractos blancos se separaron de los experimentales; las diferencias fueron mayores para las muestras inoculadas con la cepa *Lb. casei* I90. Estos resultados indicaron un impacto de los adjuntos estudiados sobre la proteólisis secundaria, dado que su inoculación condujo a una modificación de los perfiles peptídicos respecto a los controles y blancos.

Además, sobre el eje CP2 se observó una tendencia a la separación en base al tiempo de incubación entre los extractos experimentales, y algo menor entre los extractos controles. En los extractos controles estas variaciones pueden atribuirse a la actividad proteolítica y peptidolítica de las enzimas no microbianas y/o provenientes de las bacterias, tal como se

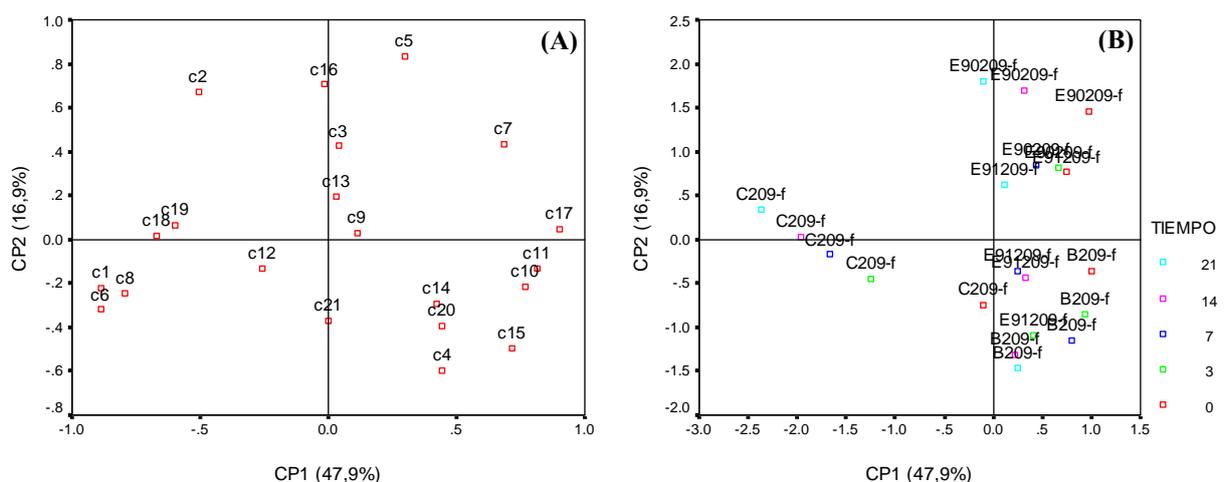
demostró en el capítulo 1. En los extractos experimentales en cambio, a este factor, se le suma el efecto que las cepas de lactobacilos adicionadas ejercen sobre la proteólisis secundaria. Por el contrario, una muy leve variabilidad fue detectada entre los extractos blancos durante la incubación, lo que pone en evidencia la eficacia del tratamiento térmico (70°C – 30 min) para inactivar la mayor parte de las proteasas y/o peptidasas presentes.

También a lo largo de este CP2 se separaron los extractos inoculados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 a diferentes tiempos de incubación. Esta observación indicó que *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 mostraron una actividad peptidolítica distintiva que permitió diferenciar los perfiles peptídicos de los extractos inoculados con uno y otro adjunto.

En el gráfico de CP1 vs. CP3 (Figura 4.7D) se observó fundamentalmente el impacto del tiempo de incubación en los extractos experimentales sobre el eje CP3.

Los *scores* de las muestras sobre CP2 vs. CP3 no se presentan ya que no aportaron información adicional a la observada en los gráficos anteriores. En efecto, sobre el CP2 se observó una separación entre los extractos E90 y E91 de distintos tiempos de incubación, mientras que en el eje CP3, el impacto del tiempo de incubación en dichas muestras.

La actividad peptidolítica que mostraron *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 descrita mediante ACP de los perfiles peptídicos de extractos del mismo queso (Lh209) al inicio (0 días) y a mitad (90 días) de maduración fue similar a la presentada en esta sección, y por lo tanto no se informa. Los mapas de *loadings* y *scores* pueden consultarse en el anexo.



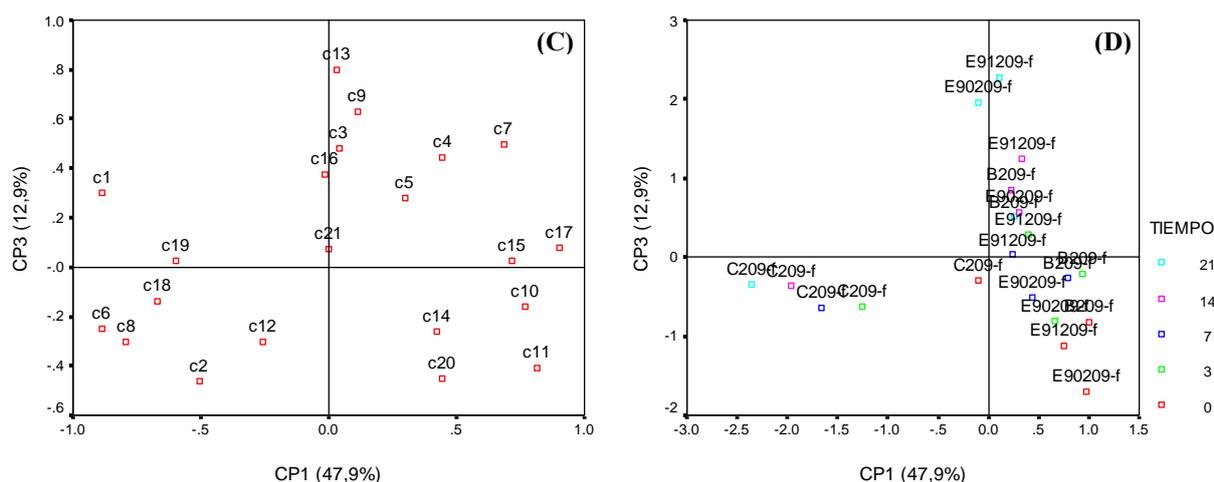


Figura 4.7. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh209 de 180 días de maduración (f). **A** y **C**: Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B** y **D**: Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

b) Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh138 de 180 días de maduración

El ACP extrajo dos CPs que explicaron el 96,1% de la variancia total.

El gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 se presenta en la Figura 4.8A. Los extractos controles, es decir aquellos sin lactobacilos mesófilos, se caracterizaron por presentar niveles altos sólo para la variable c6, que a su vez disminuyó con el tiempo de incubación. Esta característica de las muestras control no es sorprendente teniendo en cuenta la simplicidad y poca cantidad de picos observada en los perfiles peptídicos del extracto de queso Lh138. En los extractos inoculados con fermentos adjuntos, fueron típicas las variables c2 y c5; los niveles de c2 resultaron mayores en las muestras con *Lb. plantarum* I91, mientras que c5 tuvo mayor impacto en los extractos con *Lb. casei* I90. Los extractos E91 también presentaron niveles elevados de la variable c6. Las variables c2 y c6 disminuyeron con el tiempo de incubación, mientras que c5 permaneció constante. Finalmente, las variables que predominaron en los extractos blancos fueron c1, c2, c4, c13, c17, c18, y en menor medida, c7, c12, c14 y c16. Estas variables no experimentaron variaciones con el tiempo de incubación. Las variables c3, c8, c9, c10, c11, c15, c19, c20 y c21 presentaron valores muy bajos en todos los extractos.

El gráfico de los *scores* de CP1 vs. CP2 (Figura 4.8B) reveló una separación de los extractos blancos del resto de las muestras a lo largo del eje CP1. Asimismo, sobre este eje, los extractos inoculados con *Lb. casei* I90 se separaron de los extractos controles y de los experimentales con *Lb. plantarum* I91, excepto a los 21 días de incubación. Sobre el eje CP2, se detectó una separación entre los extractos controles, experimentales E91 y experimentales E90; en este caso también se verificó que luego de 21 días de incubación, todos los extractos eran iguales y ya no se separaban.

Los perfiles de los extractos blancos permanecieron constantes durante la incubación, como lo evidencia el agrupamiento muy concentrado de estas muestras, lo que, una vez más, da cuenta de la baja actividad proteolítica y/o peptidolítica en estas muestras.

En forma similar a lo observado en el caso anterior, en los extractos de queso Lh138 también se observó que las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 impactaron de manera diferente en la proteólisis secundaria, como consecuencia de diferencias en sus actividades peptidolíticas.

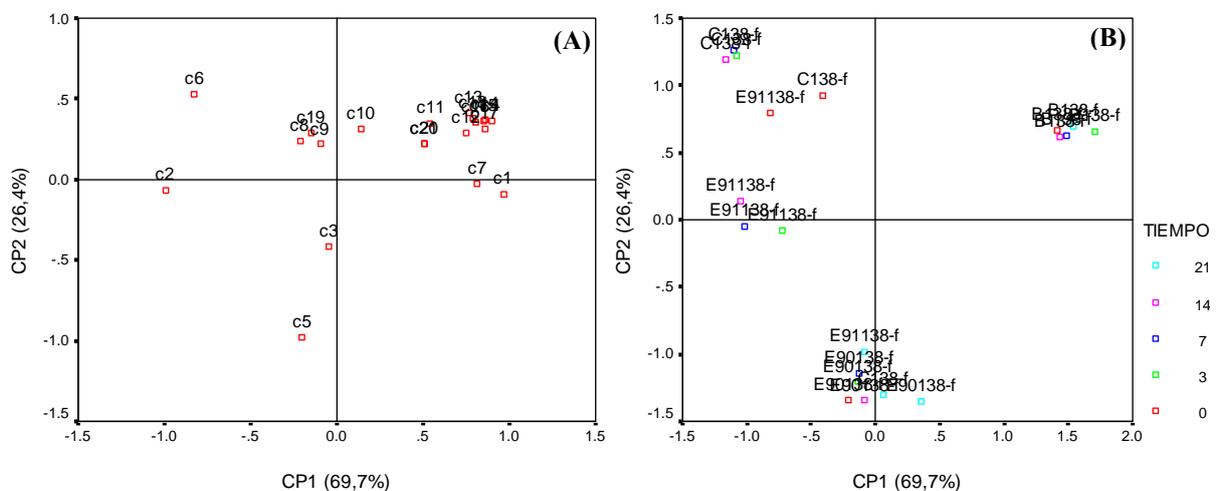


Figura 4.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh138 de 180 días de maduración (f). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

La actividad peptidolítica de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 descrita mediante ACP de los perfiles peptídicos de extractos del mismo queso al inicio (0 días) y a mitad (90 días) de maduración fue similar y no se informa. Los mapas de *loadings* y *scores* pueden consultarse en el anexo.

En estos dos últimos estudios se observó que los extractos controles y experimentales, ya sea preparados con los quesos Lh138 o Lh209 de distintos tiempos de maduración, presentaron perfiles peptídicos muy diferentes durante toda la etapa de incubación, mientras que en los blancos hubo escasa variación, debida a la baja actividad proteolítica y peptidolítica lograda por la inactivación térmica.

En los controles se constató una evolución de la proteólisis diferente para los extractos de quesos elaborados con *Lb. helveticus* SF209 de aquellos con *Lb. helveticus* SF138, lo que reforzó la evidencia de que el equipo enzimático de ambos fermentos primarios y su expresión en el modelo alimentario fueron distintos.

Por otro lado, en los extractos de los quesos maduros, el efecto de ambos lactobacilos adjuntos en la peptidólisis fue más evidente que en los sustratos preparados con quesos del inicio de la maduración. Este resultado indicaría que el rol de los fermentos adjuntos estaría más asociado a la formación de *flavors* típicos y distintivos en las etapas finales de la maduración, que a la producción de las características bioquímicas y sensoriales básicas del producto, que le otorgan su perfil “genérico”. Esta última información viene a confirmar una cualidad de los fermentos adjuntos que, en general, le ha sido otorgada intuitivamente, esto es, su capacidad de “afinar” o “terminar” el *blend* de un queso.

3.4.2. Influencia de la peptidólisis causada por el fermento primario, en las actividades peptidolíticas de los lactobacilos mesófilos en estudio

a) Efecto de la actividad de Lb. casei I90 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 90 días de maduración

Se retuvieron los tres primeros CPs que explicaron el 73,4% de la variancia total.

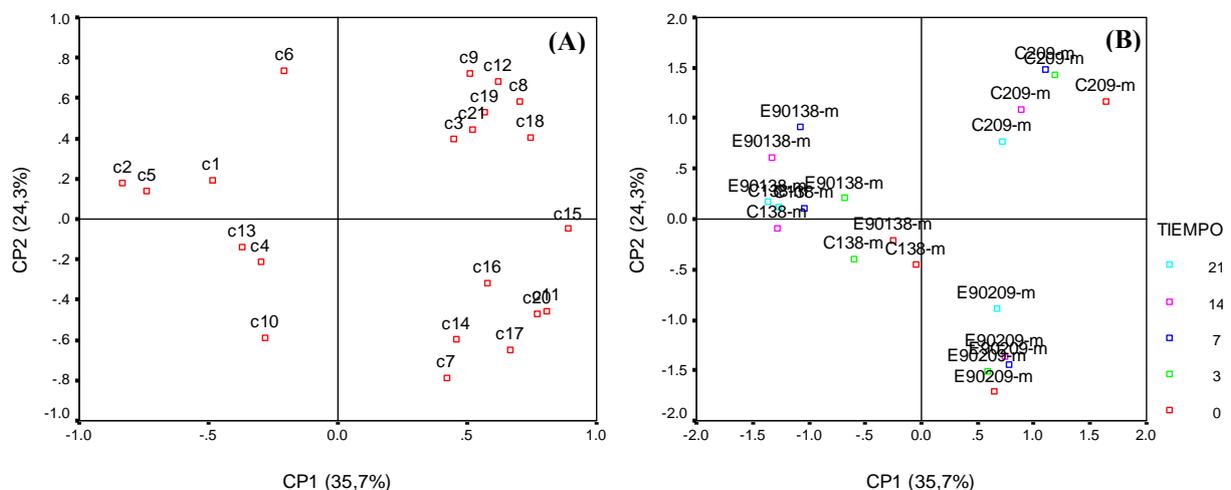
Las Figuras 4.9A y 4.9C muestran los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. Las variables c6, c8, c12, c19, y en menor extensión, c3, c9, c18 y c21, fueron características de los extractos controles del queso Lh209, mientras que las variables c7, c11, c14, c17, c20, y en menor medida c16, predominaron en

los extractos experimentales inoculados con *Lb. casei* I90 y preparados con quesos Lh209 (E90-209). La variable c15 fue característica de ambos extractos.

Por otra parte, en los extractos preparados con quesos Lh138 más el agregado de *Lb. casei* I90 (E90-138), las variables con mayor influencia fueron c5 y c6. En los extractos controles C138 las variables características fueron c4, y en menor extensión, c10 y c13. Las variables c1 y c2 fueron características tanto de los extractos controles como de los experimentales preparados con los quesos Lh138.

Los *loadings* de cada variable reflejan la diversidad encontrada entre los perfiles peptídicos: los extractos de quesos elaborados con fermentos primarios diferentes fueron distintos entre sí, y el agregado del fermento adjunto mesófilo los modificó de un modo particular. Esta observación puede corroborarse mediante el análisis de los gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, que se presentan en las Figuras 4.9B y 4.9D, respectivamente. A lo largo del CP1 los extractos preparados con los quesos Lh209 se separaron de aquellos obtenidos a partir de los quesos Lh138. Por otra parte, sobre el eje CP2 los extractos controles se separaron de los experimentales (E90), siendo estas diferencias mucho más notables en los extractos preparados con los quesos Lh209 (Figura 4.9B). Los extractos controles y experimentales preparados con los quesos Lh138 se separaron fundamentalmente a lo largo del CP3 (Figura 4.9D) que explicó una menor proporción de la variancia total de los datos (13,3%).

Los *scores* de las muestras para CP2 vs. CP3 no se incluyeron dado que aportaron información similar a la observada en los gráficos anteriores.



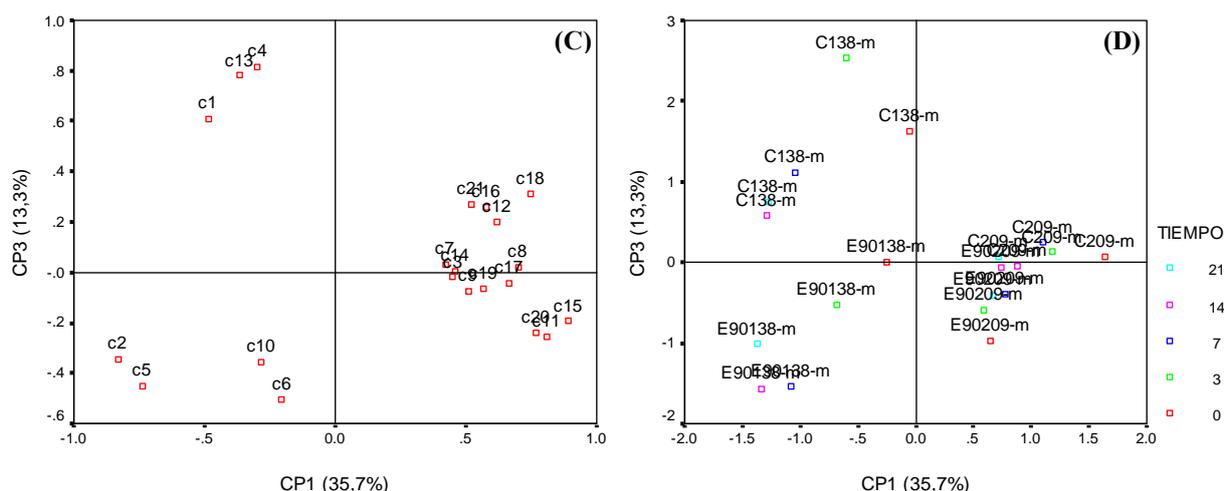


Figura 4.9. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. casei* I90 (E90), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración (m). **A y C:** Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B y D:** Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

b) Efecto de la actividad de *Lb. plantarum* I91 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 90 días de maduración.

Se retuvieron los tres primeros CPs que explicaron el 71,1% de la variabilidad global de los datos.

Los gráficos de los *loadings* para CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3 se presentan en las Figuras 4.10A y 4.10C, respectivamente. Las variables c8, c12, c18, c19, y en menor extensión, c3, c9 y c21, fueron características de los extractos controles C209, mientras que las variables c7, c11, c17, y en menor medida, c10, c14 y c20, predominaron en los extractos experimentales E91-209. La variable c15 impactó tanto en los extractos controles como experimentales preparados con los quesos Lh209. Por otro lado, las variables con mayor influencia en los extractos controles C138 fueron c1, c2, c4, y en menor medida, c5 y c13, mientras que las variables c1, c2 y c6 impactaron de manera significativa en los extractos experimentales E91-138.

El análisis de los gráficos de los *scores* sobre CP1 vs. CP2 (Figura 4.10B) y CP1 vs. CP3 (Figura 4.10D) reveló patrones de separación muy similares a los detectados en el estudio anterior. En efecto, sobre el eje CP1 se separaron los extractos preparados con los quesos Lh209 y Lh138, mientras que en el CP2 los controles se separaron de los experimentales (E91), detectándose diferencias más importantes en los extractos obtenidos con los quesos

Lh209. Los extractos controles y experimentales preparados con los quesos Lh138 se separaron fundamentalmente a lo largo del CP3 (Figura 4.10D) que explicó sólo un 12,2% de la variabilidad total de los datos.

Los *scores* de las muestras para CP2 vs. CP3 no se incluyeron dado que aportaron información similar a la observada en los gráficos anteriores.

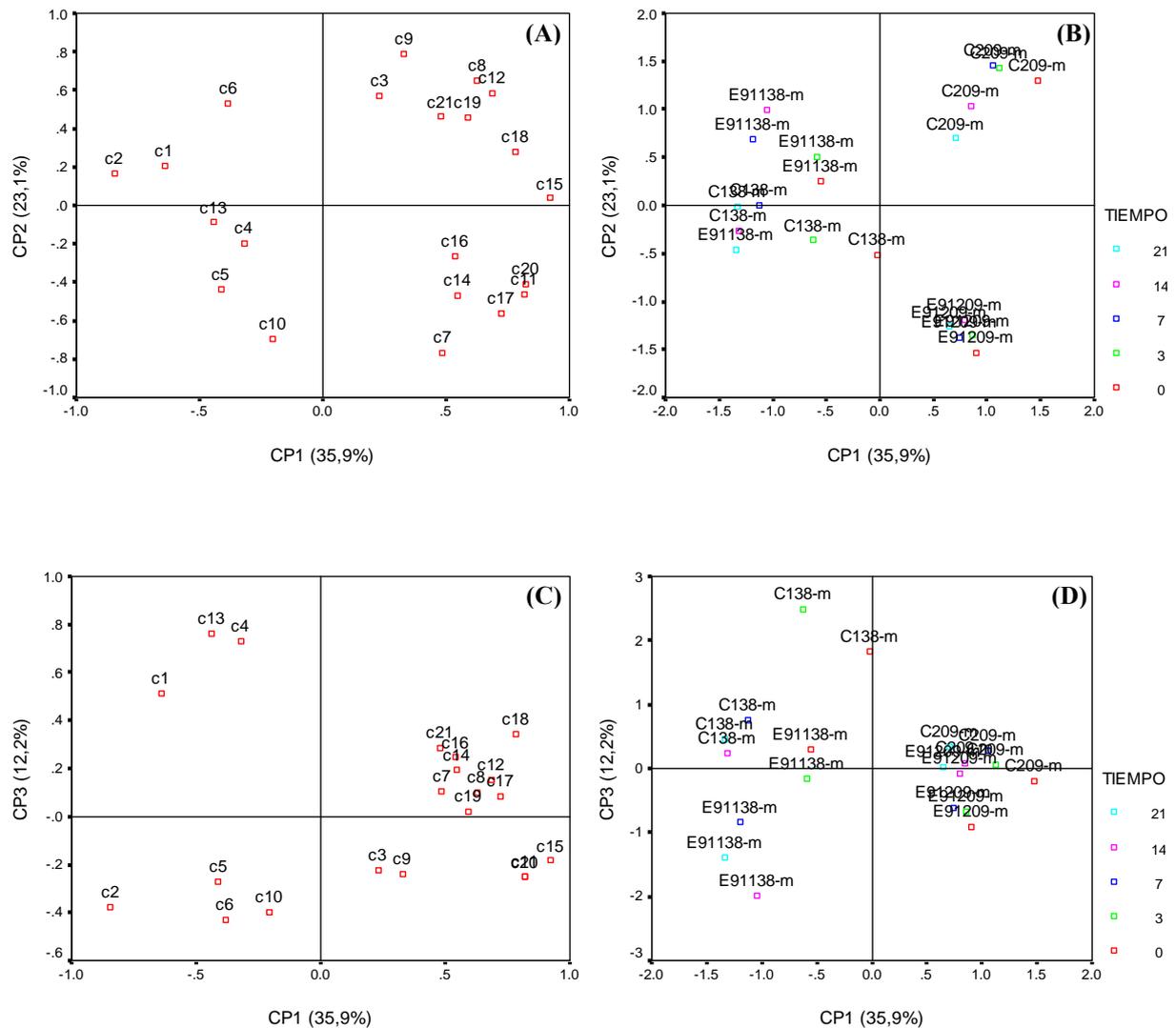


Figura 4.10. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 (E91), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración (m). **A y C:** Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B y D:** Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

Las mayores diferencias en la actividad peptidolítica de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 en combinación con los fermentos primarios *Lb. helveticus* SF138 y *Lb. helveticus* SF209, se encontraron en los extractos de quesos de 90 días de maduración. Las mismas tendencias se hallaron con los mismos quesos al inicio y al final de la maduración. Los gráficos de *scores* y *loadings* correspondientes a estas muestras pueden consultarse en el anexo.

En síntesis, los resultados demostraron que las diferencias en las actividades proteolíticas de los fermentos primarios ensayados (*Lb. helveticus* SF209 y SF138), tenía un impacto en la peptidólisis causada por *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90. En efecto, las diferencias detectadas entre los perfiles peptídicos de extractos controles y experimentales fueron mayores para las muestras preparadas con los quesos Lh209; las diferencias entre extractos con y sin *Lb. casei* I90 o *Lb. plantarum* I91, no siempre fueron tan evidentes, o resultaron de menor magnitud en los extractos de queso Lh138. Estas observaciones pueden entenderse como una consecuencia de la menor disponibilidad de péptidos precursores en los extractos de queso Lh138. Los resultados obtenidos a partir del análisis de los perfiles peptídicos, sugieren un efecto sinérgico entre la actividad metabólica del fermento primario de *Lb. helveticus* SF209 y las cepas de lactobacilos mesófilos ensayadas.

En cuanto a la actividad peptidolítica de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, otras observaciones importantes merecen destacarse. En los extractos preparados con quesos Lh209, *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 mostraron una influencia marcadamente distinta. En los extractos obtenidos a partir de quesos Lh138, también existieron cambios en los perfiles peptídicos de acuerdo al adjunto utilizado, aunque, en general, fueron algo más sutiles.

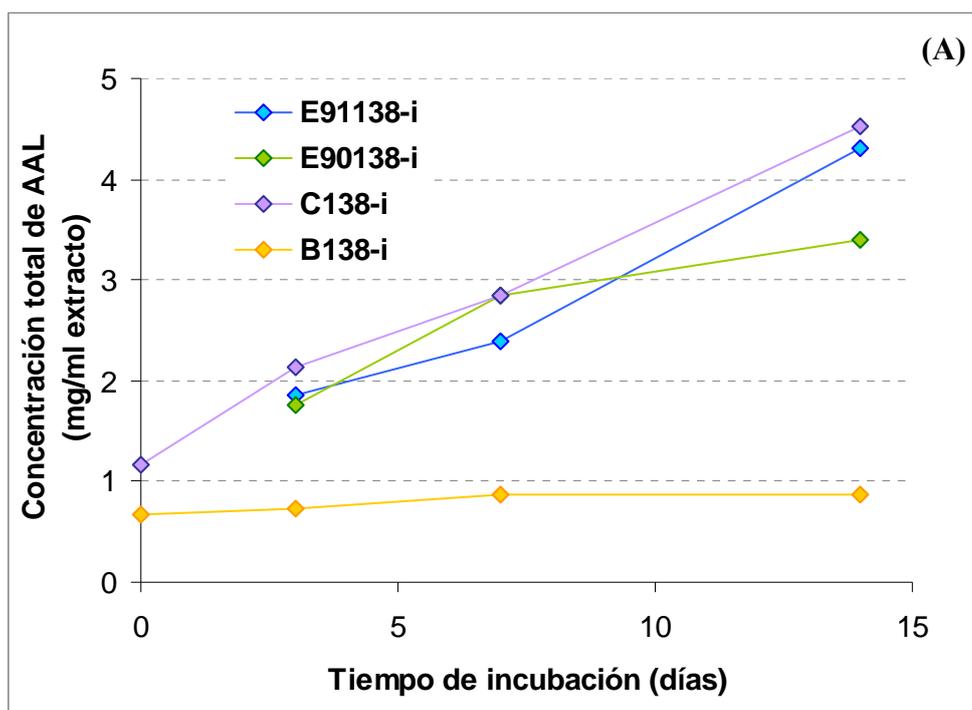
3.5. Aminoácidos libres totales

La evolución del contenido total de aminoácidos durante la incubación a 34°C de los extractos solubles controles, experimentales y blancos, preparados con los quesos Lh138 del inicio, mitad y final de maduración, se muestra en las Figuras 4.11A, 4.11B y 4.11C, respectivamente.

En general, la concentración total de AAL en los extractos blancos preparados con los quesos Lh138 del inicio, mitad y final de maduración, se mantuvo aproximadamente constante durante la incubación a 34°C. En los extractos controles y experimentales, por el contrario, se observó un incremento en los niveles totales de AAL con el tiempo de incubación, cuya magnitud varió según la edad del queso, y en algunos casos, el tipo de tratamiento (con o sin agregado de lactobacilos). El incremento en el contenido total de AAL

en los extractos fue mayor, cuanto menor era el tiempo de maduración del queso empleado para su obtención. En los extractos controles y experimentales preparados con quesos Lh138 de 0 días, la concentración de AAL totales se duplicó durante la incubación por 14 días a 34°C, mientras que, en aquellos preparados con quesos de mitad y final de maduración, el incremento fue de 23 - 29% y de 7 - 12%, respectivamente. A su vez, en los extractos de queso de 180 días, la presencia de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, propició una aceleración de la formación de AAL, respecto a los extractos controles no inoculados.

Por otra parte, en todos los casos (extractos de queso Lh138 de 0, 90 y 180 días), las muestras controles y experimentales exhibieron una mayor concentración de AAL totales que los blancos, luego de 3, 7 y 14 días de incubación, siendo estas diferencias mayores, cuanto menor era la edad del queso. En efecto, en los extractos de queso del inicio de maduración, la concentración total de AAL en los controles y experimentales luego de 14 días de incubación, fue 4 a 5 veces superior que en los blancos, mientras que dicha concentración fue 1,6 – 1,7 veces y 1,2 veces mayor, para los extractos de queso de mitad y final de maduración, respectivamente. En general, en los extractos de queso de 0, 90 y 180 días de maduración, la adición de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, no contribuyó a un incremento en la concentración de aminoácidos durante la etapa de incubación, dado que el contenido total de AAL fue similar en los extractos controles y experimentales, a todos los tiempos de incubación estudiados.



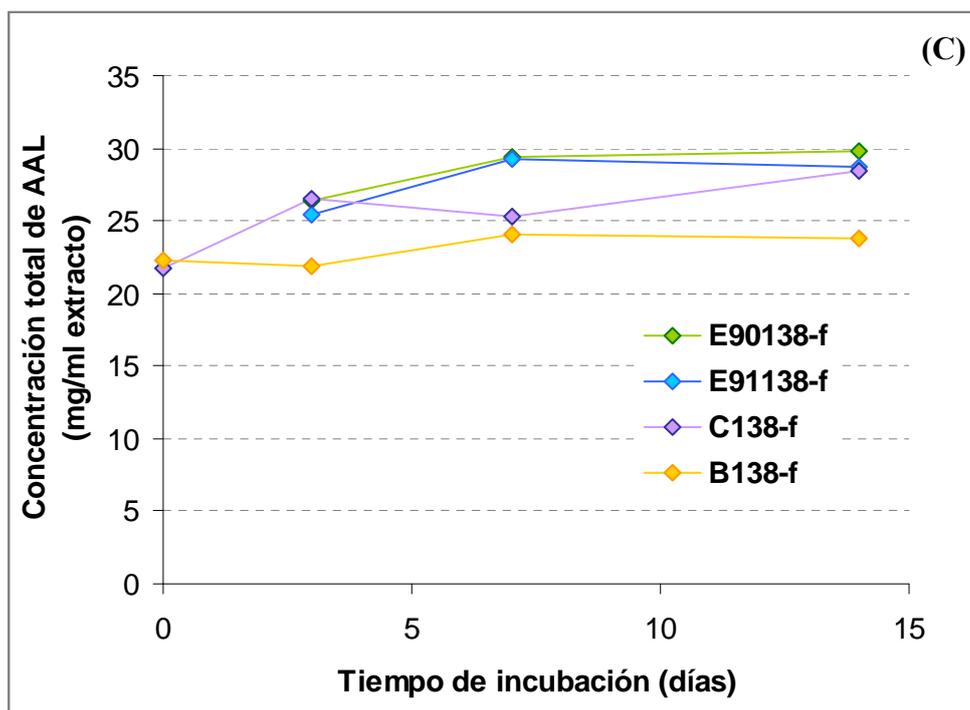
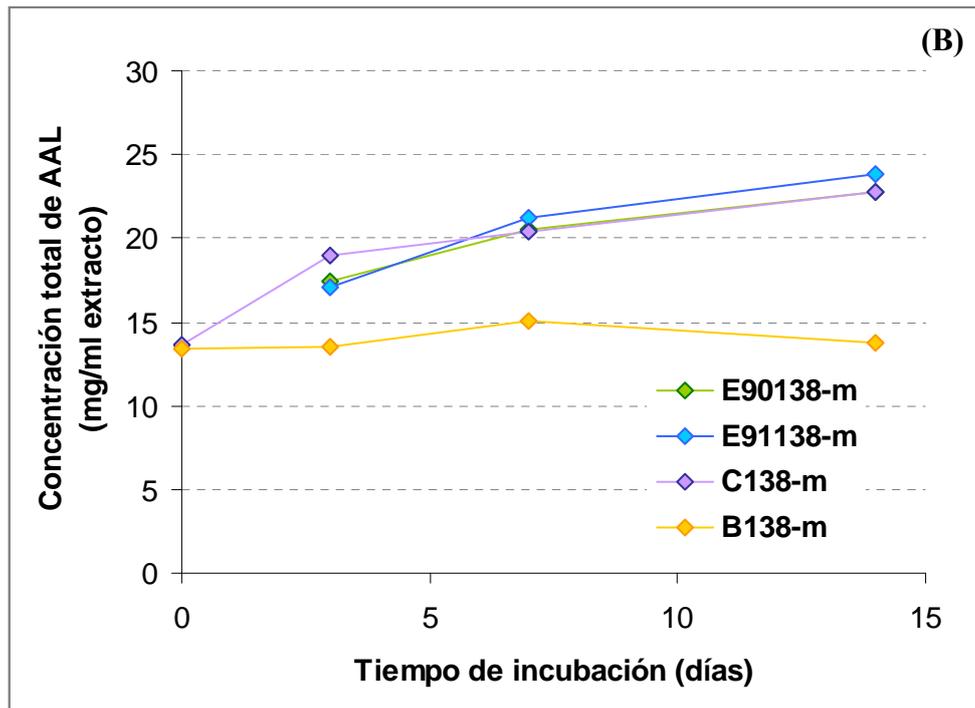


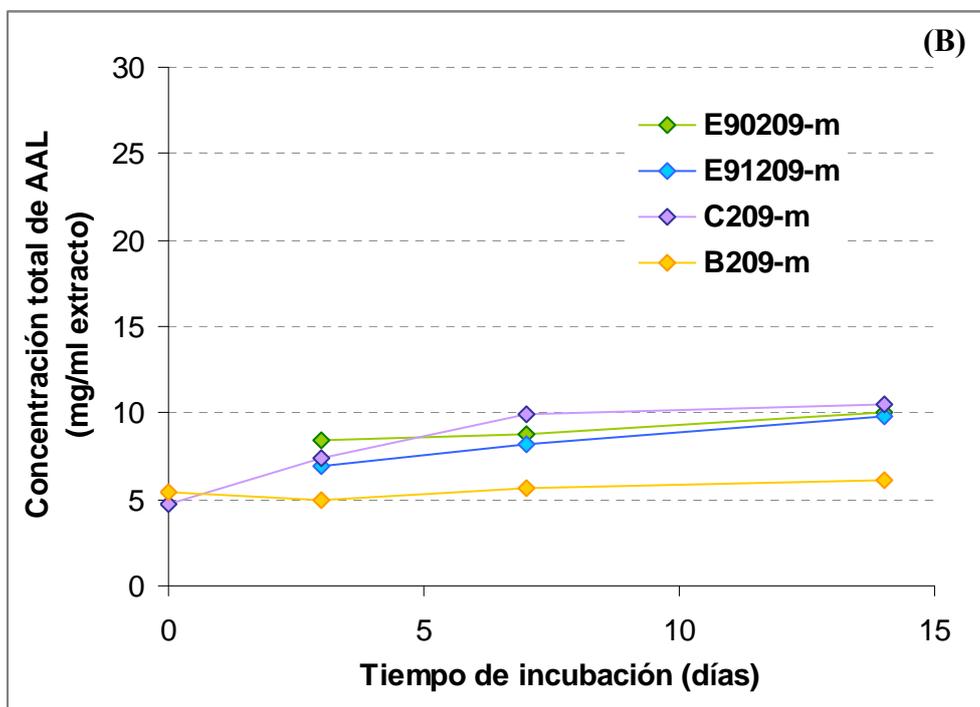
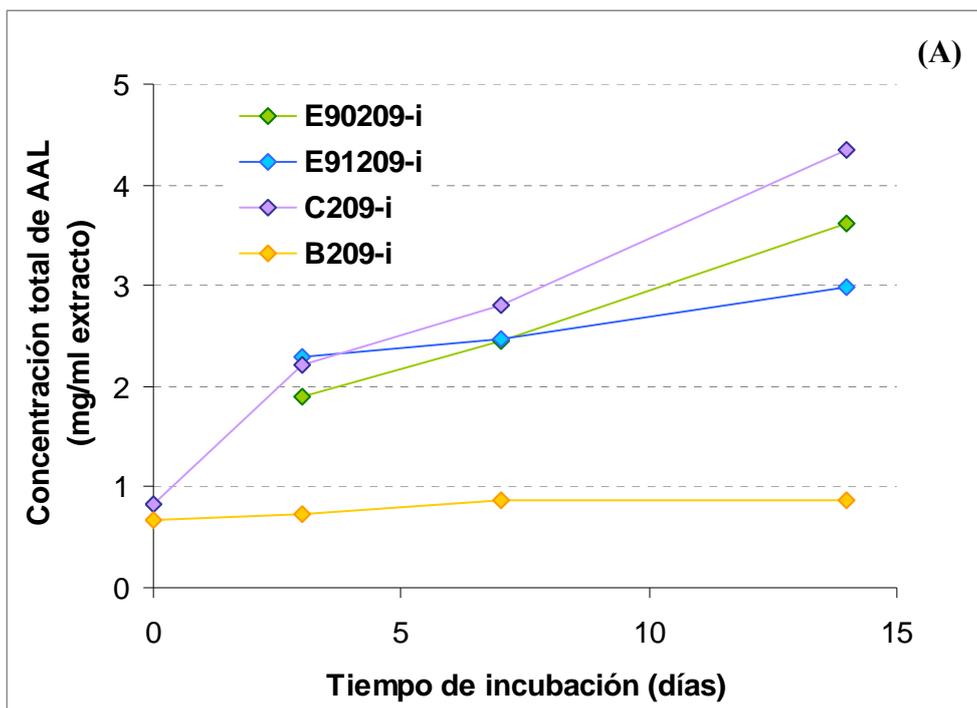
Figura. 4.11. Evolución del contenido total de aminoácidos en los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales, inoculados con *Lb. casei* I90 (E90) y *Lb. plantarum* I91 (E91), preparados con los quesos Reggiano Lh138 de 0 (A), 90 (B), y 180 (C) días de maduración, luego de 3, 7 y 14 días de incubación a 34°C.

En las Figuras 4.12 se muestra la concentración total de AAL durante la incubación a 34°C, de los extractos solubles controles, experimentales y blancos, preparados con los quesos Lh209 del inicio (A), mitad (B) y final (C) de maduración.

Como en el caso anterior, el contenido total de AAL en los extractos blancos preparados con los quesos Lh209 de 0, 90 y 180 días, no presentó variaciones con el tiempo de incubación. Por el contrario, los extractos controles e inoculados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, mostraron un leve aumento en los niveles totales de AAL con el tiempo de incubación, que fue del 23-50% para los extractos de queso del inicio de la maduración, y del 16-30% y 18-25% para los extractos de queso de 3 y 6 meses, respectivamente.

Por otra parte, los extractos blancos presentaron un menor contenido total de AAL, comparado con las muestras controles y experimentales, luego de 3, 7 y 14 días, especialmente en los extractos de queso Lh209 de tiempo de maduración inicial. En efecto, en los extractos de queso del inicio de maduración, el contenido total de AAL en los controles y experimentales luego de 14 días de incubación, fue 4 a 5 veces superior que en los blancos, mientras que dicha concentración fue 1,6 – 1,7 veces y 1,5 veces mayor, para los extractos de queso de mitad y final de maduración, respectivamente.

Finalmente, en los extractos de queso del inicio de maduración, las muestras experimentales, especialmente aquellas inoculadas con *Lb. plantarum* I91, presentaron una concentración total de AAL algo inferior a la de los extractos controles, luego de 14 días de incubación. Por el contrario, en los extractos de queso Lh209 de 3 y 6 meses, las muestras preparadas con y sin adición de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, mostraron niveles similares de AAL totales durante todo el periodo de incubación.



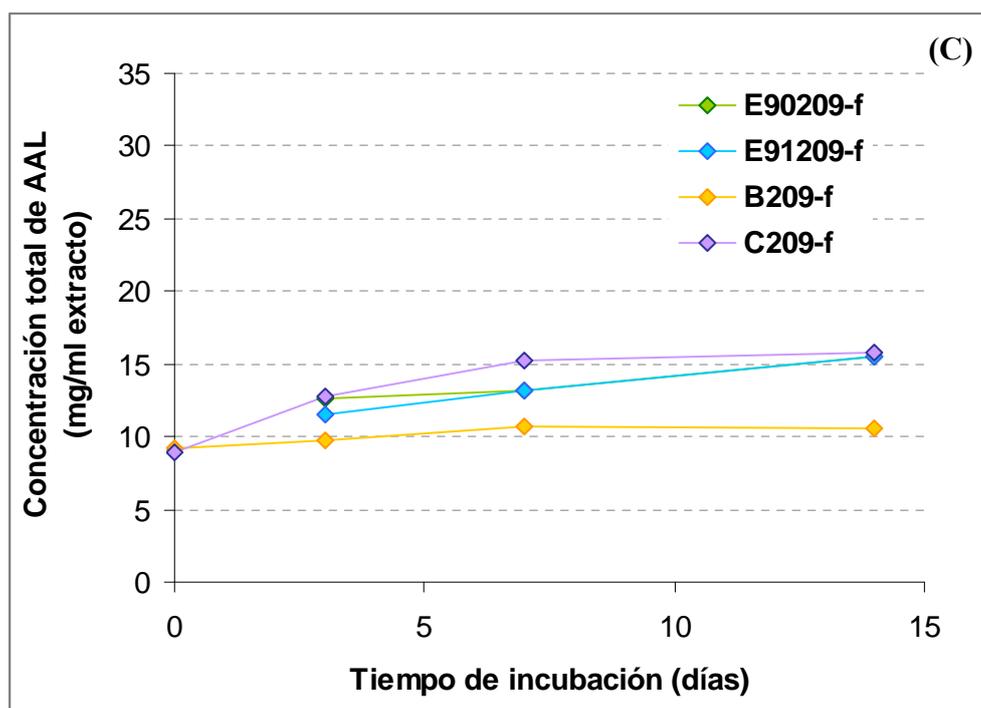


Figura. 4.12. Evolución del contenido total de aminoácidos en los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales, inoculados con *Lb. casei* I90 (E90) y *Lb. plantarum* I91 (E91), preparados con los quesos Reggiano Lh209 de 0 (A), 90 (B), y 180 (C) días de maduración, luego de 3, 7 y 14 días de incubación a 34°C.

A partir del análisis de los datos del contenido total de AAL en los diferentes extractos, derivaron las siguientes observaciones.

En los extractos blancos de quesos Lh138 y Lh209 del inicio, mitad y final de maduración, la concentración total de AAL no mostró variaciones con el tiempo de incubación. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en el análisis de los perfiles peptídicos, y ratifican la eficacia del tratamiento térmico (70°C – 30 min) para inactivar la mayor parte de las proteasas y/o peptidasas presentes.

En ambos tipos de extractos (Lh138 y Lh209), las mayores diferencias en el contenido total de AAL entre las muestras sometidas (blancos) o no (controles y experimentales) a tratamiento térmico, fueron detectadas en los extractos preparados con quesos del inicio de maduración (0 días). Es posible explicar esta observación por el hecho de que los extractos de quesos jóvenes presentan una baja concentración inicial de aminoácidos libres y una gran cantidad de péptidos derivados de las caseínas, fácilmente degradables a aminoácidos por las peptidasas presentes. En los extractos de quesos de mitad y final de maduración, el contenido inicial total de AAL es más elevado como consecuencia del avance de la proteólisis, y por lo

tanto, es esperable que la producción de AAL por parte de los microorganismos durante la incubación sea menor, ya que éstos utilizan los aminoácidos disponibles en el medio para su desarrollo (Ardö y col., 2002). Se ha informado que en un medio rico en péptidos y aminoácidos, se reprime la transcripción de genes de varias peptidasas en LAB (Guédon y col., 2001). Además, el contenido relativamente elevado de lactosa residual en los extractos de quesos del inicio de maduración favorece que las células bacterianas se encuentren en un estado metabólico más activo.

En general, en ambos tipos de extractos (Lh138 y Lh209), la evolución del contenido total de aminoácidos y el valor detectado al final de la etapa de incubación, fueron similares en extractos de queso controles e inoculados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91. En el modelo de queso miniatura, las cepas de *Lb. casei* I90 y especialmente *Lb. plantarum* I91, impactaron en la proteólisis secundaria a través de la modificación de los perfiles peptídicos y del incremento en la concentración total de aminoácidos. En el modelo de extracto soluble de queso Reggianito, el impacto de las cepas ensayadas se verificó a nivel de los perfiles peptídicos, no así en el contenido total de aminoácidos. Las diferencias observadas en uno y otro modelo, están probablemente relacionadas a la diversa capacidad proteo/peptidolítica del fermento primario y a las condiciones medioambientales. En efecto, *S. thermophilus* es una de las LAB menos proteolíticas, y una matriz obtenida con este fermento puede actuar como un mejor background o “blanco” para evidenciar la actividad de los lactobacilos mesófilos. *Lb. helveticus*, por el contrario, ha sido caracterizada como la más proteolítica de las especies de LAB utilizadas en quesería, y la actividad peptidolítica de los fermentos de lactobacilos mesófilos puede quedar, en consecuencia, enmascarada en los ecosistemas lácteos que lo contienen. Además, se ha demostrado que la estabilidad y actividad de las enzimas peptidolíticas son influenciadas por diferentes factores, entre los que se mencionan: actividad acuosa, temperatura, pH, concentración de sal y de CaCl₂, disponibilidad de nutrientes, etc. (Weimer y col., 1997; Laan y col., 1998; Gobetti y col., 1999a; 1999b). El extracto soluble de queso Reggianito representa un medio ambiente más hostil que los quesos Cremoso miniatura, dado que presenta mayor contenido de sal, menor pH, y menor disponibilidad de carbohidratos, y por lo tanto, es posible que bajo estas condiciones, las enzimas peptidolíticas de los lactobacilos mesófilos en estudio hayan presentado menor estabilidad y/o actividad.

Como era de esperar, en ambos tipos de extractos la concentración total de AAL varió según el tiempo de maduración del queso utilizado en su preparación. En efecto, el contenido total de AAL fue: Lh138-f > Lh138-m >>> Lh138-i y Lh209-f > Lh209-m >> Lh209-i. Luego de 14 días de incubación, la concentración total de AAL en los extractos controles y

experimentales preparados con quesos Lh209 y Lh138 de final de maduración, fue 3,6 - 5,2 veces y 6,5 – 8,5 veces mayor, respectivamente, que en los extractos de queso de 0 días de maduración.

En general, los extractos preparados con los quesos Lh138 y Lh209 del inicio de la maduración, presentaron niveles similares de AAL totales. Por el contrario, en extractos de quesos de 3 y 6 meses de maduración se encontraron diferencias notables en el contenido total de AAL en base al tipo de queso, Lh138 o Lh209. En efecto, la concentración total de AAL en los extractos preparados con quesos Lh138 de mitad y final de maduración, duplicó los valores detectados en extractos de queso Lh209 de igual tiempo de maduración.

3.6. Aminoácidos libres individuales

Los datos del contenido individual de cada aminoácido en los distintos extractos fueron analizados mediante ACP, a fin de facilitar la interpretación de los resultados y detectar similitudes y/o diferencias entre muestras. Al igual que en los perfiles peptídicos, con este análisis se buscó evaluar la contribución de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 a la formación de aminoácidos (por comparación de los extractos experimentales, controles y blancos), y la influencia de la peptidólisis causada por el fermento primario (*Lb. helveticus* SF209 y SF138), en las actividades peptidolíticas de los lactobacilos mesófilos en estudio (por comparación de los extractos controles y experimentales preparados con los quesos Lh209 y Lh138).

3.6.1. Impacto de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 en la formación de aminoácidos

a) Extractos controles, blancos y experimentales (Lb. casei I90 y Lb. plantarum I91) preparados con quesos Lh209 de 180 días de maduración

En el ACP se retuvieron los dos primeros CPs, que explicaron el 93,4% de la variabilidad total de los datos.

En la Figura 4.13A se presenta el gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre los ejes CP1 vs. CP2. Todos los aminoácidos analizados, que constituyen las variables del ACP, presentaron buena correlación con el eje CP1, con la única excepción de la serina. Por otro lado, glicina, histidina, glutámico y aspártico, mostraron cierta influencia sobre CP2.

El gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2, se muestra en la Figura 4.13B. En general, a lo largo del CP1 se observó una tendencia a la separación en base al tiempo de incubación en los extractos controles e inoculados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91. En estos extractos, los aminoácidos con alto impacto en CP1 aumentaron con el tiempo de incubación, con lo que predominaron en las muestras de 14 días. Sobre el eje CP2, se detectó una tendencia a la separación de acuerdo al tipo de tratamiento (con o sin lactobacilos). En efecto, a los 7 días de incubación, los extractos controles se separaron de los extractos experimentales (E90 y E91), quienes presentaron, respecto a los primeros, una concentración levemente inferior de glicina, histidina, arginina, alanina, prolina, valina, metionina, lisina, isoleucina y leucina. La disminución en la concentración de estos aminoácidos en los extractos inoculados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, coincide con una reducción en los recuentos de estas bacterias a los 7 días de incubación. Por tal motivo, es probable que la disminución en el contenido de ciertos aminoácidos esté relacionada a la utilización de los mismos por parte de las cepas de lactobacilos como fuente de energía y de nitrógeno, en un medio posiblemente desprovisto de nutrientes a esa altura. Por otra parte, luego de 14 días de incubación, los extractos inoculados con *Lb. plantarum* I91, tendieron a separarse de los extractos con *Lb. casei* I90, que presentaron gran similitud con los controles. En esta etapa, los aminoácidos glicina y tirosina predominaron en los extractos preparados con *Lb. plantarum* I91, mientras que la treonina y la prolina fueron característicos de los extractos controles e inoculados con *Lb. casei* I90.

Con excepción de la serina, la concentración de todos los aminoácidos ensayados, en especial, aspártico, histidina, prolina, lisina, leucina, y fenilalanina, fue inferior en los extractos blancos respecto de los extractos controles y experimentales. Asimismo, en los extractos blancos, la concentración de la mayoría de los aminoácidos presentó una menor variabilidad con el tiempo de incubación, lo que también se vio reflejado en el gráfico de los *scores* (Figura 4.13B).

La actividad peptidolítica que mostraron *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, descrita mediante ACP de los perfiles de AAL individuales de extractos del mismo queso (Lh209) al inicio (0 días) y a mitad (90 días) de maduración, fue similar a la presentada en esta sección, y por lo tanto no se informa. Los mapas de *loadings* y *scores* pueden consultarse en el anexo.

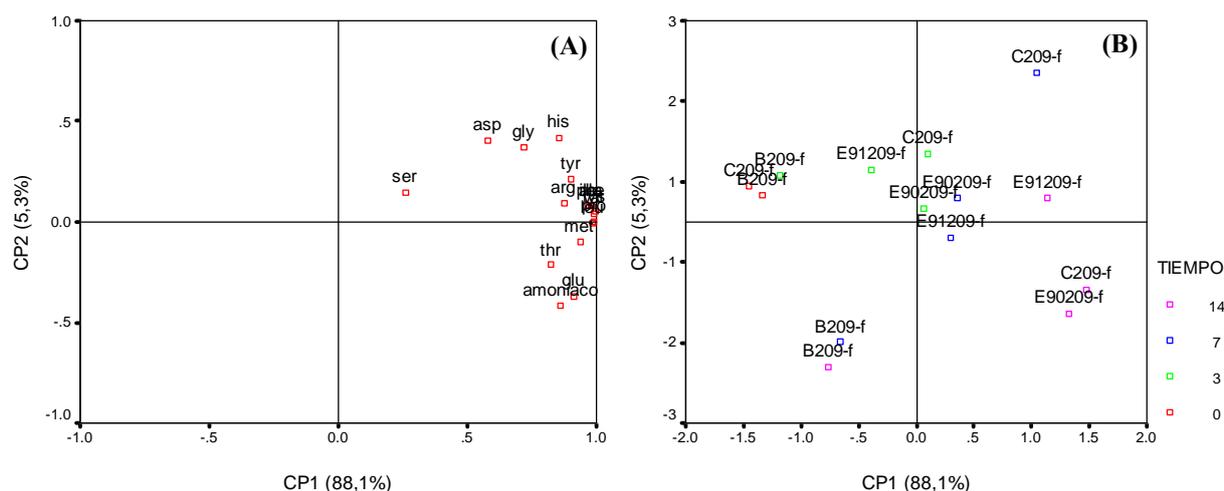


Figura 4.13. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh209 de 180 días de maduración (f). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

b) Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh138 de 180 días de maduración

El ACP extrajo tres CPs, CP1, CP2 y CP3, que explicaron, respectivamente, el 59,3%, 19% y 12,6% de la variabilidad total de los datos.

Los gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 (Figura 4.14A) y sobre CP1 vs. CP3 (Figura 4.14C), reveló que todos los aminoácidos, excepto arginina, histidina y tirosina, presentaron una elevada correlación con CP1, mientras que, sólo la arginina, y en menor medida la isoleucina, la tirosina y la histidina, impactaron significativamente sobre el CP2.

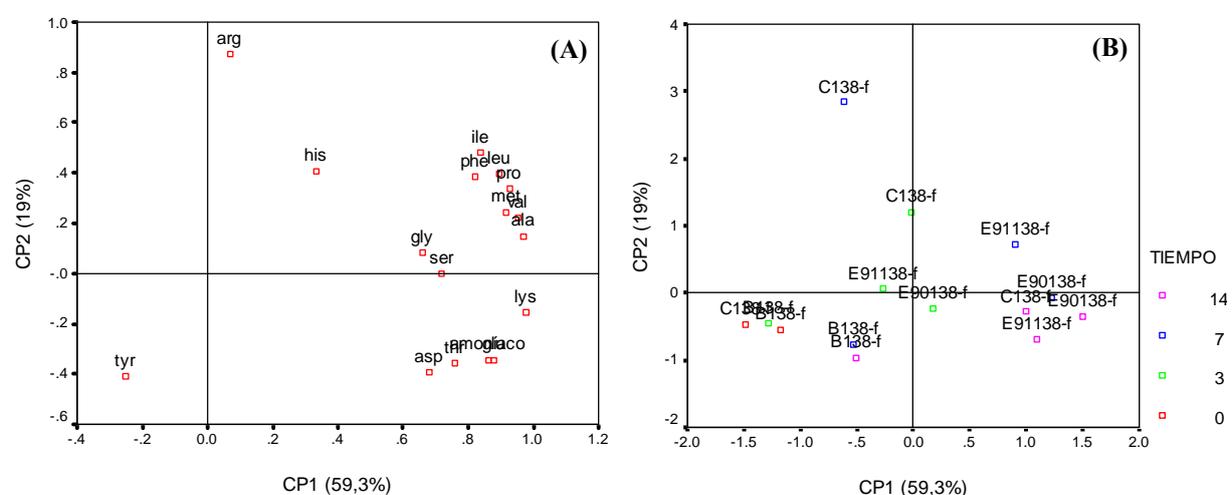
En la Figura 4.14B se presenta el gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2. Sobre el eje CP1 se observó una separación de las muestras en base al tiempo de incubación, en los extractos controles y experimentales. Excepto por la tirosina, histidina y arginina, el resto de los aminoácidos exhibió un incremento en su concentración en los extractos controles e inoculados con *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, con el tiempo de incubación. En estos extractos, la concentración de tirosina permaneció constante, mientras que, los niveles de histidina y arginina aumentaron durante los primeros 7 días, y luego disminuyeron hacia el final de la etapa de incubación. Asimismo, sobre el eje CP1, los extractos controles se separaron de los extractos inoculados con cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, a los 7

días de incubación; estas mismas diferencias fueron observadas a lo largo del eje CP2, a los 3 días, y especialmente, a los 7 días de incubación. Las mayores diferencias entre controles y experimentales de 3 días, fueron detectadas en las concentraciones de los aminoácidos aspártico y serina, que fueron mayores en los extractos inoculados con las cepas en estudio. A los 7 días de incubación, las diferencias entre controles y experimentales fueron mayores, ya que, los primeros presentaron una concentración notablemente superior de arginina, y los últimos se caracterizaron por contener un mayor contenido de aspártico, glicina, histidina, treonina, valina, serina, lisina y alanina. Luego de 14 días de incubación, la concentración de histidina, aspártico y serina fue superior en los extractos experimentales, en comparación con los extractos no inoculados, pero el ACP no reveló diferencias entre estas muestras.

La concentración de todos los aminoácidos, con excepción de la tirosina y el glutámico, fue menor en los extractos blancos, en comparación con los extractos controles y experimentales. Asimismo, el contenido de la mayoría de los aminoácidos en los extractos blancos permaneció aproximadamente constante con el tiempo de incubación, lo que también se reflejó en la escasa variabilidad observada entre estas muestras en el gráfico de los *scores* (Figura 4.14B).

La distribución de las muestras sobre los ejes CP1 vs. CP3 (Figura 4.14D) arrojó un dato adicional a lo observado en el gráfico de CP1 vs. CP2. En efecto, a lo largo del eje CP3 se observó una separación entre extractos experimentales de 7 y 14 días de maduración, lo que no había sido detectado en el gráfico anterior.

Los *scores* de las muestras sobre CP2 vs. CP3 no se presentan, dado que la información arrojada fue similar a ya observada.



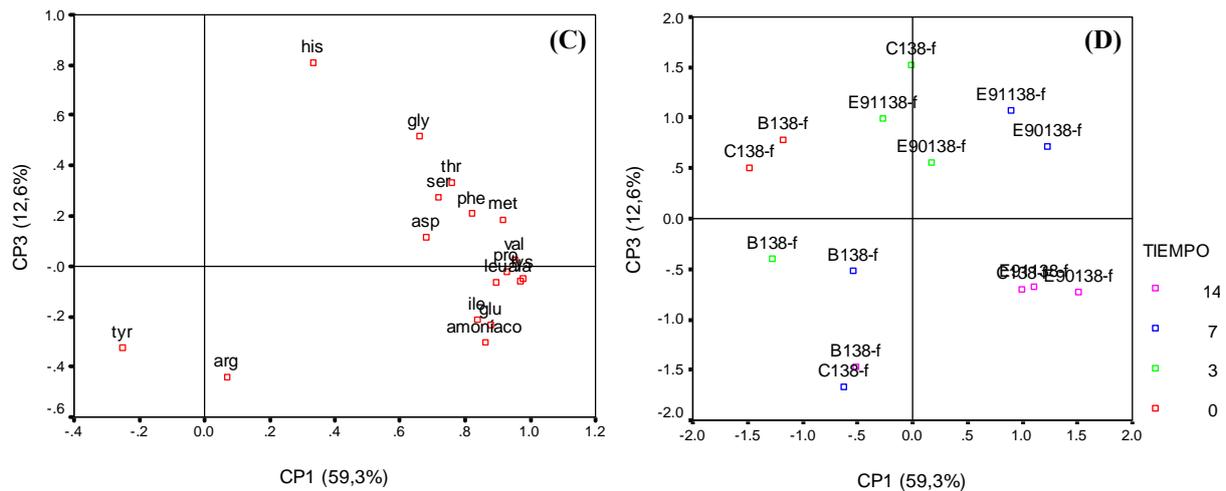


Figura 4.14. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh138 de 180 días de maduración (f). **A** y **C**: Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B** y **D**: Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

La actividad peptidolítica de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 descrita mediante ACP de los perfiles de AAL individuales de extractos del mismo queso al inicio (0 días) y a mitad (90 días) de maduración fue similar y no se informa. Los mapas de *loadings* y *scores* pueden consultarse en el anexo.

En síntesis, la concentración de la mayor parte de los aminoácidos en los extractos controles y experimentales, ya sea preparados con los quesos Lh138 o Lh209 de distintos tiempos de maduración, se incrementó durante la incubación a 34°C, mientras que en los blancos se observó una escasa variación, a raíz de la baja actividad proteolítica y peptidolítica lograda por la inactivación térmica.

En general, *Lb. plantarum* I91 mostró un impacto mayor sobre los perfiles de AAL individuales que la cepa *Lb. casei* I90 en los extractos de queso Lh209, mientras que en los extractos de queso Lh138, la contribución de ambos fermentos adjuntos al perfil de aminoácidos fue similar.

Por otra parte, ambos extractos controles (Lh209 y Lh138) presentaron perfiles de AAL muy diferentes, lo que una vez más pone en evidencia las diferencias existentes entre ambas cepas de *Lb. helveticus* en cuanto a sus actividades enzimáticas y su expresión en el modelo alimentario.

3.6.2. Influencia de la peptidólisis causada por el fermento primario, en la producción de aminoácidos libres por los lactobacilos mesófilos en estudio.

a) Efecto de la actividad de *Lb. casei* I90 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 90 días de maduración

Se retuvieron los dos primeros CPs que explicaron el 95,2% de la variabilidad global de los datos.

Todos los aminoácidos presentaron valores elevados de *loadings* sobre CP1, con excepción de la arginina y tirosina, que mostraron un impacto algo menor sobre este eje. Estos dos aminoácidos fueron los únicos que presentaron cierta influencia sobre el eje CP2 (Figura 4.15A). El gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 se presenta en la Figura 4.15B. A lo largo del CP1 los extractos preparados con los quesos Lh209 se separaron de aquellos obtenidos a partir de los quesos Lh138. Por otra parte, sobre el eje CP2 los extractos de queso Lh138 controles y experimentales (E90), tendieron a separarse luego de 14 días de incubación. Sobre este eje también se observó cierta tendencia a la separación de las muestras pertenecientes a un mismo extracto según el tiempo de incubación. Todos los aminoácidos con alto impacto en CP1, predominaron en los extractos de queso Lh138; la concentración de estos aminoácidos fue notablemente superior en estas muestras, en comparación con los extractos de queso Lh209. Sólo el contenido de tirosina y arginina fue similar en ambos tipos de extractos, o levemente inferior en los extractos de queso Lh209.

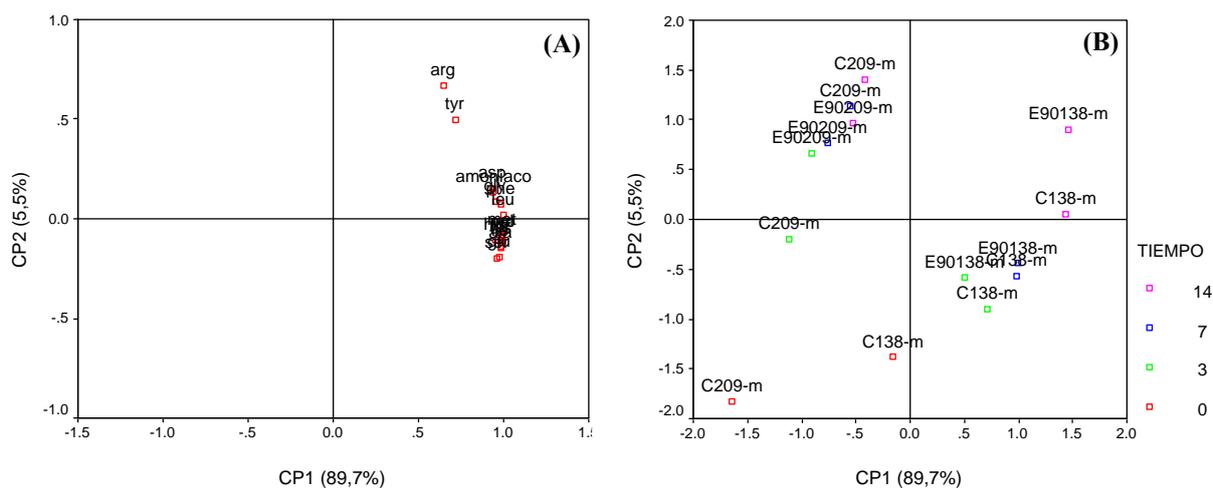


Figura 4.15. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. casei* I90 (E90), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración (m). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

b) Efecto de la actividad de *Lb. plantarum* I91 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 90 días de maduración

Se retuvieron los dos primeros CPs que explicaron el 92,7% de la variabilidad total de los datos.

Todos los aminoácidos analizados presentaron un impacto elevado sobre el eje CP1, si bien la tirosina y la arginina mostraron una influencia algo menor. Por otro lado, la tirosina y la arginina fueron los únicos aminoácidos que exhibieron una influencia relativa sobre el eje CP2 (Figura 4.16A). El gráfico de los *scores* (Figura 4.16B) reveló resultados similares a los obtenidos en el caso anterior. En efecto, sobre el eje CP1 las muestras se separaron en base al tipo de extracto, preparado con queso Lh209 o Lh138. Por otra parte, sobre el eje CP2 se observó cierta tendencia a la separación de las muestras pertenecientes a un mismo extracto según el tiempo de incubación, pero en ningún caso se detectaron diferencias entre extractos controles e inoculados con *Lb. plantarum* I91. Todos los aminoácidos con alto impacto en CP1, fueron característicos de los extractos de queso Lh138; en este caso, la concentración de los aminoácidos individuales también fue notablemente superior a la detectada en los extractos de queso Lh209. En general, los extractos de queso Lh138 y Lh209 presentaron concentraciones similares de tirosina y arginina, durante todo el periodo de incubación.

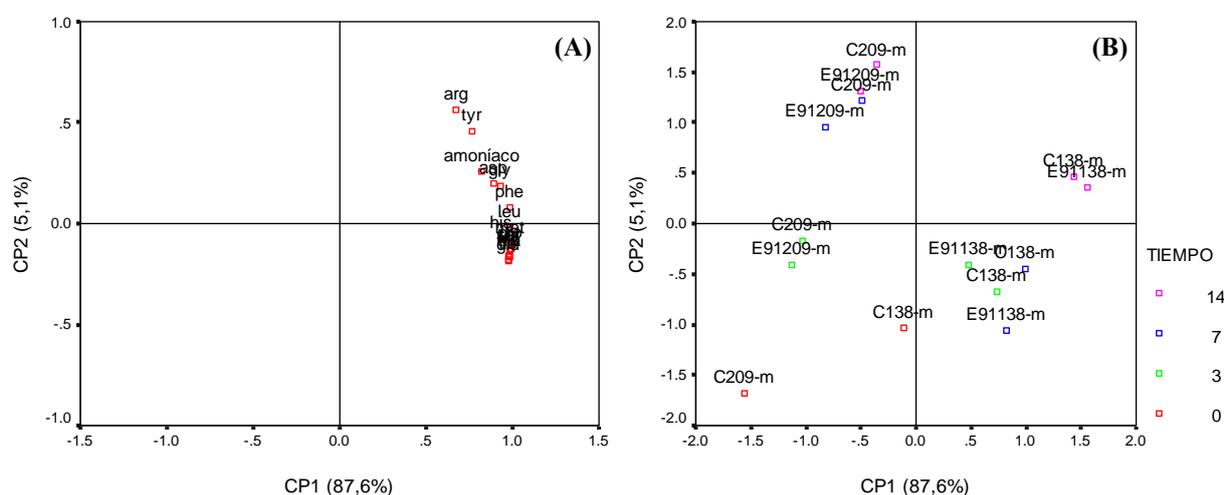


Figura 4.16. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 (E91), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 90 días de maduración (m). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

En general, las tendencias observadas en los extractos de queso de 90 días de maduración, fueron también halladas en extractos preparados con quesos de tiempo de maduración inicial y final. Los gráficos de *scores* y *loadings* correspondientes a estas muestras pueden consultarse en el anexo.

En forma similar a lo observado en el análisis de los perfiles peptídicos, este último estudio indicó que las actividades peptidolíticas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 están influenciadas por los fermentos primarios ensayados. Sin embargo, a diferencia de aquel, las mayores diferencias en los perfiles de AAL entre extractos controles e inoculados con lactobacilos, fueron detectados en extractos de quesos elaborados con *Lb. helveticus* SF138. Por el contrario, en combinación con las peptidasas de *Lb. helveticus* SF209, las diferencias entre los perfiles de AAL de extractos controles y experimentales fueron menores. En este caso, los resultados del análisis de los perfiles de AAL individuales, sugieren un efecto sinérgico entre la actividad bioquímica de *Lb. helveticus* SF138 y las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 ensayadas.

El presente trabajo permitió la obtención de resultados novedosos sobre las actividades peptidolíticas de *Lb. helveticus* SF209 y *Lb. helveticus* SF138, y su interacción con otros microorganismos. En efecto, los resultados de los análisis de perfiles peptídicos y de aminoácidos libres totales e individuales indicaron que las cepas *Lb. helveticus* SF138 y *Lb. helveticus* SF209, difieren notablemente en los equipos enzimáticos vinculados a la degradación de péptidos y producción de aminoácidos libres. En estudios previos desarrollados en nuestro instituto, la cepa *Lb. helveticus* SF209 mostró una mayor actividad peptidolítica, respecto al *Lb. helveticus* SF138, dado que los quesos Reggiano elaborados con ella presentaron niveles mayores de NS-TCA y NS-PTA (Candioti y col., 2002; Hynes y col., 2003c); los perfiles peptídicos no presentaron diferencias notables (Hynes y col., 2003c; 2005) y el análisis de aminoácidos sólo se realizó para quesos elaborados con un cultivo mixto compuesto por ambas cepas (Hynes y col., 2005). En el presente estudio, la aplicación de métodos más específicos indicaron que no es posible señalar a *Lb. helveticus* SF209 como cepa más proteolítica; en realidad, podemos decir que las cepas de *Lb. helveticus* SF209 y SF138, presentan notables diferencias no sólo en la actividad, sino también, en la especificidad de sus enzimas peptidolíticas. En base a los resultados del análisis de péptidos y aminoácidos, es posible proponer la siguiente hipótesis para describir el comportamiento de los fermentos primarios ensayados en el ecosistema alimentario:

- i) *Lb. helveticus* SF209 presentaría una gran capacidad para hidrolizar péptidos de tamaño grande y mediano a péptidos pequeños, pero tendría una escasa habilidad para

degradar estos últimos a aminoácidos. De esta manera, durante la maduración, *Lb. helveticus* SF209 generaría un gran número de péptidos pequeños que se acumulan en el queso, lo cual es coincidente con el incremento observado en la concentración de péptidos con el avance de la maduración (inicial, medio y final) en extractos de queso Lh209 (Figura 4.6A).

ii) *Lb. helveticus* SF138 tendría una elevada capacidad para degradar péptidos pequeños (di- y tri-péptidos) a aminoácidos libres, que se acumulan en el queso, pero presentaría una baja habilidad para hidrolizar péptidos de tamaño grande a intermedio. De esta forma, durante la maduración, *Lb. helveticus* SF138 utilizaría los péptidos disponibles en el queso para formar aminoácidos, pero no generaría nuevos péptidos, conduciendo a una disminución en la concentración de los mismos con el avance de la maduración, tal como se evidenció en los perfiles peptídicos de los extractos de queso Lh138 de obtenidos por RP-HPLC (Figura 4.6B).

Los resultados de la presente tesis demostraron, además, que estas diferencias marcadas en las actividades peptidolíticas del fermento primario, ejercen un impacto significativo en la peptidólisis causada por *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90. En efecto, el impacto de las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 sobre los perfiles peptídicos fue mayor en presencia de peptidasas de *Lb. helveticus* SF209, mientras que su contribución a la formación de aminoácidos fue superior en combinación con *Lb. helveticus* SF138.

Hasta la fecha, no existen trabajos previos que estudien la interacción fermento primario termófilo- fermento adjunto mesófilo en modelos alimentarios y su efecto en la proteólisis y peptidólisis. El único antecedente relacionado con el impacto de proteinasas de fermentos primarios sobre el crecimiento y actividad peptidolítica de lactobacilos mesófilos, es el de Di Cagno y col. (2003a). Estos autores, evaluaron el impacto de las proteinasas parcialmente purificadas de *S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris* y *Br. linens* en la actividad peptidolítica de una cepa de *Lb. plantarum*, tanto en leche descremada estéril como en un *slurry* de queso Cheddar. En ambos modelos experimentales, la combinación de *Lb. plantarum* con las proteinasas mencionadas condujo a un incremento en el contenido total de aminoácidos y a una modificación de los perfiles de AAL individuales, que fueron más pronunciados en presencia de proteinasas de *Lb. helveticus*. Por otra parte, en leche descremada reconstituida, el ACP de los perfiles peptídicos reveló una separación entre el control (sin inocular) y la muestra inoculada con *Lb. plantarum*, lo que sugiere un efecto de la cepa ensayada en la proteólisis secundaria, en forma

similar a lo observado en la presente tesis. Asimismo, tanto en leche como en el *slurry* de queso, los perfiles peptídicos de la muestra inoculada con *Lb. plantarum* fueron muy similares a los de las muestras conteniendo esta misma cepa pero en combinación con proteinasas de *L. lactis* subsp. *cremoris* y *Br. linens*; por el contrario, notables diferencias fueron encontradas en presencia de proteinasas de *Lb. helveticus*. Estos resultados presentan la misma tendencia que los encontrados en este estudio, y sugieren que el grado de actividad peptidolítica de los lactobacilos adjuntos puede variar de acuerdo al fermento primario utilizado en la elaboración de quesos.

4. Conclusiones

El extracto soluble de queso Reggianito resultó ser un modelo experimental adecuado para evaluar la actividad peptidolítica de las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, y su interacción con otras enzimas microbianas. Ambos lactobacilos fueron capaces de crecer y de mantenerse viables en números elevados durante toda la etapa de incubación. *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 impactaron de manera diferente en la proteólisis secundaria, probablemente como consecuencia de diferencias en sus equipos enzimáticos vinculados fundamentalmente a la formación de péptidos pequeños, y en menor grado a la liberación de aminoácidos; la influencia de ambas cepas radicó en una aceleración de la peptidólisis. Asimismo, la contribución de las cepas de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 a la proteólisis secundaria en el modelo de queso duro de pasta cocida, resultó notablemente influenciada por la actividad y especificidad de las enzimas peptidolíticas de los fermentos primarios estudiados (*Lb. helveticus* SF209 y SF138).

Finalmente, el presente trabajo permitió determinar el tiempo máximo de incubación del extracto soluble de queso Reggianito, que se fijó en 7 días, para próximas aplicaciones. En efecto, en etapas más prolongadas se observó una disminución en los recuentos de bacterias viables y una menor diferenciación entre las distintas muestras en relación a sus patrones proteolíticos.

Capítulo 5

“Impacto de la proteólisis causada por el coagulante residual y la plasmina en el crecimiento y actividad peptidolítica de lactobacilos en quesos miniatura tipo Cheddar”

1. Introducción

Numerosos trabajos han abordado el estudio del efecto de diversas variables tecnológicas del proceso de elaboración y maduración del queso sobre el crecimiento de las bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB). Entre los factores que ejercen una influencia significativa se encuentran la temperatura de maduración (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000b), la velocidad de enfriamiento de la cuajada luego de la etapa de prensado (Folkertsma y col., 1996), y la cepa y especie del fermento primario utilizado (Hynes y col., 2001a). Para este último factor, estudios recientes han demostrado que el desarrollo de las NSLAB está fundamentalmente asociado a la actividad proteolítica del fermento primario y no a su capacidad autolítica, como había sido postulado anteriormente (Di Cagno y col., 2003a). Por otro lado, junto con las proteasas de pared del fermento láctico, en el queso coexisten proteasas de origen no microbiano. Las proteasas nativas de la leche, especialmente la plasmina, y las proteasas habitualmente agregadas, como el coagulante, generalmente están activas en el queso e hidrolizan las caseínas en varios fragmentos bien conocidos durante la maduración. En los quesos de pasta no cocida o semicocida, cuya tecnología de elaboración no incluye calentamiento por encima de 46°C, la proteólisis primaria está mediada por la acción del coagulante más que por la plasmina. El principal sustrato del coagulante es la α_{s1} -caseína que se degrada con la producción de los péptidos α_{s1} -CN (f1-23) y α_{s1} -CN (f24-199). El primer péptido es rápidamente hidrolizado por las proteasas del fermento primario en fragmentos más pequeños, que luego son degradados a oligopéptidos y aminoácidos libres por la acción de las peptidasas del cultivo primario y de las NSLAB (Fox, y col., 2000). En cuanto a la plasmina, sus sustratos preferenciales en el queso son las β - y α_{s2} -caseínas; la hidrólisis de la primera genera grandes fragmentos denominados γ -caseínas (γ_1 , γ_2 , y γ_3) (Fox y Stepaniak, 1993; Kelly y McSweeney, 2003). Hasta el momento, no existen estudios que evalúen la influencia de los fenómenos bioquímicos mediados por las proteasas no microbianas en el crecimiento de las NSLAB en el queso.

En el presente trabajo se evaluó la influencia de la proteólisis debida a las actividades del coagulante residual y de la plasmina sobre el crecimiento y la expresión bioquímica de lactobacilos en un modelo de queso Cheddar miniatura elaborado en condiciones microbiológicas controladas. Para tal fin, se estudió el impacto de la proteólisis primaria tanto sobre la población NSLAB adventicia como sobre un cultivo adjunto de *Lactobacillus plantarum* I91.

2. Materiales y Métodos

Las elaboraciones de queso y los análisis correspondientes a este trabajo (con excepción del análisis de aminoácidos libres individuales), se llevaron a cabo en la Universidad Nacional de Irlanda (University College, Cork, Irlanda), durante una estadía de investigación realizada en el marco de una beca doctoral otorgada por el Programa Alβan (Programa de la Unión Europea de Becas de Alto Nivel para América Latina; Beca N°. E05D050374AR).

2.1. Muestras de leche

La leche cruda utilizada en las elaboraciones se obtuvo a partir de una planta láctea cercana a la ciudad de Cork (Irlanda), y se analizó utilizando un equipo Milkoscan FT 120 (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca) para determinar su contenido de materia grasa, proteínas y lactosa. La relación caseína/ materia grasa de la leche de elaboración se estandarizó a 0,7 con el objetivo de minimizar las variaciones naturales en la composición y asegurar la uniformidad del proceso de elaboración y de la composición final del queso (Banks, 2003). La pasteurización se llevó a cabo a 65°C por 30 min (planta piloto, University College, Cork). A fin de evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda y la efectividad del tratamiento térmico se llevaron a cabo recuentos de lactobacilos adventicios en la leche cruda y pasteurizada, por incubación a 30°C durante 5 días en agar Rogosa (Merck, KGaA Darmstadt, Alemania).

2.2. Estudios preliminares y modelo de queso

Se llevaron a cabo ensayos preliminares a fin de evaluar la reproducibilidad del modelo de queso tipo Cheddar miniatura, elaborado bajo condiciones microbiológicas controladas, en lo que respecta a la composición química y a la dinámica de las poblaciones del fermento primario y de los lactobacilos adventicios.

Tres ensayos (denominados A, B, y C) de elaboraciones de queso tipo Cheddar miniatura se realizaron en diferentes días mediante el procedimiento descrito por Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998a), adaptado a condiciones asépticas. Para cada ensayo se fabricaron seis quesos a partir de 200 ml de leche pasteurizada, en vasos de precipitado de vidrio estériles de 250 ml de capacidad, que se colocaron en un baño de agua termostaticado. Las elaboraciones se llevaron a cabo en una unidad de flujo laminar. Una vez que la leche pasteurizada alcanzó una temperatura de 31°C, se le adicionó el fermento primario (0,5%, v/v) y una solución de CaCl₂ 1 M estéril (660 μl/L leche). El fermento primario consistió en un concentrado congelado de

adición directa a tina, compuesto por una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Chr. Hansen Irlanda Ltd., Cork, Irlanda). Luego de 15 min, se adicionó una solución estéril de coagulante en una concentración de 217,5 µl/L (Maxiren 180, DSM, Food Specialities, Delft, Holanda). Luego de un reposo de 45 min (tiempo requerido para el desarrollo de una firmeza óptima), el coágulo se cortó con útiles en miniatura de acero inoxidable estériles (“liras”), manteniéndose después otros 2 min en reposo para el “curado” de la cuajada. La mezcla de partículas de suero y cuajada se agitó lentamente durante 10 min utilizando varillas de vidrio estériles. Luego, la temperatura se incrementó a 38°C y la mezcla de suero-cuajada se sometió a una agitación mecánica continua durante 30 min hasta alcanzar un valor de pH de 6,2. Tanto el suero como las partículas de cuajada se transfirieron a unos frascos plásticos de centrifuga estériles, provistos de un cierre hermético, y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 60 min a 1700 g (centrífuga MSE ‘MAJOR’, MSE Scientific Instruments, Crawley, Sussex, Reino Unido). Luego de descartar el suero, las muestras se colocaron un baño de agua a 36°C hasta alcanzar un pH de 5,2 – 5,3. Los quesos se invirtieron, se centrifugaron nuevamente a 1700 g durante 20 min, y se salaron a temperatura ambiente durante 30 min, por inmersión en 200 ml de salmuera estéril (NaCl 20%, p/v; CaCl₂.2H₂O 0,05%, p/v). Finalmente, los quesos se extrajeron de los frascos mediante el uso de pinzas estériles, se secaron con papel de filtro estéril y se envasaron al vacío.

Los vasos de precipitado de vidrio, los frascos plásticos de centrifuga, las liras miniatura de acero inoxidable, las varillas de vidrio, las pinzas y las soluciones de salmuera y de CaCl₂ 1M se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. El coagulante se esterilizó por filtración a través de filtros estériles de 0,45 µm de tamaño de poro. Los papeles de filtro se envolvieron en papel de aluminio y se esterilizaron en estufa a 120°C durante 4 h.

Los muestreos se realizaron luego de 1, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Cada día de muestreo se tomó un queso por ensayo, que constituyó la muestra de análisis.

La composición global se determinó por triplicado en muestras de 30 días de maduración. El contenido de humedad (secado en estufa a 102 ± 1°C) y de proteínas totales (macro-Kjeldahl) se analizaron por métodos normalizados descritos en el capítulo 1.

El contenido de sal se determinó por el método potenciométrico de Fox (1963). Se pesaron aproximadamente 2 g de queso finamente triturado en vasos de precipitado de 150 ml de capacidad, y se adicionaron 100 ml de ácido nítrico diluido al 0,15% (v/v). Las muestras se incubaron en un baño de agua a 60°C durante un periodo no inferior a 15 min, y luego se mantuvieron fuera del baño durante 1h para que alcancen temperatura ambiente. El contenido de NaCl se determinó por medio de una titulación potenciométrica con nitrato de plata 0,1 N,

bajo agitación mecánica. El volumen gastado de nitrato de plata se registró al alcanzar un voltaje de +255mV.

El pH de los quesos se determinó durante la elaboración y luego de 30 días de maduración empleando un peachímetro Orion modelo 720 (Orion Research Inc., Boston, Estados Unidos), por contacto directo con el electrodo.

Los recuentos microbiológicos se llevaron a cabo por duplicado en todas las muestras. Las muestras de queso (10 g) se homogenizaron durante 5 min con 90 ml de una solución estéril de citrato de sodio al 2% (p/v), en un Stomacher Lab Blender 400 (Seward Ltd., Londres, Reino Unido), y luego se efectuaron diluciones decimales sucesivas en solución ringer. Las bacterias del fermento primario se enumeraron en agar M17 (Merck, Darmstadt, Alemania) luego de la incubación a 30°C durante 3 días, mientras que el recuento de los lactobacilos adventicios se realizó en agar Rogosa (Merck, Darmstadt, Alemania) por incubación a 30°C durante 5 días.

2.3. Diseño experimental

Se realizaron dos experiencias de elaboraciones de quesos a fin de estudiar el efecto de las actividades del coagulante residual (experiencia 1) y de la plasmina (experiencia 2) en el crecimiento y actividad bioquímica de lactobacilos durante la maduración de quesos. En ambos casos se estudiaron dos factores, cada uno a dos niveles, a saber, presencia o ausencia de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91 y modificación de los niveles de proteasas no microbianas. La influencia de las actividades del coagulante residual y la plasmina se estudió por medio de la reducción y el incremento de las actividades enzimáticas, respectivamente, por adición de pepstatina (un potente inhibidor competitivo de proteinasas aspárticas) y de solución de plasmina, obtenida *in vitro* por incubación de plasminógeno y uroquinasa.

Para cada experiencia se realizaron dos ensayos (ensayo 1 y 2) de elaboraciones de queso tipo Cheddar miniatura. En la experiencia 1, cada día de elaboración se fabricaron cuatro quesos: un queso control (Cc), un queso control con agregado de una solución de pepstatina (CPc), un queso experimental con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto (Ec), y un queso experimental preparado como el anterior pero con la adición de solución de pepstatina (EPc). La pepstatina A (Sigma, Poole Dorset, Reino Unido) se adicionó en una concentración de 15 $\mu\text{mol/L}$ a la mezcla de suero y cuajada al iniciar la etapa de cocción de acuerdo a Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998b), quienes reportaron que la inhibición de la actividad del coagulante residual era más efectiva cuando la pepstatina se adicionaba en esa

etapa de la elaboración. El cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91 se preparó mediante la técnica descrita en el capítulo 2 y se adicionó a la leche de elaboración en una concentración de 10^6 UFC/ml.

En experiencia 2, se elaboraron también cuatro quesos por día de fabricación: un queso control (Cp), un queso control con la adición de solución de plasmina (23,5 ml/L leche) (CPp), un queso experimental conteniendo *Lb. plantarum* I91 (Ep), y un queso experimental con solución de plasmina más cultivo adjunto (EPp). La solución de plasmina se adicionó a la leche de elaboración en una concentración de 2,5% (v/v), dado que niveles mayores diluirían excesivamente la leche de elaboración. La solución se agregó 30 min antes de la adición del fermento primario para garantizar una máxima unión de la plasmina a las micelas de caseína (Farkye y Fox, 1992). Dado que la experiencia de la plasmina se llevó a cabo luego de los ensayos correspondientes a la experiencia 1, se decidió disminuir a 10^4 UFC/ml la dosis de inoculación del lactobacilo adjunto luego de considerar los primeros resultados. Por la misma razón, mientras que en la experiencia 1 los quesos se maduraron a 8°C durante 60 días, en la experiencia 2 la maduración se realizó a 12°C, por el mismo periodo de tiempo.

Se elaboró un total de 48 quesos tipo Cheddar miniatura (24 por cada experiencia). En ambas experiencias los días de muestreo fueron 1, 15, 30, 45 y 60 días; cada día se tomaron dos quesos controles y dos experimentales que se destinaron para análisis.

2.4. Obtención de la solución de plasmina

La solución de plasmina utilizada en la elaboración de los quesos de la experiencia 2 (CPp y EPp), se obtuvo *in vitro* por medio de la activación de su precursor inactivo – plasminógeno - inducida por uroquinasa, empleando una modificación de la metodología especificada por Richardson y Pearce (1981). Una alícuota de 12,5 ml de solución de plasminógeno (8,7 mg/ml solución; Sigma, Poole Dorset, Reino Unido) se mezcló con un volumen igual de solución de uroquinasa (1000 unidades Ploug/ml; Sigma, Poole Dorset, Reino Unido), y el volumen se llevó a 250 ml mediante la adición de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 conteniendo lisina 0,02 M, NaCl 0,14 M y glicerol 50% (v/v). La solución resultante se incubó en un baño de agua a 37°C y se determinó la actividad de plasmina al comienzo de la etapa de incubación (tiempo 0) y cada 15 min empleando el método de Richardson y Pearce (1981), a fin de determinar las condiciones óptimas que permitieran la mayor conversión de plasminógeno en plasmina. Antes de su adición a la leche, la solución se trató térmicamente a 70°C durante 10 min a fin de eliminar contaminantes microbianos eventualmente presentes.

2.5. Análisis de los quesos

2.5.1. Composición global, pH y recuentos microbiológicos

La composición global y el pH de los quesos se determinaron luego de 30 días de maduración de acuerdo a las metodologías descritas en la sección 2.2 de este capítulo.

Los recuentos microbiológicos del fermento primario y de los lactobacilos adventicios y adjuntos en queso controles y experimentales, respectivamente, se efectuaron luego de 1, 15, 30, 45 y 60 días utilizando los medios de cultivo y la metodología especificados en la sección 2.2.

2.5.2. Estudio de la proteólisis

La proteólisis se evaluó luego de 1, 30 y 60 días de maduración mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (urea-PAGE), RP-HPLC de los perfiles peptídicos y determinación del contenido de aminoácidos libres totales e individuales.

Preparación de las muestras

Las fracciones del queso soluble e insoluble a pH 4,6 se obtuvieron mediante una pequeña modificación del método de Kuchroo y Fox (1982), tal como lo describió Sousa y McSweeney (2001). Las muestras (10 g) se homogenizaron con 20 ml de agua destilada utilizando un stomacher (Lab Blender 400 Stomacher, Seward Ltd., Londres, Reino Unido) y la dispersión se trasvasó a tubos falcon. El pH se ajustó a 4,6 mediante la adición de HCl 1 N y la dispersión se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min, luego de lo cual, se reajustó el pH al valor indicado. La solución se incubó en un baño de agua a 40°C durante 1 h y luego se centrifugó durante 30 min a 3000 g y 4°C. Las muestras se mantuvieron a 4°C durante 30 min para una mejor extracción de la capa superficial de grasa, y luego el sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio y papel de filtro Whatman N° 113. Tanto las fracciones solubles como insolubles a pH 4,6 fueron liofilizadas.

Electroforesis (urea-PAGE)

La electroforesis urea-PAGE de la fracción insoluble a pH 4,6 liofilizada se realizó mediante el empleo de una cuba vertical Protean II XI (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, Reino Unido) de acuerdo al método de Andrews (1983), modificado por Shalabi y Fox

(1987). Las muestras se prepararon como se indicó en el capítulo 1, pero en este caso se sembraron 8 y 3,5 μl de muestra y caseinato patrón, respectivamente. La concentración de acrilamida en el gel de separación fue de 12,5%, mientras que la del gel de stacking fue de 4%. Las corridas electroforéticas se realizaron en medio alcalino utilizando una solución de Tris-Glicina a pH 8,9 como buffer de corrida. A fin de eliminar posibles interferencias y lograr una mejor resolución en la separación de las muestras, se realizó una pre-corrida a 280 V durante 30-40 min antes de realizar la siembra. La corrida se llevó a cabo a un voltaje de 280 V a través del gel de stacking y de 300 V a lo largo del gel de separación. Finalizada la separación, los geles se colorearon durante 1 h con Azul Brillante de Coomassie G250 (0,2%, p/v) (Blakesley y Boezi, 1977), y luego se decoloraron mediante repetidos lavados con agua destilada.

Perfiles peptídicos por RP-HPLC

Los perfiles peptídicos de las fracciones solubles a pH 4,6 liofilizadas se obtuvieron mediante RP-HPLC utilizando un Sistema Varian (Varian Associates Inc., Walnut Creek, CA, Estados Unidos) constituido por un inyector automático (model 410), un sistema de distribución de solventes ProStar con tres bombas (modelo 230) y un espectrofotómetro de longitud de onda programable ProStar (modelo 310), conectado a una computadora en la cual se instaló la aplicación Workstation 5 Varian Star para el control del sistema y adquisición de los datos. Se utilizó un guarda columna de 4,6 x 10 mm y una columna analítica Nucleosil RP-8 de 250 x 4 mm, 5 μm de tamaño de partícula y 300 Å de tamaño de poro (Capital HPLC Ltd., Broxburn, West Lothian, Reino Unido). La separación cromatográfica se llevó a cabo a una longitud de onda de 214 nm utilizando un gradiente lineal con concentración creciente de acetonitrilo, formado mediante la combinación de dos fases móviles: A_p : 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA, sequencing grade; Sigma, St. Louis, Estados Unidos) en agua deionizada grado RP-HPLC (sistema Milli-Q, Waters Corporation, Milford MA, Estados Unidos); B_p : 0,1% (v/v) de TFA en acetonitrilo (grado HPLC, Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Reino Unido). El gradiente comenzó con 100% de A_p durante 5 min, y continuó con un incremento lineal de B_p durante 55 min, hasta alcanzar un 50% (v/v). Luego de 6 min en estas condiciones se generó otro gradiente lineal en el lapso de 4 min hasta lograr una proporción de B_p del 95% (v/v), que se mantuvo durante otros 6 min. Previo a la siguiente inyección, la columna se lavó durante 4 min con B_p al 100% (v/v), y luego se equilibró con 100% de A_p durante 18 min para volver a las condiciones iniciales. La muestra se preparó

disolviendo 10 mg del extracto soluble a pH 4,6 liofilizado en 1 ml de buffer A_p, y posteriormente se centrifugó a 15000 g durante 10 min. Las muestras se filtraron a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro y una alícuota (40 µl) se inyectó en la columna. Las separaciones cromatográficas se efectuaron a temperatura ambiente y a una velocidad de flujo de 0,75 ml/min.

Contenido de aminoácidos libres totales e individuales

La concentración de AAL totales en la fracción soluble a pH 4,6 de los quesos se determinó por triplicado mediante el método del ácido trinitrobencensulfónico o TNBS (Polychroniadou, 1988). Una alícuota del extracto soluble (10 a 30 µl dependiendo del tipo de queso y del tiempo de maduración) se llevó a un volumen de 1 ml con agua destilada. Se adicionaron 0,5 ml del extracto diluido a un volumen igual de buffer borato pH 9,5 y 1 ml de reactivo TNBS (Sigma, Poole Dorset, Reino Unido). La mezcla de reacción resultante se incubó en un baño de agua a 37°C durante 60 min. Alcanzado este tiempo, la reacción se inhibió por medio de la adición de 2 ml de NaH₂PO₄ 0,1 M conteniendo Na₂SO₃ 1,5 mM y se midió la absorbancia a 420 nm (A₄₂₀). Se preparó un blanco con 0,5 ml de agua en lugar de extracto de queso. Asimismo, se construyó una curva de calibrado empleando concentraciones de leucina de 0,05 mM a 0,5 mM, para transformar la A₄₂₀ en concentración de aminoácidos (mg/g queso). Las soluciones estándar de leucina se prepararon y analizaron por duplicado. En la Figura 5.1 se presenta la curva de calibrado obtenida mediante regresión lineal por el método de cuadrados mínimos (Massart y col., 1988b).

La concentración individual de cada aminoácido en la fracción del queso soluble a pH 4,6 se determinó luego de 1 y 60 días de maduración mediante el método descrito en el capítulo 2 de esta tesis. Las muestras se transportaron desde Irlanda liofilizadas y se analizaron en el INLAIN. Se pesaron entre 10 a 20 mg del liofilizado (dependiendo del tiempo de maduración y del tipo de queso), que se disolvieron en un volumen apropiado de agua destilada. La solución resultante se diluyó con la solución estándar interna y se derivatizó de acuerdo a la metodología ya detallada. El perfil de aminoácidos libres individuales se obtuvo mediante RP-HPLC utilizando el equipamiento y bajo las condiciones mencionadas en el capítulo 2. En este caso, la concentración de cada aminoácido se expresó en mg/g de extracto soluble a pH 4,6 liofilizado.

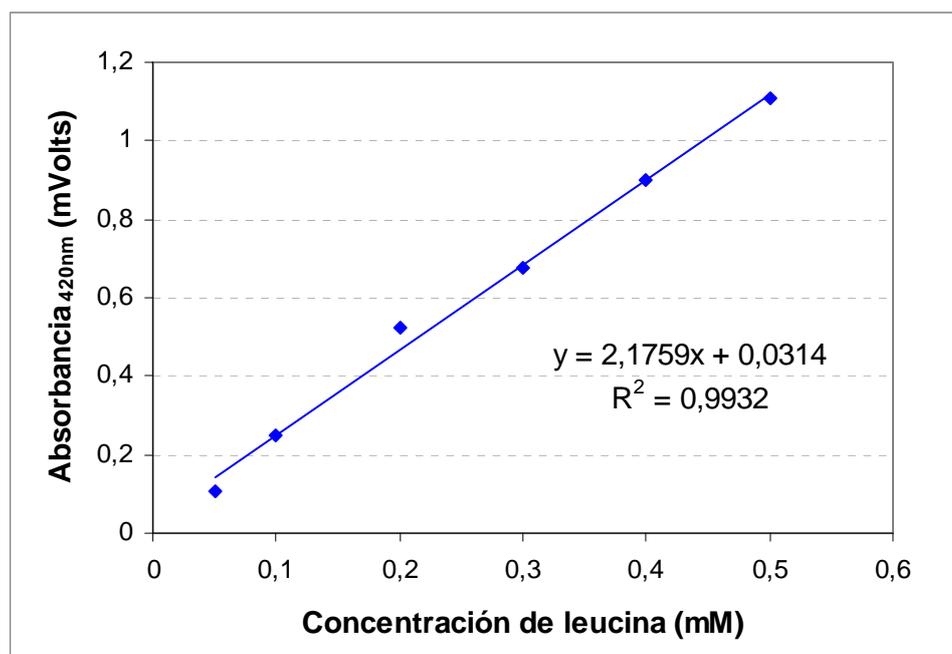


Figura 5.1. Curva de calibrado para la determinación del contenido total de aminoácidos mediante el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS).

Determinación de la actividad de la enzima coagulante residual

La actividad del coagulante residual se determinó por triplicado en muestras de queso de 30 días de maduración, utilizando el método desarrollado por Hurley y col. (1999), con pequeñas modificaciones. Las muestras de queso finamente trituradas (50 mg) se homogenizaron durante 30 min a 37°C con 1 ml de citrato de sodio 0,1 M utilizando un agitador termostatzado. Luego se centrifugaron durante 1 min a 1000 g en una microcentrífuga modelo 1-15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Alemania) para lograr la separación de la grasa. La actividad del coagulante residual se determinó en la fase acuosa utilizando un heptapéptido sintético como sustrato (Pro-Thr-Glu-Phe-[NO₂-Phe]-Arg-Leu; Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein, Alemania). Se adicionaron 140 µl de la dispersión de citrato del queso a 400 µl de buffer formato de sodio 0,1 M (pH 3,2), y se inició la reacción mediante la adición de 30 µl de solución de sustrato. La mezcla se incubó a 37°C durante 24 h y la reacción se detuvo mediante un calentamiento a 70°C durante 10 min. La solución se centrifugó a 16000 g durante 10 min y luego se filtró a través de filtros Titan Syringe, RC 0,45 µm 4 mm (Antech, Waterford, Irlanda). El filtrado se analizó mediante RP-HPLC utilizando el equipamiento descrito anteriormente. Asimismo, se emplearon las mismas fases móviles utilizadas para la obtención de los perfiles peptídicos. La columna se equilibró inicialmente con un 15% de B_p, luego de lo cual, se inyectaron 100 µl

de muestra en el cromatógrafo. Las condiciones iniciales se mantuvieron durante 5 min y luego se generó un gradiente al incrementar la concentración de B_p como se indica a continuación: 15-45% de B_p durante 20 min y 45-95% de B_p durante 3 min. La concentración de B_p se mantuvo en 95% durante 2 min y finalmente se retornó a las condiciones iniciales en un lapso de 3 min. La detección UV se llevó a cabo a 300 nm y la velocidad de flujo utilizada fue de 1 ml/min. Luego de la adquisición de los datos, se determinaron las áreas de los picos por integración utilizando el software Gold Nouveau (Beckman Instruments Inc., California, Estados Unidos). La actividad del coagulante residual se expresó como unidades de actividad enzimática h⁻¹ g⁻¹ de materia seca, donde 1 unidad de actividad enzimática se define como la actividad necesaria para liberar 1 nmol del péptido producto ([NO₂-Phe]- Arg-Leu) a partir del sustrato heptapéptido, por hora a 37°C y pH 3,2.

Determinación de la actividad de plasmina

La actividad de plasmina se determinó por triplicado en muestras de quesos de 30 días de maduración empleando una modificación de la metodología descrita por Richardson y Pearce (1981). Una muestra de queso (3 g) se dispersó en 27 ml de solución de citrato de sodio 0,1 M y se equilibró durante 15 min a 37°C. La mezcla se homogenizó por 10 min empleando un stomacher (Lab Blender 400 Stomacher, Seward LTD, Londres, Reino Unido) y luego se centrifugó a 29000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro Whatman N° 1 y en el filtrado se determinó la actividad de plasmina utilizando N-succinil-alanil-fenilalanil-lisil-7-amido-4-metil-cumarina (Suc-Ala-Phe-Lys-AMC) como sustrato (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). La reacción se inició mediante la adición de 225 µl de sustrato a 50 µl del filtrado y 825 µl de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La intensidad de la fluorescencia se midió a intervalos de 5 min durante un periodo de 35 min (380 nm excitación, 460 nm emisión). Se construyó una curva de calibrado empleando concentraciones crecientes de 7-amino-4-metil cumarina (AMC; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania), y la pendiente se utilizó para calcular el nivel de plasmina en los quesos. Las soluciones estándar de AMC se prepararon y analizaron por triplicado. La actividad de dicha enzima se expresó como unidades de plasmina/g queso, donde 1 unidad se define como la actividad necesaria para liberar 1 nmol de AMC a partir de Suc-Ala-Phe-Lys-AMC por minuto a pH 7,5 y 25°C. En la Figura 5.2 se presenta la curva de calibrado obtenida mediante regresión lineal por el método de cuadrados mínimos (Massart y col., 1988b).

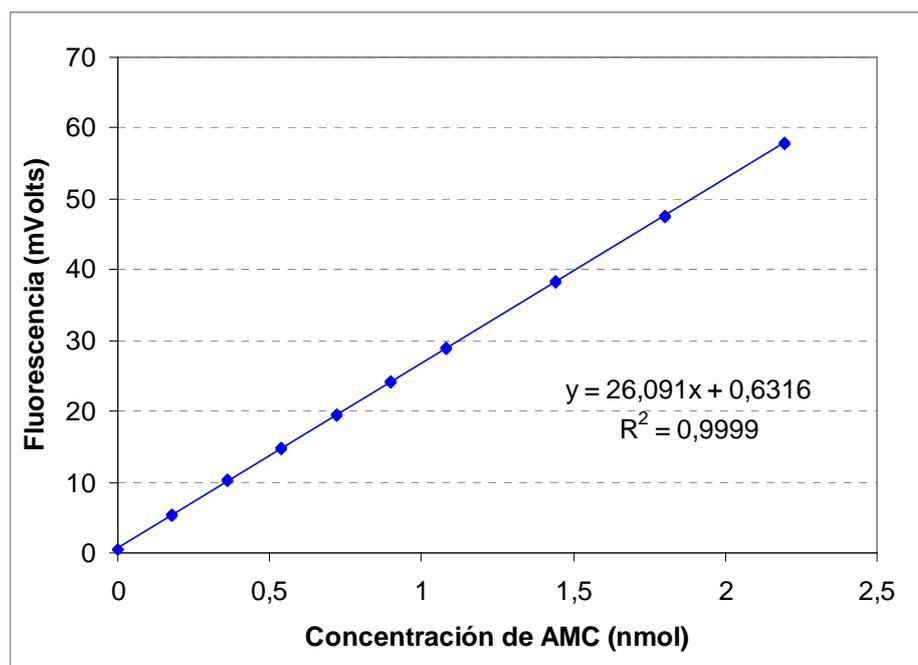


Figura 5.2. Curva de calibrado para la determinación de la actividad de plasmina.

2.6. Análisis estadístico

Los perfiles peptídicos y de AAL individuales se analizaron mediante el análisis por componentes principales (ACP) y el análisis de cluster (AC) no jerárquico utilizando la altura de los picos como variables independientes y la matriz de variancia-covariancia, a fin de reducir la dimensionalidad de los datos, evaluar la distribución de las variables y las muestras, y detectar posibles agrupamientos (Bergamini y col., 2006a). El resto de los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía; cuando se detectaron diferencias significativas se aplicó el test LSD para la comparación de medias. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 10.0.

3. Resultados y Discusión

3.1. Composición y recuentos microbiológicos de la leche de elaboración

La composición de la leche fue similar en ambas experiencias; el contenido de proteínas y de materia grasa osciló entre 3,88 a 4,02% y entre 3,22 a 3,29%, respectivamente. Los recuentos de lactobacilos adventicios en la leche cruda fluctuaron entre 5×10^3 y 7×10^3 UFC/ml, y luego de la pasteurización disminuyeron a < 10 UFC/ml. Estos resultados

indicaron que la leche cruda utilizada fue de alta calidad microbiológica y que el tratamiento térmico resultó efectivo para reducir el nivel de las NSLAB.

3.2. Estudio preliminar: Composición química y dinámica de las poblaciones de lactococos y lactobacilos durante la maduración de los quesos.

La composición global y el pH de los quesos miniatura tipo Cheddar pertenecientes a los ensayos A, B, y C se muestran en la Tabla 5.1. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la composición química y el pH de los quesos elaborados en diferentes días, y los valores estuvieron dentro del rango normal esperado para el queso Cheddar convencional. Estos resultados concuerdan con los publicados por Shakeel-Ur-Rheman y col. (1998a) y Milesi y col. (2008) para queso Cheddar miniatura y confirman la reproducibilidad y fiabilidad de este modelo de queso.

Tabla 5.1. Composición global y pH de los quesos tipo Cheddar miniatura, elaborados bajo condiciones microbiológicas controladas, pertenecientes a los ensayos A, B y C, luego de 30 días de maduración.

	pH	Humedad (%)	NaCl (%)	Proteína (%)
<i>Ensayo A</i>	5,29 ± 0,01	39,59 ± 0,20	1,980 ± 0,001	23,54 ± 0,02
<i>Ensayo B</i>	5,28 ± 0,01	39,63 ± 0,20	1,958 ± 0,008	23,64 ± 0,13
<i>Ensayo C</i>	5,27 ± 0,01	39,70 ± 0,15	1,974 ± 0,008	23,66 ± 0,13

Se informa el promedio y la desviación estándar de seis quesos (réplicas) obtenidos por ensayo.

La evolución de las poblaciones del fermento primario y de las NSLAB adventicias durante la maduración de los quesos pertenecientes a los tres ensayos se muestra en la Figura 5.3. El recuento inicial de lactococos en los quesos fue de $10^9 - 10^{10}$ UFC/g, pero luego disminuyó a $10^8 - 10^9$ UFC/g hacia el final de la maduración. La disminución en la población de las bacterias del fermento primario es consistente con otros estudios realizados en queso Cheddar convencional (Broome y col., 1990; McSweeney y col., 1993; Folkertsma y col., 1996; Lynch y col., 1996; Sallami y col., 2004), y se ha atribuido a una serie de factores tales como, disminución de su fuente de energía primaria (lactosa), autólisis e inhibición por efecto de la sal (Farkye, 2000; Beresford y col., 2001). McSweeney y col. (1994) informaron que si bien la velocidad a la cual las células del fermento primario mueren y sufren lisis es

característica de la especie y de la cepa, normalmente los recuentos de bacterias viables declinan hasta aproximadamente un 1% de los valores máximos durante el primer mes de maduración. Los recuentos de lactobacilos adventicios permanecieron en el orden de 10^2 UFC/g en todos los quesos, pertenecientes a los tres ensayos, durante la maduración. En nuestro estudio, los niveles alcanzados por estos microorganismos adventicios fueron mucho menores que los informados para quesos Cheddar elaborados a escala piloto, ya sea en tinas abiertas o bajo condiciones microbiológicas controladas, en los cuales, los lactobacilos adventicios crecieron desde recuentos muy bajos hasta valores de $10^6 - 10^8$ UFC/g luego del primer mes de maduración (Broome y col., 1990; McSweeney y col., 1994; Folkertsma y col., 1996; Lane y Fox, 1996; Lynch y col., 1996; 1999). El hecho de que en nuestro estudio la población NSLAB permaneció constante en niveles bajos durante todo el periodo de maduración, podría estar relacionado a varios factores tales como: alta calidad microbiológica de la leche cruda, correcto mantenimiento de las condiciones de asepsia durante la elaboración, baja temperatura de maduración o corto tiempo de maduración (Naylor y Sharpe, 1958a; Turner y col., 1986; Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000b; Sheehan y col., 2007).

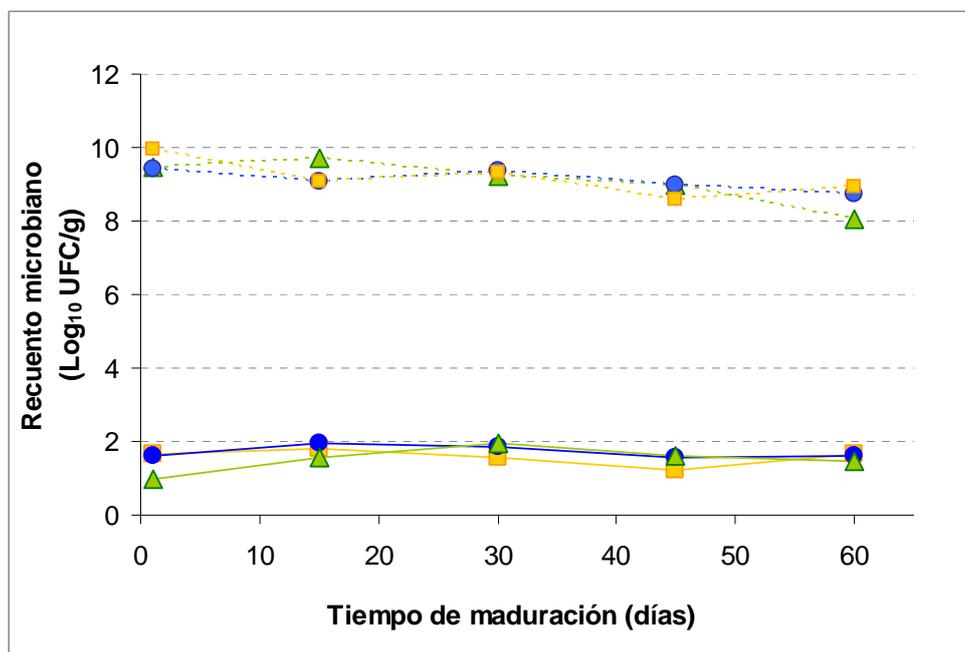


Figura 5.3. Evolución del fermento primario (líneas de puntos) y de las NSLAB adventicias (líneas continuas) durante la maduración de quesos tipo Cheddar miniatura, elaborados bajo condiciones microbiológicas controladas. Ensayos A (▲), B (●) y C (■). Cada punto representa el promedio de seis quesos (réplicas) obtenidos por ensayo (las desviaciones estándar fueron menores a 0,1 log, con lo que no se pueden observar).

En general, no se observó variación en los recuentos de las bacterias del fermento primario entre los distintos ensayos de elaboraciones durante la maduración de los quesos. Aunque el modelo de queso miniatura tipo Cheddar fue desarrollado en trabajos de investigación anteriores, hasta la fecha no existe información sobre la dinámica de las poblaciones del fermento primario y de los lactobacilos adventicios durante la maduración de los productos. En el presente trabajo se caracterizó la evolución de las bacterias lácticas en este modelo de queso, proporcionando evidencias de que es también reproducible desde el punto de vista microbiológico. Milesi y col. (2007) estudiaron la evolución de la microflora láctica y no láctica en un modelo de queso Cremoso miniatura, elaborado en condiciones microbiológicas controladas, y al igual que en este estudio, no observaron fluctuaciones significativas entre los distintos ensayos.

3.3. Obtención de la solución de plasmina

En la Figura 5.4 se presenta la curva de producción de plasmina por incubación de plasminógeno y uroquinasa a 37°C, obtenida mediante una regresión polinomial de segundo orden. A tiempo cero ya se detectó actividad de plasmina en la mezcla, lo que refleja la rápida activación de plasminógeno por acción de la uroquinasa. La actividad de plasmina se incrementó gradualmente con el tiempo de incubación y alcanzó el máximo a los 60 min; transcurrido este tiempo permaneció constante. A partir de estos resultados se concluyó que las condiciones óptimas de trabajo para lograr una máxima conversión de plasminógeno en plasmina eran: incubación a 37°C durante 1 h.

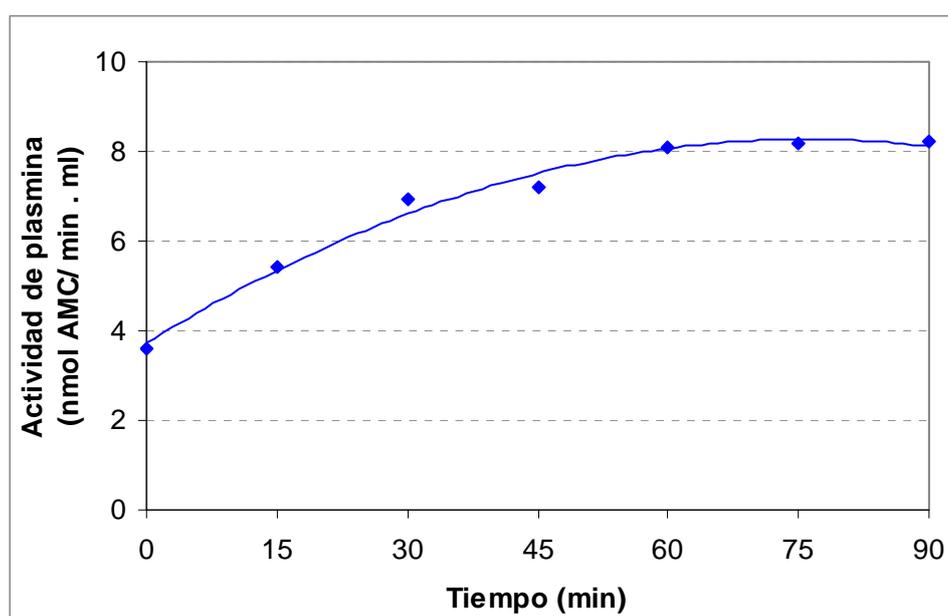


Figura 5.4. Curva de obtención de plasmina por incubación de una solución de plasminógeno y uroquinasa a 37°C.

3.4. Quesos con actividades de quimosina y plasmina modificadas: Experiencias 1 y 2

3.4.1. Composición global y pH

La composición global y el pH de los quesos tipo Cheddar miniatura de 30 días de maduración pertenecientes a ambas experiencias se muestra en la Tabla 5.2. Todos los valores estuvieron dentro del rango normal esperado para queso Cheddar comercial.

La adición de pepstatina, plasmina o cultivo adjunto no introdujo cambios en la composición de los quesos, dado que el pH, la humedad, el contenido de sal en la humedad y el contenido de proteínas no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$). Estos resultados coinciden con los del trabajo de Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998b) quienes no detectaron diferencias de composición entre quesos miniatura controles y tratados con pepstatina. Sin embargo, O'Mahony y col. (2005) informaron que el contenido de humedad de los quesos elaborados con diferentes concentraciones de pepstatina disminuyó con el incremento de los niveles del inhibidor, y atribuyeron estos cambios a una mayor sinéresis de la cuajada en presencia de pepstatina. Con respecto a los quesos tratados con plasmina, Farkye y Landkammer (1992) observaron que los quesos con una actividad de plasmina 6 veces mayor a la de los quesos controles presentaban un mayor contenido de humedad, y asociaron este fenómeno a una mayor capacidad de las proteínas y péptidos presentes en la cuajada para ligar agua, debido a la actividad hidrolítica de la plasmina. En nuestro estudio, sin embargo, el incremento en la actividad de plasmina no estuvo ligado a un aumento en el contenido de humedad, lo cual concuerda con otros trabajos sobre este tema (Barrett y col., 1999; Upadhyay y col., 2004). Cabe señalar que las diferencias halladas en la composición global de quesos, especialmente en el contenido de humedad, son a menudo resultado de la escasa repetibilidad de los modelos utilizados en la investigación, que a diferencia de los implementados en el presente trabajo de tesis, no siempre se validan previamente.

La velocidad de acidificación durante la elaboración y el pH final registrado luego de la etapa de cheddarización fueron similares en todos los quesos pertenecientes a ambas experiencias (resultados no incluidos), lo que indicó que la cepa de *Lb. plantarum* I91 no contribuyó a la producción de ácido, y que la adición de pepstatina o plasmina no interfirieron con la actividad acidificante del fermento primario. Como se indicó en el capítulo 2, *Lb.*

plantarum I91 tampoco contribuyó a la acidificación de los quesos Cremoso miniatura durante las etapas de elaboración y maduración.

Tabla 5.2. Composición global y pH de los quesos Cheddar miniatura de 30 días de maduración correspondientes a la experiencia del coagulante y de la plasmina. Cc y Cp, quesos controles de la experiencia del coagulante y la plasmina, respectivamente. CPc y CPp, quesos controles elaborados con pepstatina y plasmina, respectivamente. Ec y Ep, quesos experimentales elaborados con la adición de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91. EPc y EPp, quesos experimentales con adición de cultivo adjunto y pepstatina y cultivo adjunto y plasmina, respectivamente.

Experiencia	pH	Humedad (%)	NaCl (%)	Proteína (%)
<i>Coagulante</i>				
Cc	5,21 ± 0,01	37,28 ± 0,55	1,85 ± 0,09	24,55 ± 0,08
CPc	5,22 ± 0,02	37,55 ± 0,39	1,83 ± 0,07	24,62 ± 0,08
Ec	5,21 ± 0,01	37,64 ± 0,17	1,77 ± 0,17	24,83 ± 0,01
EPc	5,20 ± 0,01	37,87 ± 0,21	1,80 ± 0,10	24,78 ± 0,02
<i>Plasmina</i>				
Cp	5,22 ± 0,01	37,31 ± 1,32	1,96 ± 0,06	24,61 ± 0,65
CPp	5,21 ± 0,01	37,32 ± 0,63	1,92 ± 0,04	24,77 ± 0,31
Ep	5,23 ± 0,01	36,98 ± 1,71	1,92 ± 0,02	24,58 ± 0,64
EPp	5,23 ± 0,01	36,73 ± 1,58	1,95 ± 0,06	24,78 ± 0,45

Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

3.4.2. Actividades enzimáticas

La actividad del coagulante residual en los quesos de 30 días de maduración elaborados con y sin pepstatina o lactobacilos adjuntos se presenta en la Tabla 5.3. La adición de pepstatina a la mezcla de cuajada y suero disminuyó en un 95% la actividad del coagulante residual en los quesos ($P \leq 0,05$). Al igual que en el estudio de Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998b), el nivel de pepstatina utilizado (15 $\mu\text{mol/L}$), resultó efectivo en inhibir la actividad del coagulante residual. En las Figuras 5.5A y 5.5B se presenta a modo ilustrativo los perfiles cromatográficos del sustrato heptapéptido (S) y del producto de hidrólisis (P) obtenidos con el extracto de dos muestras de quesos controles, elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. En los quesos con actividad de coagulante inhibida el sustrato heptapéptido permaneció prácticamente inalterado, y en consecuencia, se observó una escasa formación del

producto (Figura 5.5A). Por el contrario, en los quesos sin agregado de pepstatina, el coagulante degradó el sustrato con formación del producto, lo que se evidenció por la disminución del área del primero y la aparición de un nuevo pico (Figura 5.5B).

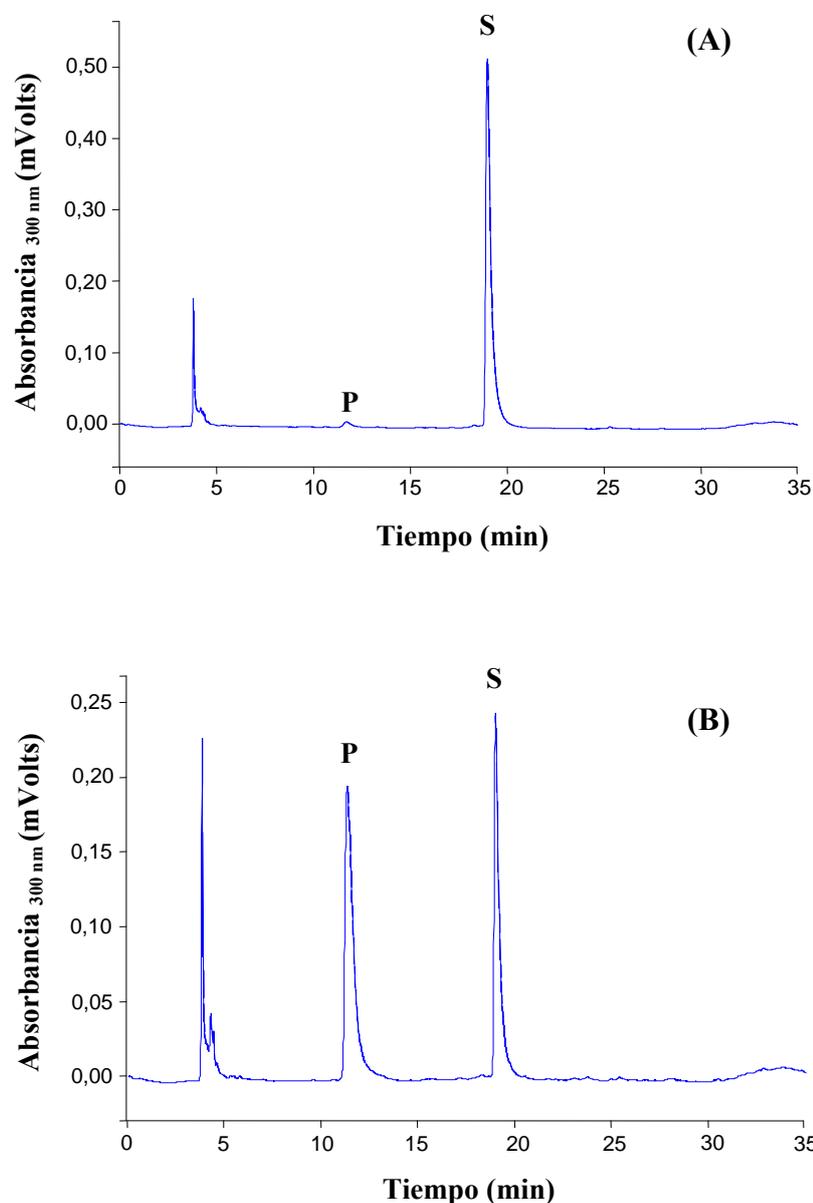


Figura 5.5. Cuantificación de la actividad de la enzima coagulante residual mediante el seguimiento de la hidrólisis de un péptido sintético por RP-HPLC. Las letras S y P señalan los picos del sustrato y de su producto de hidrólisis, respectivamente. **A)** Queso tipo Cheddar miniatura con agregado de pepstatina, **B)** Queso tipo Cheddar miniatura sin pepstatina.

La Tabla 5.3 también muestra los valores de actividad de plasmina en los quesos miniatura de 30 días elaborados con y sin solución de plasmina o cultivo adjunto. Se encontraron

diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los niveles de dicha enzima entre quesos elaborados con y sin adición de solución de plasmina. En efecto, cuando se agregó la solución, se verificó un incremento que alcanzó el doble de actividad en los quesos tratados respecto a los controles. La adición de solución de plasmina, obtenida *in vitro* mediante la incubación de plasminógeno y uroquinasa, demostró ser una estrategia efectiva para incrementar la actividad de la enzima en los quesos. Otros métodos han sido propuestos para modificar la actividad de plasmina en el queso, a saber:

- i) Reducción de la actividad de plasmina utilizando inhibidores específicos como el ácido 6-aminohexanoico (Farkye y Fox, 1991; Scherze y col., 1994).
- ii) Adición de plasmina a la leche de elaboración (Farkye y Fox, 1992; Farkye y Landkammer, 1992).
- iii) Incremento de la activación de plasminógeno a plasmina mediante el agregado *in situ* de activadores de plasminógeno (Barrett y col. 1999; Upadhyay y col., 2004).

El primer método actualmente está en desuso, dado que la adición de elevadas concentraciones de ácido 6-aminohexanoico, necesarias para inhibir la actividad de plasmina, ocasiona un incremento de la sinéresis, y la consecuente disminución del contenido de humedad en los quesos podría afectar la proteólisis. Además, este inhibidor aporta un elevado nivel de nitrógeno, lo que ocasionaría una sobrestimación del contenido de nitrógeno soluble de los quesos. El incremento de la actividad de plasmina por adición directa de la enzima, por otro lado, presenta la ventaja de su simplicidad y el hecho de que se trata de una proteinasa nativa de la leche, por lo que su adición no debería presentar problemas legales. Sin embargo, la principal desventaja de este método es que la plasmina es muy costosa, lo que limita su aplicación en experimentos a escala piloto. La activación del plasminógeno a plasmina, ya sea por agregado de los activadores a la leche o en una solución en forma previa, constituye otra estrategia efectiva, aunque el costo de los activadores del plasminógeno también resulta elevado (Fox y Stepaniak, 1993).

Si bien en el presente estudio los cambios en la actividad de la plasmina no fueron tan drásticos como en el caso de la experiencia del coagulante, resultaron similares a los observados en trabajos previos relacionados a la activación de esta enzima. Barrett y col. (1999) adicionaron concentraciones crecientes (0,25, 0,5, 1 ó 5 unidades/ml) de uroquinasa a la leche de elaboración y detectaron un incremento de la actividad de plasmina en los quesos Cheddar de alrededor de dos y cuatro veces al agregar 1 y 5 unidades de uroquinasa/ml de leche, respectivamente. Upadhyay y col. (2004) elaboraron quesos Cheddar con

concentraciones crecientes de (0,1%, 0,25% ó 0,50%) de estreptoquinasa (un activador del plasminógeno producido por *Streptococcus uberis*), y la actividad de plasmina aumentó aproximadamente cuatro veces comparado con el control al utilizar la mayor concentración de estreptoquinasa.

Como era de esperar, la adición del cultivo adjunto no impactó en las actividades del coagulante residual ni de la plasmina.

Tabla 5.3. Actividad del coagulante residual y de la plasmina en los quesos tipo Cheddar miniatura de 30 días de maduración. Cc y Cp, quesos controles de la experiencia del coagulante y la plasmina, respectivamente. CPc y CPP, quesos controles elaborados con pepstatina y plasmina, respectivamente. Ec y Ep, quesos experimentales elaborados con la adición de un cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91. EPc y EPP, quesos experimentales con adición de cultivo adjunto y pepstatina y cultivo adjunto y plasmina, respectivamente.

Experiencia	Actividad enzimática
Coagulante	(mmol producto h ⁻¹ mg ⁻¹ materia seca)
Cc	1,99 ± 0,13 ^a
CPc	0,10 ± 0,02 ^b
Ec	2,14 ± 0,24 ^a
EPc	0,13 ± 0,02 ^b
Plasmina	(nmol AMC min ⁻¹ g ⁻¹)
Cp	1,60 ± 0,30 ^a
CPP	3,25 ± 0,40 ^b
Ep	1,62 ± 0,33 ^a
EPP	3,35 ± 0,62 ^b

^{a,b}Para cada experiencia, valores en la misma columna con diferente superíndice resultaron significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Para cada experiencia, se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

3.4.3. Electroforesis

El perfil electroforético de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos elaborados con y sin adición de pepstatina o cultivo adjunto, luego de 1, 30 y 60 días de maduración se muestra en la Figura 5.6A. Los quesos elaborados con y sin agregado de pepstatina mostraron notables

diferencias para todos los tiempos de maduración estudiados. En efecto, la banda electroforética correspondiente a la α_{s1} -caseína permaneció intacta en los quesos tratados con pepstatina durante todo el periodo de maduración, y en consecuencia, los productos de degradación típicos de esta proteína [α_{s1} -CN (f24-199) y α_{s1} -CN (f102-199)] no fueron detectados. El patrón observado es consistente con el reportado por Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998b) y O'Mahony y col. (2005), y confirma que la pepstatina al nivel utilizado inhibió fuertemente la actividad del coagulante residual, y por lo tanto, la proteólisis primaria. Resultados similares fueron informados por Hesari y col. (2006) sobre queso blanco iraní obtenido por ultrafiltración, y libre de cuajo. En los quesos elaborados sin pepstatina, la α_{s1} -caseína mostró una extensa hidrólisis con el avance de la maduración, lo cual se evidenció por la producción de los péptidos α_{s1} -CN (f102-199) y α_{s1} -CN (f24-199) (o α_{s1} -I-CN), ambos derivados de la acción del coagulante. Al igual que lo observado por otros autores (McSweeney y col., 1994; Lane y Fox, 1996; Lynch y col., 1999; Swearingen y col., 2001; Michaelidou y col., 2003; Poveda y col., 2003; Di Cagno y col., 2006), no se evidenciaron diferencias en la proteólisis primaria entre quesos elaborados con y sin lactobacilos adjuntos a lo largo de todo el periodo de maduración. Se sabe que los lactobacilos mesófilos de origen NSLAB poseen una baja actividad proteolítica, aunque han mostrado un algunos casos una elevada actividad peptidolítica (Peláez y Requena, 2005; Bude-Ugarte y col., 2006). Durante la maduración se observó una escasa degradación de la β -caseína a γ_1 -, γ_2 -, γ_3 -caseínas en los quesos elaborados con y sin pepstatina o lactobacilos adjuntos. Esta hidrólisis es mediada por la acción de la plasmina, la cual no contribuye de manera importante a la proteólisis primaria en el queso Cheddar (Fox y col., 2000).

En la Figura 5.6B se presenta la electroforesis urea-PAGE de la fracción insoluble a 4,6 de los quesos con y sin solución de plasmina o cultivo adjunto, luego 1, 30 y 60 días de maduración. En general, las α_{s1} - y β -caseínas exhibieron una hidrólisis progresiva en todos los quesos con el transcurso de la maduración. Mientras los perfiles electroforéticos de los quesos elaborados con y sin plasmina no mostraron diferencias aparentes luego de 1 y 30 días, sí se encontraron notables cambios hacia el final del periodo de maduración (60 días). En particular, la hidrólisis de la β -caseína fue más extensa en los quesos elaborados con solución de plasmina, lo cual se evidenció por una disminución de la banda de la β -caseína y el consecuente incremento de la intensidad de las bandas correspondientes a las γ_1 -, γ_2 - y γ_3 -caseínas. Estos resultados se condicen con una mayor actividad de plasmina en los quesos tratados con la solución de dicha enzima. Una hidrólisis acelerada de la β -caseína a γ -caseínas

por incremento de la actividad de plasmina ha sido informada por otros investigadores (Farkye y Fox, 1992; Barrett y col., 1999; Somers y col., 2002; Upadhyay y col., 2004).

Como se preveía, la adición de plasmina no incrementó la degradación de la α_{s1} -caseína, dado que esta fracción es menos susceptible a la acción de la plasmina que la β -caseína (Fox y col., 2000). Al igual que en la experiencia 1, no se apreciaron diferencias en la proteólisis primaria entre quesos elaborados con y sin *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto.

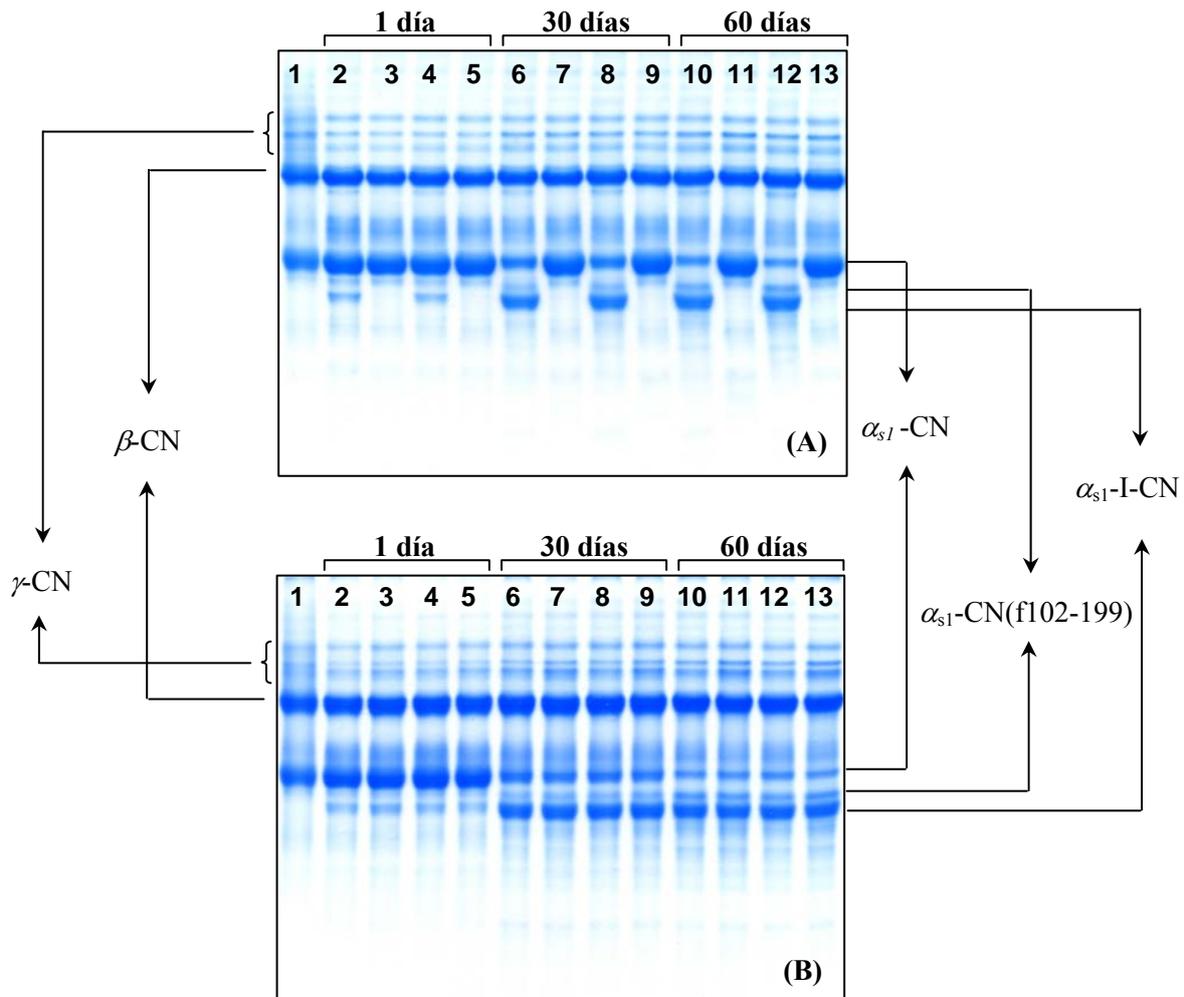


Figura 5.6. Electroforesis (urea-PAGE) de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos de la experiencia del coagulante (A) y de la plasmina (B). Línea 1: caseinato patrón. Líneas 2, 6 y 10: quesos controles (Cc y Cp en A y B, respectivamente). Líneas 3, 7 y 11: quesos con actividades de coagulante o plasmina modificadas (CPc y CPp en A y B, respectivamente). Líneas 4, 8 y 12: quesos con *Lb. plantarum* 91 (Ec y Ep en A y B, respectivamente). Líneas 5, 9 y 13: quesos con *Lb. plantarum* 91 y actividades de coagulante o plasmina modificadas (EPc y EPp en A y B, respectivamente).

3.4.4. Perfiles peptídicos de los quesos

Los perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4,6 de los quesos controles y experimentales de 60 días elaborados con y sin adición de pepstatina se incluyen en la Figura 5.7. En general, la altura de los picos en los cromatogramas de todos los quesos, especialmente en aquellos no tratados con pepstatina, se incrementó con el avance de la maduración. Por otro lado, los perfiles peptídicos de los quesos elaborados con y sin pepstatina presentaron marcadas diferencias cuali y cuantitativas en las distintas etapas de la maduración. En general, los quesos tratados con pepstatina exhibieron cromatogramas más simples y menor cantidad de péptidos que los quesos no tratados. Las diferencias se evidenciaron principalmente en las muestras de 30 y 60 días de maduración en el intervalo de tiempo de retención comprendido entre 25 y 50 min. En particular, los picos que presentaron mayor variabilidad entre quesos elaborados con y sin pepstatina fueron aquellos que eluyeron alrededor de los 26, 27, 33, 35 y 39 min. Estas observaciones son similares a los resultados de Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998b) y O'Mahony y col. (2005) quienes informaron que los péptidos con tiempos de retención semejantes a los del presente trabajo son producidos por la acción secuencial del coagulante y del fermento primario sobre la α_{s1} -caseína. Dado que en los quesos tratados con pepstatina no se produjo hidrólisis de la α_{s1} -caseína, solo se generó una escasa cantidad de péptidos pequeños y de tamaño intermedio, lo que se evidenció tanto en la electroforesis urea-PAGE como en los perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC. Por otra parte, los cromatogramas de los quesos controles y tratados con lactobacilos adjuntos, ya sea elaborados con o sin pepstatina, mostraron algunas diferencias cuantitativas, principalmente hacia el final del proceso de maduración.

Luego de la comparación visual de los cromatogramas se seleccionaron once picos, identificados con caracteres de la “a” a la “k”, que fueron utilizados como variables independientes para el ACP. Los picos seleccionados fueron aquellos que mostraron mayor variación, y no necesariamente los de mayor altura (Pripp y col., 1999). Los primeros dos componentes principales (CPs) explicaron el 97,27% de la variación total de los datos. El gráfico de los *loadings* (Figura 5.8A) reveló que todas las variables seleccionadas exhibieron alta influencia sobre el CP1, excepto el pico “c” que impactó sólo de manera considerable en el eje CP2. Los picos con alta influencia sobre CP1 prevalecieron en los cromatogramas de los quesos no tratados con pepstatina; estos picos estuvieron ausentes o presentes en una concentración mucho menor en los quesos elaborados con la adición del inhibidor. El pico “c”, con elevado *loading* sobre CP2, fue característico de los cromatogramas de los quesos

elaborados con la adición de pepstatina a todos los tiempos de maduración. El gráfico de la distribución de las muestras sobre el CP1 y CP2 se presenta en la Figura 5.8B. La variabilidad de los quesos de 1 día fue muy baja, pero se incrementó en las muestras de 30 y 60 días de maduración. La influencia tanto del tiempo de maduración como del tipo de tratamiento - con o sin pepstatina -, se evidenció sobre ambos componentes principales, pero no se detectó efecto alguno sobre la variación de los datos atribuible al empleo del cultivo adjunto. Todos los quesos de 1 día fueron localizados muy cerca unos de otros, aunque tendieron a separarse por tipo de queso (elaborados con o sin pepstatina), aún en esta etapa temprana de la maduración. El AC clasificó a las muestras en cuatro grupos diferentes, indicados en la Figura 5.8B con elipses. El cluster 1 se compuso por todos los quesos de 1 día, ya sea elaborados con o sin pepstatina o cultivo adjunto. El cluster 2 incluyó a los quesos controles y tratados con adjunto de 30 días, elaborados sin pepstatina, mientras que los mismos quesos pero a los 60 días de maduración fueron reunidos en un cluster diferente (cluster 3). Por el contrario, tanto los quesos controles y experimentales de 30 como los de 60 días de maduración tratados con pepstatina resultaron incluidos en un mismo cluster (cluster 4). Este último agrupamiento puso en evidencia la inhibición de la proteólisis primaria mediada por el coagulante, y la consecuente disminución de la proteólisis secundaria, durante la maduración. O'Mahony y col. (2005) encontraron resultados similares: en su estudio, los quesos controles y tratados con pepstatina se separaron en clusters diferentes, y las muestras elaboradas con 10 $\mu\text{mol/L}$ de pepstatina se agruparon en un mismo cluster, independientemente del tiempo de maduración. Si bien se detectaron diferencias entre los perfiles peptídicos de quesos elaborados con y sin lactobacilos adjuntos, el AC no detectó agrupamiento de estas muestras, a diferencia de lo observado para la cepa de *Lb. plantarum* I91 en un trabajo previo (Milesi y col., 2008). Probablemente esto ocurrió debido a que la variación entre los perfiles peptídicos se debe principalmente a las diferencias en la actividad del coagulante. Los cambios debidos a este factor fueron de gran impacto y probablemente enmascararon las sutiles diferencias causadas por la acción del cultivo adjunto. No obstante, también puede deberse simplemente a que *Lb. plantarum* I91 mostró una baja influencia en la proteólisis secundaria en el modelo de queso miniatura tipo Cheddar. Varios investigadores encontraron cepas de lactobacilos adjuntos que no ocasionaban cambios notables en los perfiles peptídicos de distintas variedades de quesos (McSweeney y col., 1994; Lynch y col., 1999; Hynes y col., 2001a; Michaelidou y col., 2003).

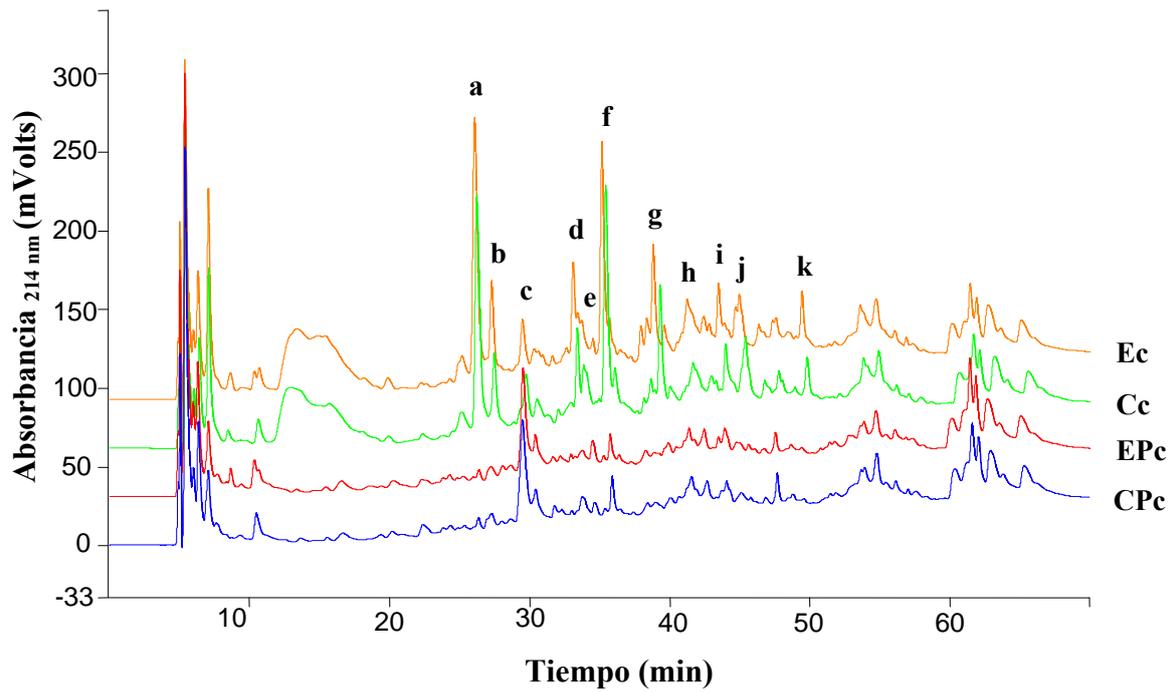
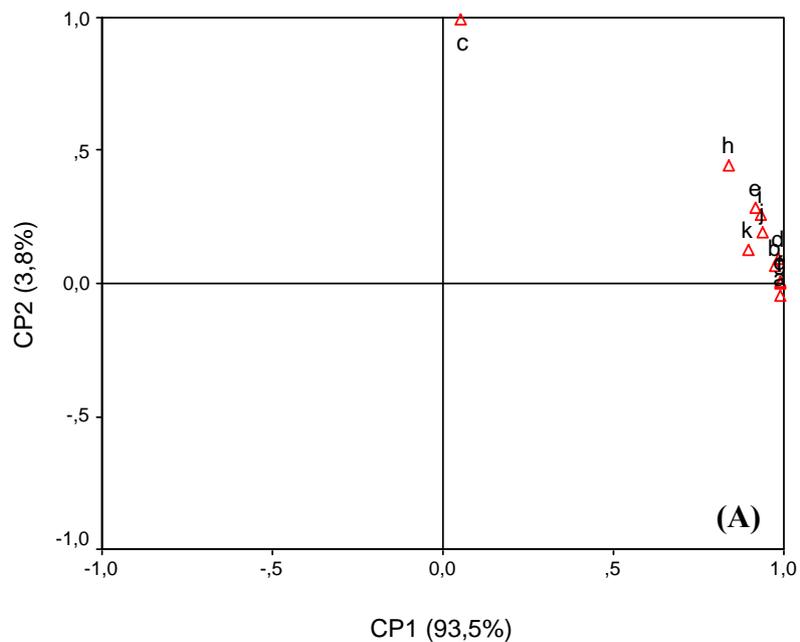


Figura 5.7. Perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4,6 de los quesos tipo Cheddar miniatura de 60 días de maduración, elaborados con y sin pepstatina o cultivo adjunto. CPc y Cc, quesos controles elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. EPc y Ec, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin pepstatina, respectivamente.



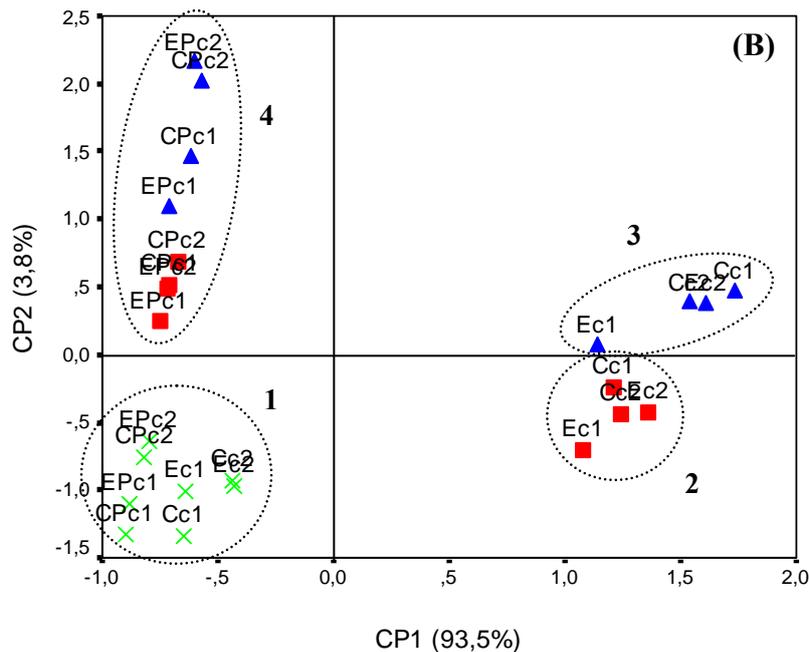


Figura 5.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de las fracciones solubles a pH 4,6 de los quesos correspondientes a la experiencia del coagulante. **A)** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B)** Gráfico de los *scores* de los quesos de 1 (x), 30 (■) y 60 (▲) días de maduración. CPc y Cc, quesos controles elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. EPc y Ec, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. El número posterior al tipo de queso hace referencia a la réplica de elaboración.

La Figura 5.9 muestra los perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC de la fracción soluble a pH 4,6 de los quesos controles y experimentales de 60 días de maduración elaborados con y sin solución de plasmina. La concentración de la mayor parte de los péptidos en los cromatogramas de los cuatro tipos de quesos se incrementó con el tiempo de maduración. La comparación visual de los perfiles peptídicos de los quesos producidos con y sin plasmina reveló algunas pequeñas diferencias cuantitativas luego de 30 y 60 días de maduración. Upadhyay y col. (2004) informaron que las concentraciones de péptidos con tiempos de retención entre 55-60 min en los cromatogramas de la fracción soluble en etanol al 70% de quesos tipo Cheddar fueron mayores en las muestras tratadas con estreptoquinasa comparado con los quesos controles, y que se incrementaron con niveles crecientes de adición de esta enzima. Barrett y col. (1999) también encontraron concentraciones mayores de péptidos hidrofóbicos, que eluyeron entre 52-58 min, en los cromatogramas de los quesos elaborados con 5 U/ml de uroquinasa con respecto a los quesos controles. Se ha informado

(Kelly y O'Donnell, 1998; Upadhyay y col., 2004) que los péptidos que eluyen en la región hidrofóbica de los cromatogramas corresponden a los componentes de la fracción proteosa peptona, que en su mayoría constituyen productos de degradación de la β -caseína por acción de la plasmina. En nuestro estudio, el incremento en la actividad de plasmina del queso no ocasionó un incremento notable en la concentración de péptidos hidrofóbicos. Al igual que en la experiencia 1, se observaron algunas diferencias cuantitativas entre los cromatogramas de los quesos elaborados con y sin cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91 al final del periodo de maduración.

Como en la experiencia anterior, once picos rotulados de la “a” a la “k” fueron seleccionados y utilizados como variables independientes en el ACP. Se extrajeron los dos primeros CP, que explicaron el 98,46% de la variación global de los datos. Como se observa en el gráfico de los *loading* (Figura 5.10A), todas las variables seleccionadas exhibieron una elevada correlación con el CP1, mientras que sólo los picos *f*, *h*, *i*, *j*, *k* mostraron una influencia relativa sobre el CP2. Los picos *g* y *e*, localizados en la región negativa del CP2 predominaron en los perfiles peptídicos de los quesos de 30 días de maduración. El resto de los picos, definidos por valores positivos de CP1 y CP2, prevalecieron en los quesos de 60 días de maduración. Los picos *b*, *c*, *d*, *f*, y en particular *h*, *i*, *j* y *k*, que eluyeron en la región hidrofóbica de los cromatogramas, estuvieron presentes en concentraciones ligeramente superiores en los quesos tratados con solución de plasmina. El gráfico de los *scores* de las muestras luego de 1, 30 y 60 días de maduración se muestra en la Figura 5.10B. Se observó poca variabilidad entre las muestras de queso de cada tiempo de maduración. Por otro lado, durante la maduración no se observó agrupamiento de las muestras a lo largo de ambos CPs en base a los diferentes tratamientos aplicados (adición de plasmina o cultivo adjunto). Los quesos se distribuyeron de acuerdo al tiempo de maduración sobre el eje CP2, mientras que sólo los quesos de 1 día se separaron del resto a lo largo del CP1. El AC confirmó estos resultados dado que las muestras se distribuyeron en tres grupos principales compuestos por todos los quesos de 1 (cluster 1), 30 (cluster 2) y 60 (cluster 3) días de maduración, independientemente de la actividad de plasmina en los quesos o de la presencia de los lactobacilos adjuntos (Figura 5.10B).

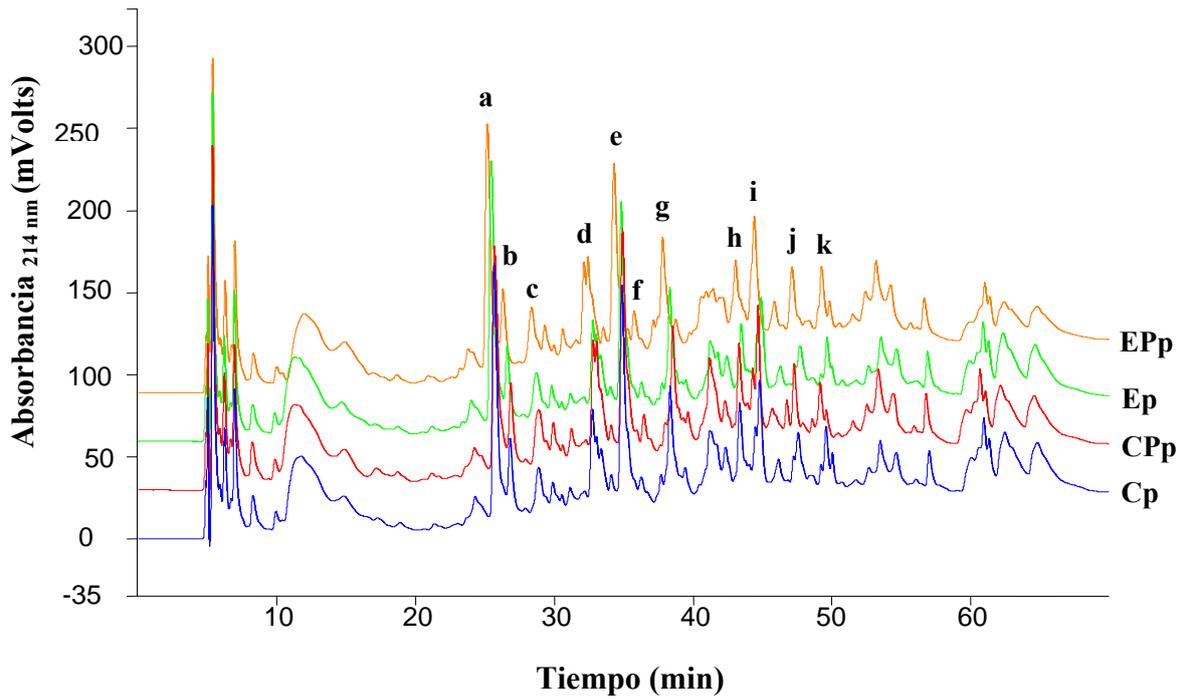
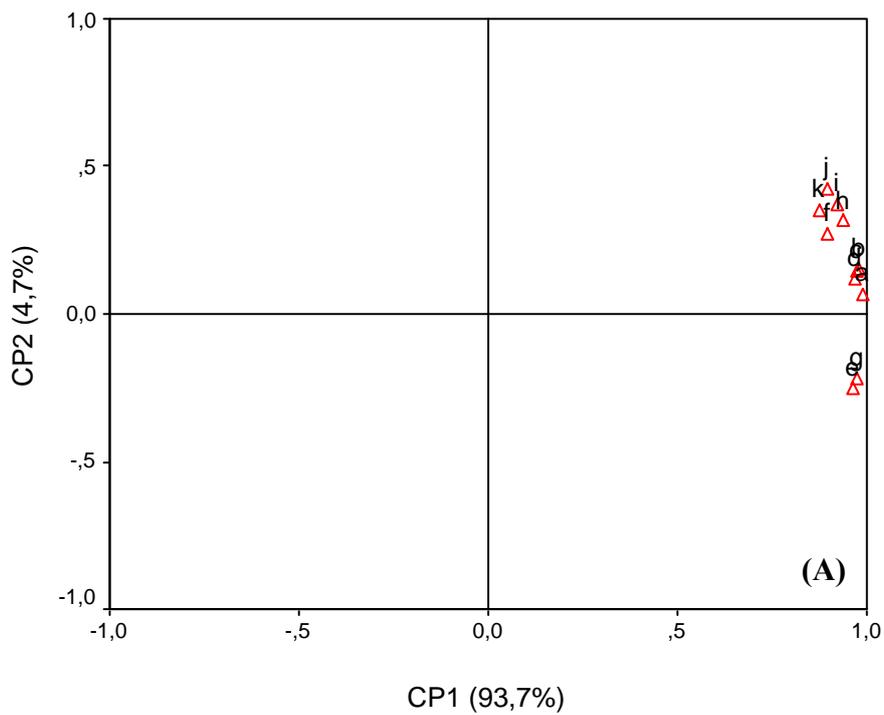


Figura 5.9. Perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4,6 de los quesos tipo Cheddar miniatura de 60 días de maduración, elaborados con y sin solución de plasmina o cultivo adjunto. CPP y Cp, quesos controles elaborados con y sin plasmina, respectivamente. EPp y Ep, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin plasmina, respectivamente.



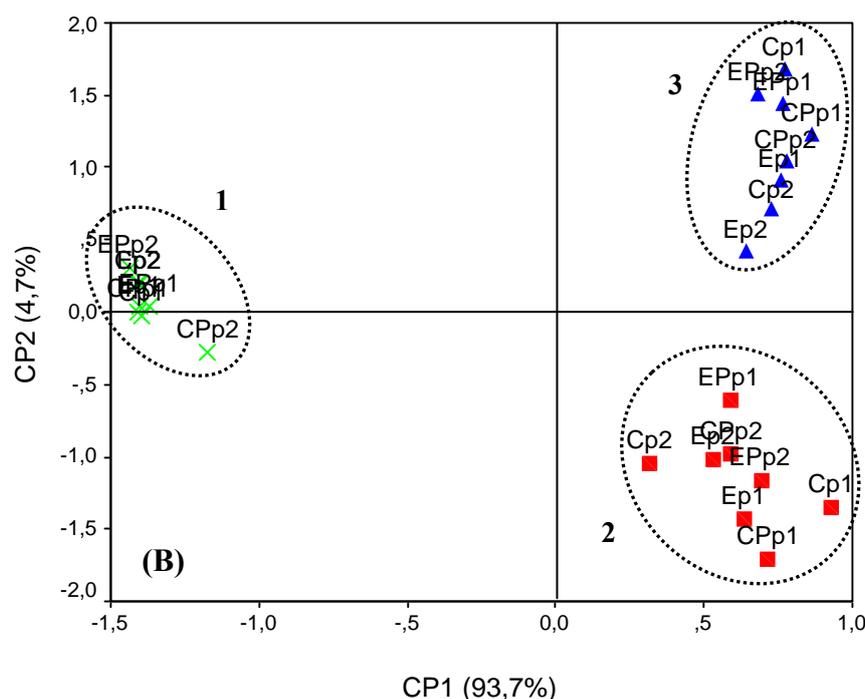


Figura 5.10. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de las fracciones solubles a pH 4,6 de los quesos correspondientes a la experiencia de la plasmina. **A)** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B)** Gráfico de los *scores* de los quesos de 1 (×), 30 (■) y 60 (▲) días de maduración. CPp y Cp, quesos controles elaborados con y sin plasmina, respectivamente. EPp y Ep, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin plasmina, respectivamente. El número posterior al tipo de queso hace referencia a la réplica de elaboración.

3.4.5. Aminoácidos libres totales e individuales

Los niveles de AAL totales de los quesos Cheddar miniatura elaborados con y sin agregado de pepstatina o lactobacilos adjuntos, luego de 1, 30 y 60 días de maduración, se muestran en la Figura 5.11. Los quesos controles y experimentales tratados con pepstatina presentaron niveles de AAL totales significativamente menores ($P \leq 0,05$) que los quesos controles y experimentales no tratados, respectivamente, luego de 60 días de maduración. Este patrón concuerda con los resultados de Shakeel-Ur-Rehman y col. (1998b) y de O'Mahony y col. (2005) quienes detectaron una disminución en el contenido de AAL al incrementar los niveles de adición de pepstatina. Resultados similares fueron publicados por Lane y col. (1997b) y Hesari y col. (2006) quienes encontraron concentraciones significativamente menores de AAL en queso Cheddar y queso blanco iraní obtenido por

ultrafiltración, en ambos casos libres de cuajo, en comparación con los respectivos quesos controles.

Ambos quesos experimentales, elaborados ya sea con o sin pepstatina, exhibieron concentraciones de AAL totales significativamente mayores ($P \leq 0,05$) que sus respectivos controles luego de 30 y 60 días de maduración, lo cual indicó que las peptidasas de *Lb. plantarum* I91 contribuyeron significativamente a la liberación de AAL durante la maduración. Un incremento en los niveles de AAL totales en quesos con agregado de diferentes cepas de lactobacilos como cultivo adjunto ha sido previamente reportado por otros investigadores (McSweeney y col., 1994; Lynch y col., 1999; Madkor y col., 2000; Swearingen y col., 2001; Hynes y col., 2003a; Michaelidou y col., 2003; Di Cagno y col., 2006; Irigoyen y col., 2007). Además, el incremento en el contenido total de AAL en los quesos elaborados con lactobacilos adjuntos, comparado con sus respectivos controles, fue bastante similar, independientemente de la actividad del coagulante residual. Esta observación sugiere que la extensión de la proteólisis primaria y la disponibilidad de péptidos generados por la acción del coagulante sobre las caseínas, no influyeron en la actividad peptidolítica de *Lb. plantarum* I91. Estos resultados representan un hallazgo novedoso dado que, **i)** la proteólisis en el queso se puede describir como una cadena de reacciones donde las caseínas intactas son degradadas hasta aminoácidos libres, donde la acción del coagulante sobre las caseínas se considera el primer paso, y **ii)** hasta el momento se ignoraba si la disponibilidad de péptidos producidos por el coagulante tenía o no influencia en la actividad peptidolítica de los lactobacilos adjuntos. La evidencia aportada demuestra que la proteólisis mediada por coagulante no es limitante para la expresión de la actividad peptidolítica de *Lb. plantarum* 91.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el contenido de AAL totales entre quesos controles elaborados sin pepstatina (Cc) y quesos experimentales tratados con pepstatina (EPc). Estos resultados indican que la adición de *Lb. plantarum* I91 a los quesos elaborados con pepstatina, incrementó el contenido total de AAL en una extensión que permitió igualar su valor al de los quesos controles, y proveen mayor evidencia sobre la habilidad de la cepa en estudio para formar AAL.

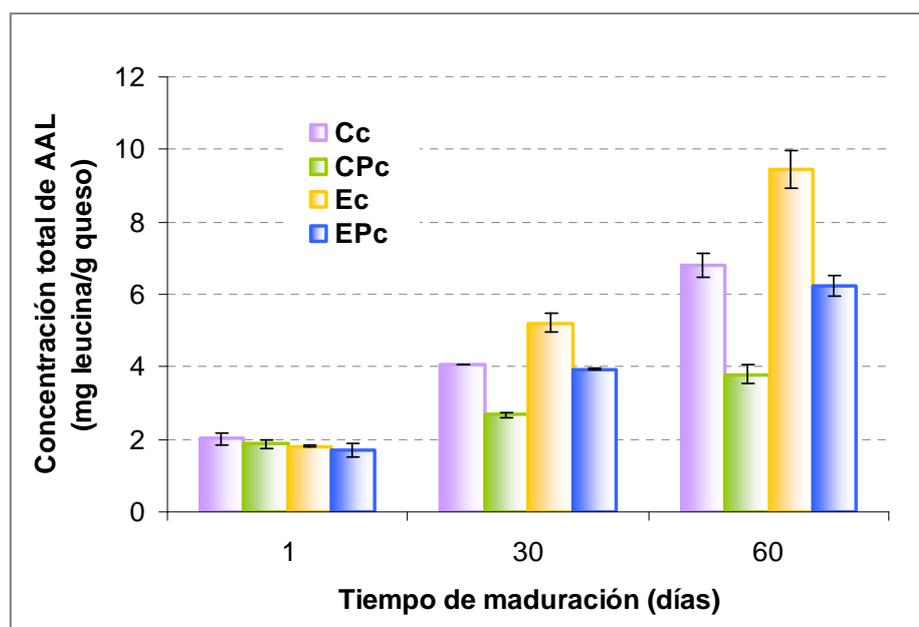


Figura 5.11. Concentración total de AAL de los quesos tipo Cheddar miniatura controles y experimentales elaborados con y sin pepstatina, luego de 1, 30 y 60 días de maduración. CPc y Cc, quesos controles elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. EPc y Ec, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

El perfil de AAL individuales de los quesos controles y experimentales elaborados con y sin pepstatina luego de 1 y 60 días de maduración se muestra en las Figuras 5.12A y 5.12B, respectivamente. El contenido de la mayoría de los AAL se incrementó ($P \leq 0,05$) con el tiempo de maduración en todos los quesos, excepto en los quesos controles tratados con pepstatina (CPc) en los cuales unos pocos aminoácidos mostraron un aumento significativo con el progreso de la maduración. Los AAL individuales mayoritarios en los quesos controles y experimentales de 60 días de maduración elaborados sin pepstatina fueron serina, ácido glutámico, prolina, lisina, leucina y fenilalanina, los que representaron alrededor del 70% del contenido total de AAL. Fox y col. (2000) informaron que los aminoácidos principales en queso Cheddar son serina, ácido glutámico, arginina, lisina, leucina y fenilalanina. Sheehan y col. (2007) encontraron resultados similares, con la única excepción de que la valina, en lugar de la arginina, fue uno de los aminoácidos mayoritarios. En los quesos controles y experimentales de 60 días de maduración tratados con pepstatina predominaron, ácido glutámico, histidina, treonina, prolina, lisina y leucina, los que representaron el 68 y 63% del contenido total de AAL, respectivamente. En general, los niveles de serina, glicina, histidina,

treonina, alanina, valina, metionina, lisina y leucina luego de 60 días de maduración fueron significativamente mayores ($P \leq 0,05$) en los quesos elaborados con lactobacilos adjuntos comparado con sus respectivos controles. Por otro lado, los quesos tratados con pepstatina presentaron un contenido significativamente menor ($P \leq 0,05$) de serina, glicina, arginina, valina, leucina y fenilalanina que los quesos no tratados. Se ha indicado que la fracción α_{s1} -caseína posee un alto contenido de valina, leucina y fenilalanina, lo que es coincidente con los niveles más altos de estos aminoácidos detectados en los quesos con actividad normal de enzima coagulante (Poveda y col., 2004a).

Las concentraciones individuales de cada uno de los AAL en los quesos luego de 1 y 60 días de maduración se utilizaron como variables para el ACP. Asimismo, se aplicó el AC a fin de detectar agrupamientos de muestras en base a sus perfiles de AAL individuales. Se retuvieron los dos primeros CPs; el CP1 y el CP2 explicaron el 77,7% y el 10,9%, respectivamente, de la variabilidad total de los datos. Los aminoácidos que presentaron una mayor correlación con el CP1 fueron serina, glicina, histidina, treonina, valina, metionina, lisina, leucina y fenilalanina, mientras que isoleucina, y en menor extensión, prolina, alanina, histidina, lisina y metionina exhibieron una influencia relativa sobre el eje CP2 (Figura 5.13 A). El gráfico de los *scores* (Figura 5.13B) claramente mostró un agrupamiento de las muestras de acuerdo al tipo de queso (elaborado con y sin pepstatina o cultivo adjunto) sobre ambos CPs, y en base al tiempo de maduración a lo largo del CP1. Se propusieron cuatro clusters para el AC, el cual clasificó a las muestras como se detalla a continuación: el cluster 1 se compuso por todos los quesos de 1 día, independientemente de la adición de pepstatina o lactobacilos adjuntos, como así también por uno de los quesos controles de 60 días de maduración tratados con pepstatina; el cluster 2 incluyó a un queso control y a ambos quesos experimentales tratados con pepstatina de 60 días de maduración; los clusters 3 y 4 agruparon a los quesos controles y experimentales de 60 días de maduración elaborados sin pepstatina, respectivamente.

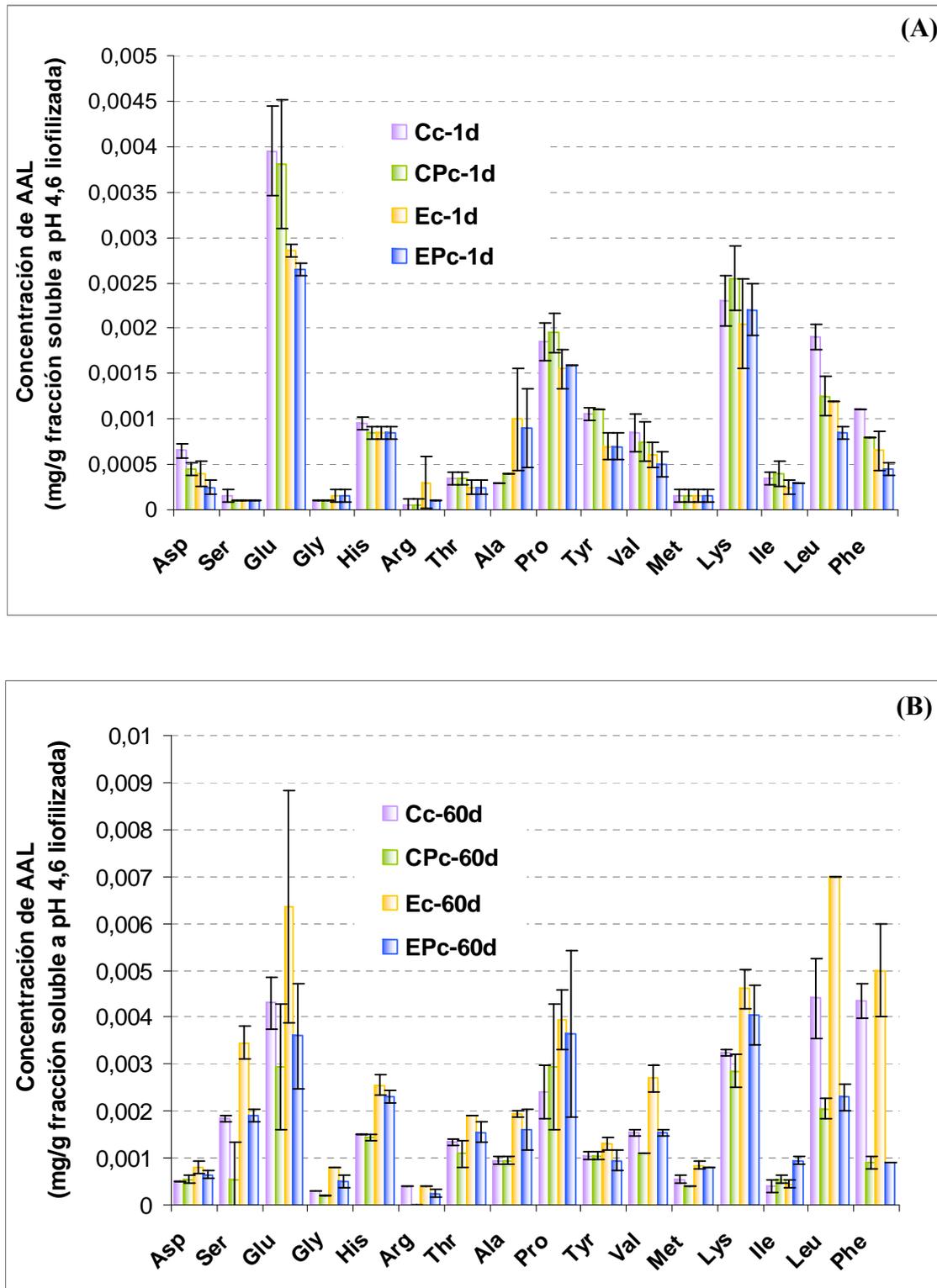


Figura 5.12. Perfil de AAL individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura de la experiencia del coagulante, luego de 1 (A) y 60 (B) días de maduración. CPc y Cc, quesos controles elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. EPc y Ec, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

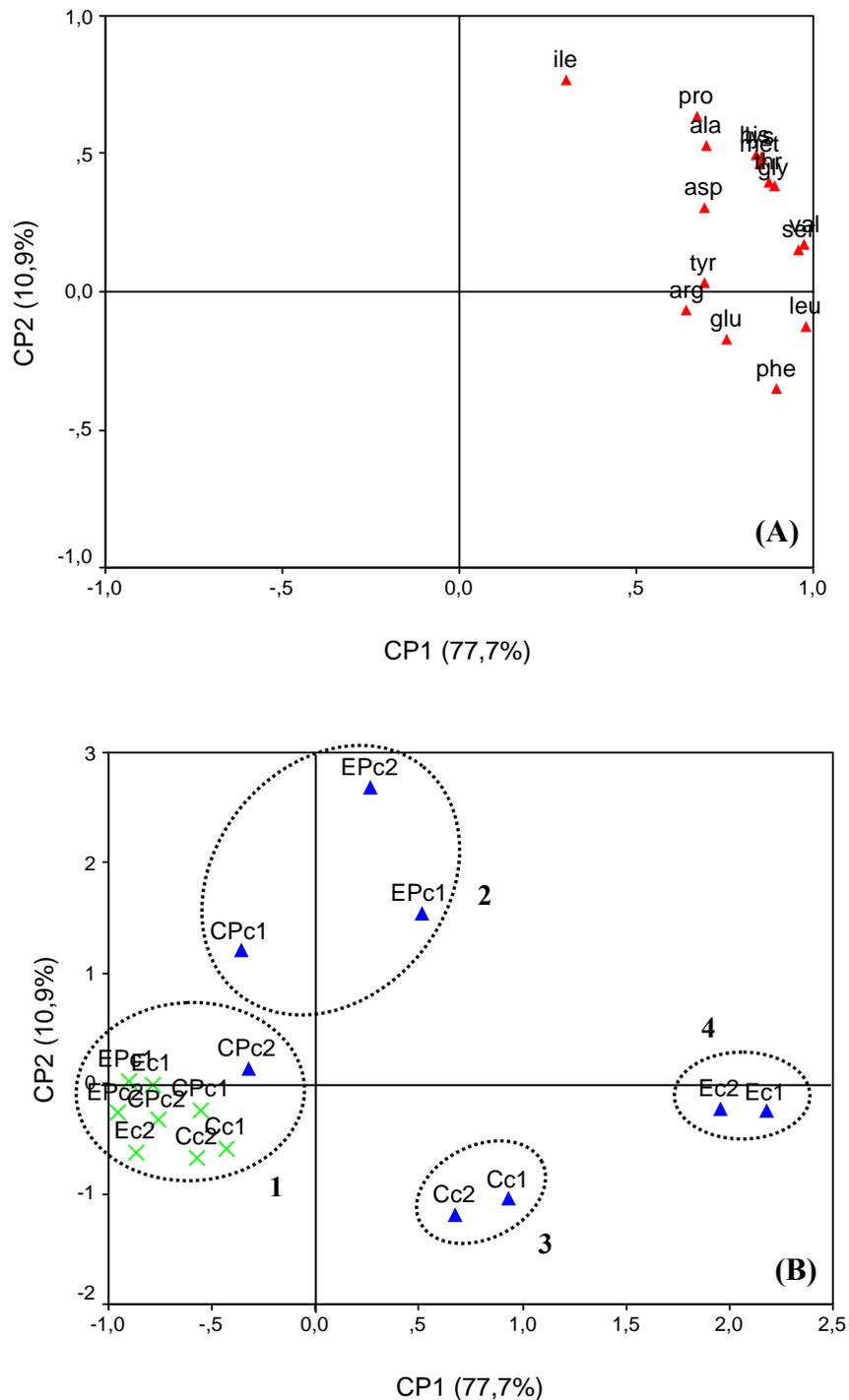


Figura 5.13. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura de la experiencia del coagulante. **A)** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B)** Gráfico de los *scores* de los quesos de 1 (×) y 60 (▲) días de maduración. CPc y Cc, quesos controles elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. Epc y Ec, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin pepstatina, respectivamente. El número posterior al tipo de queso hace referencia a la réplica de elaboración.

En la Figura 5.14 se presenta el gráfico del contenido total de AAL, obtenido mediante el método TNBS, de los quesos miniatura de 1, 30 y 60 días, elaborados con y sin adición de plasmina o cultivo adjunto. El contenido total de AAL se incrementó en todos los quesos con el tiempo de maduración. No se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el contenido total de AAL entre quesos elaborados con y sin solución de plasmina, lo que indicó que el incremento en la actividad de plasmina no contribuyó a una mayor formación de aminoácidos. Estos resultados son similares a los reportados por Upadhyay y col. (2004) quienes no detectaron diferencias significativas en la concentración total de AAL entre quesos elaborados con niveles crecientes de estreptoquinasa y quesos controles. Estos autores informaron que la plasmina ejerce un efecto menor en la producción de AAL, pero es responsable de la producción de péptidos de tamaño intermedio, que constituyen los precursores para la formación de AAL por parte del sistema de peptidasas del fermento primario. Farkye y Fox (1992) y O'Farrell y col. (2002) arribaron a resultados similares; estos autores observaron que el incremento de la actividad de plasmina en el queso no afectó los niveles de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico, que representan principalmente a los aminoácidos libres.

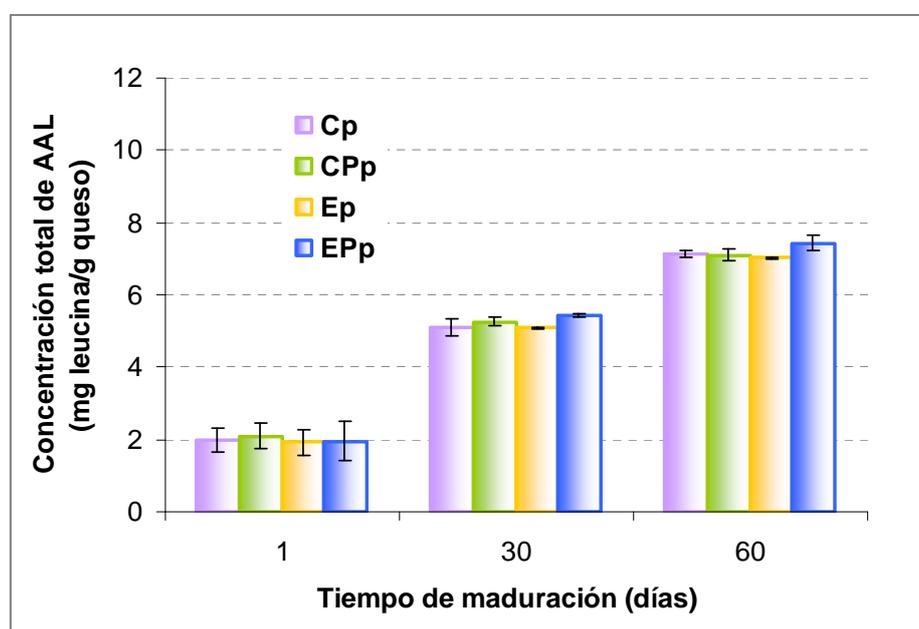


Figura 5.14. Concentración total de AAL de los quesos tipo Cheddar miniatura controles y experimentales elaborados con y sin solución de plasmina, luego de 1, 30 y 60 días de maduración. CPp y Cp, quesos controles elaborados con y sin plasmina, respectivamente. EPp y Ep, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin

plasmina, respectivamente. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

En las Figuras 5.15A y 5.15B se muestra la concentración de cada AAL en los quesos controles y experimentales elaborados con o sin solución de plasmina, luego de 1 y 60 días de maduración, respectivamente. Los AAL más abundantes en todos los quesos de 60 días de maduración fueron serina, glutamato, prolina, lisina, leucina y fenilalanina, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la experiencia 1 para quesos elaborados sin pepstatina. Sin embargo, contrariamente a la tendencia observada en la experiencia del coagulante, la adición del fermento adjunto no incrementó el contenido total de AAL en los quesos, lo que podría atribuirse a la menor dosis inicial de *Lb. plantarum* I91. Otros investigadores también han observado una relación entre la concentración de aminoácidos y la dosis de fermento adjunto (Farkye y col., 1995; Kieronczyk y col., 2004). En el trabajo desarrollado por Kieronczyk y col. (2004), se investigó la habilidad de dos cepas de lactobacilos para producir compuestos de aroma a partir de aminoácidos en un *slurry* de queso, y también se evaluó el efecto del nivel de inóculo (10^3 , 10^7 ó 10^9 UFC/g) en sus actividades bioquímicas. Los investigadores observaron que a menor dosis de adjunto, menor resultaba el contenido de aminoácidos; este último fue tres veces menor en los *slurries* inoculados con 10^3 UFC/g de fermento adjunto, que en los que contenían 10^7 UFC/g, luego de seis semanas de incubación a 13°C.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de la mayoría de los AAL entre los quesos debidos a los distintos tratamientos aplicados (adición de plasmina o lactobacilos adjuntos), excepto para glicina y arginina luego de 60 días de maduración.

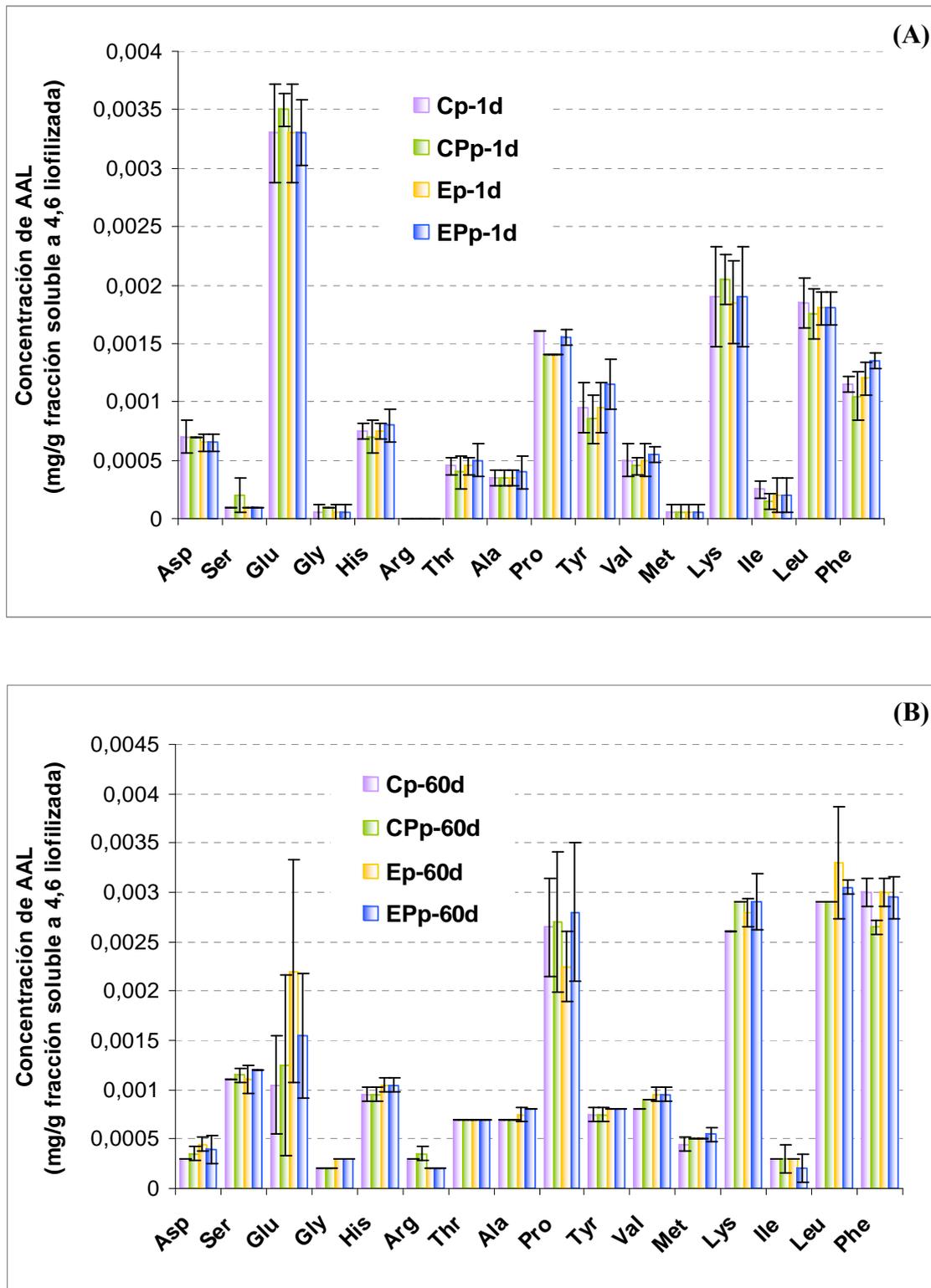
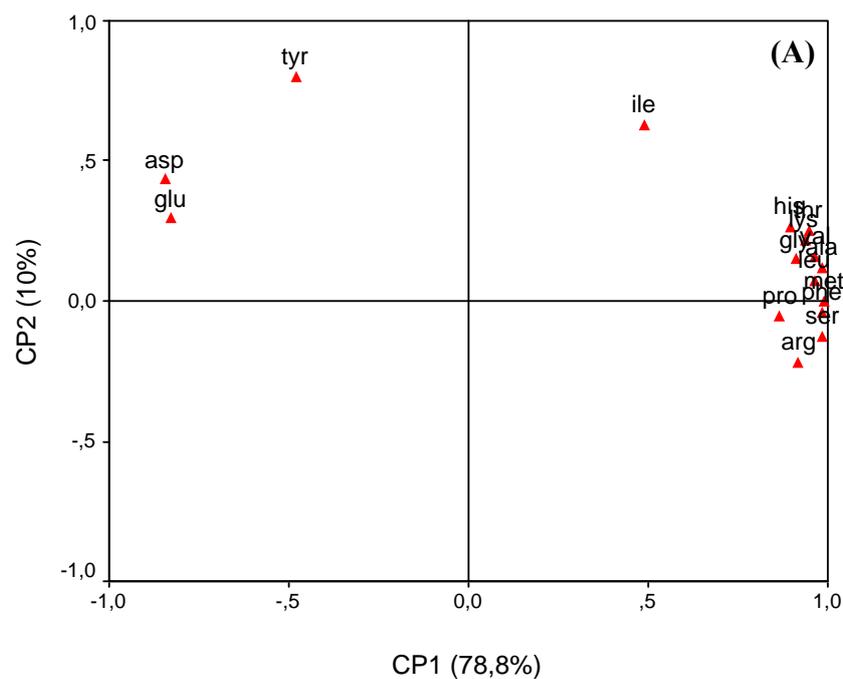


Figura 5.15. Perfil de AAL individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura de la experiencia de la plasmina, luego de 1 (A) y 60 (B) días de maduración. Cpp y Cp, quesos controles elaborados con y sin plasmina, respectivamente. Epp y Ep, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin plasmina, respectivamente. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

Los datos del contenido individual de AAL de las muestras de queso de 1 y 60 días de maduración se analizaron mediante ACP y AC. Los CP1 y CP2 explicaron el 78,8% y el 10,0% de la variación global, respectivamente. Los aminoácidos más correlacionados con el CP1 fueron serina, glicina, arginina, treonina, alanina, valina, metionina, lisina, leucina y fenilalanina, mientras que tirosina y, en menor extensión, isoleucina y ácido aspártico tuvieron un impacto relativo sobre el CP2 (Figura 5.16A). Como puede observarse en el gráfico de los *scores* (Figura 5.16B), las muestras de queso se separaron de acuerdo al tiempo de maduración a lo largo del CP1, mientras que se detectó cierta tendencia a la separación de los quesos elaborados con y sin cultivo adjunto a lo largo del CP2 luego de 60 días de maduración. Por otra parte, se observó cierta variabilidad entre las muestras de 1 día de maduración pertenecientes a diferentes ensayos. De los cuatro clusters propuestos, los clusters 1 y 2 se compusieron por los quesos de 1 día correspondientes a los ensayos 1 y 2, respectivamente, mientras que, los clusters 3 y 4 incluyeron a los quesos controles y tratados con lactobacilos adjuntos de 60 días, respectivamente, independientemente del nivel de actividad de plasmina en los quesos (Figura 5.16B). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el contenido total de AAL entre quesos controles y tratados con adjunto, la aplicación del ACP y AC los reunió en grupos diferentes, lo que sugirió que la adición de *Lb. plantarum* I91 tuvo un impacto en la proteólisis secundaria, dado que modificó el perfil de AAL individuales.



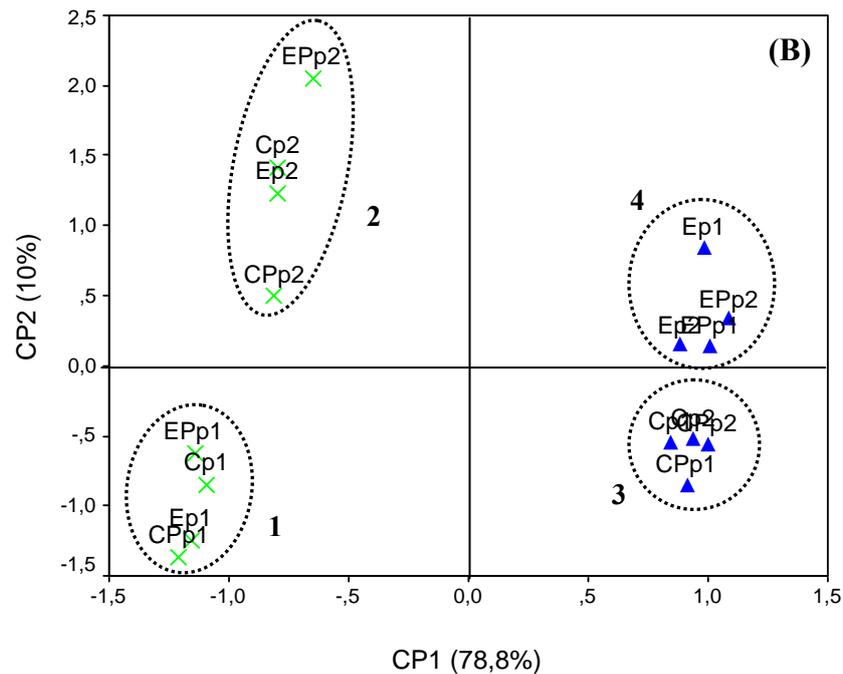


Figura 5.16. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los quesos tipo Cheddar miniatura pertenecientes a la experiencia de la plasmína. **A)** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B)** Gráfico de los *scores* de los quesos de 1 (×) y 60 (▲) días de maduración. CPp y Cp, quesos controles elaborados con y sin plasmína, respectivamente. EPp y Ep, quesos experimentales con la adición de *Lb. plantarum* I91 como cultivo adjunto, elaborados con y sin plasmína, respectivamente. El número posterior al tipo de queso hace referencia a la réplica de elaboración.

3.4.6. Recuentos microbiológicos

Los recuentos del fermento primario y de los lactobacilos adjuntos y adventicios de los quesos de la experiencia del coagulante se muestran en la Figura 5.17. Los recuentos del fermento primario disminuyeron aproximadamente 1 orden log a lo largo de la maduración en todos los quesos. La evolución de la población del fermento primario fue similar en los cuatro tipos de quesos, ya sea elaborados con o sin pepstatina o lactobacilos adjuntos. Esta tendencia indicó que la adición de *Lb. plantarum* I91 o de pepstatina, no influyó en el crecimiento y supervivencia de las bacterias del fermento primario. El cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91 alcanzó recuentos elevados ($\sim 10^8$ UFC/g) en ambos quesos experimentales al comienzo de la maduración y luego permaneció en esos niveles durante todo el transcurso de la misma. En ambos quesos controles, los recuentos de lactobacilos adventicios fueron muy bajos ($< 10^3$ UFC/g) durante los 60 días de maduración. La disminución de la actividad del coagulante

residual y por lo tanto, la inhibición de la proteólisis primaria mediada por el coagulante, no tuvieron influencia alguna en la velocidad de crecimiento y número final alcanzado por los lactobacilos, dado que éstos desarrollaron al mismo nivel en quesos elaborados con y sin adición de pepstatina. De esta forma, tanto el crecimiento como la actividad peptidolítica de la cepa en estudio parecen no depender de la cantidad de péptidos provenientes de la acción del coagulante disponibles en la matriz del queso. Estas observaciones sugieren que el pool relativamente pobre de péptidos y AAL presente en los quesos tratados con pepstatina, fue suficiente para sustentar el crecimiento de los lactobacilos al mismo nivel que en los quesos elaborados sin agregado de pepstatina.

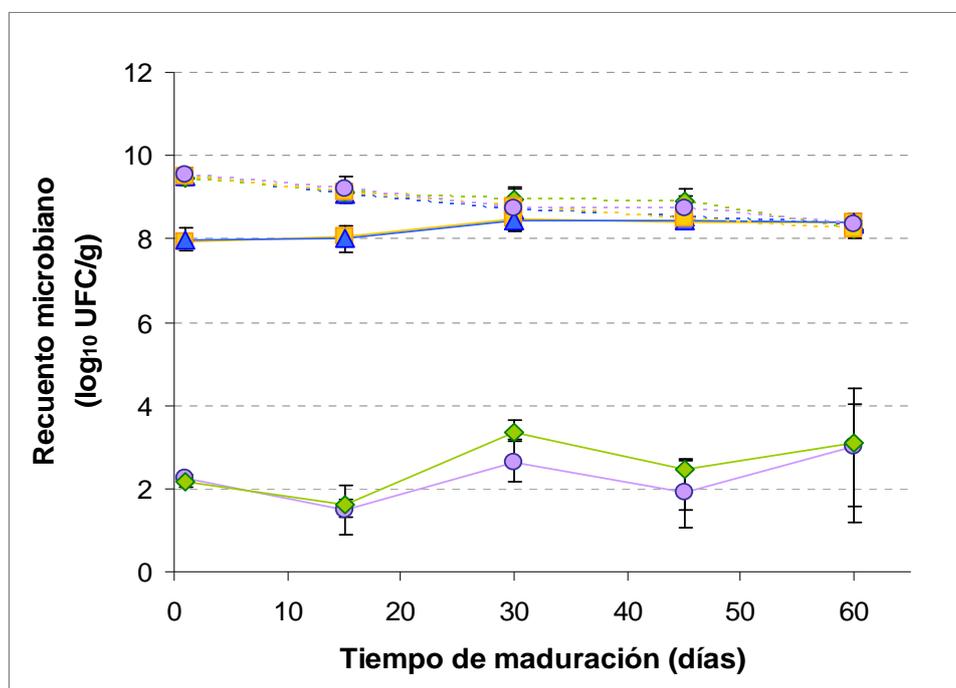


Figura 5.17. Evolución del fermento primario (línea de puntos) y de los lactobacilos (línea continua) en los quesos de la experiencia del coagulante durante la maduración. Cc (●) quesos controles; CPc (◆) quesos controles elaborados con pepstatina; Ec (▲) quesos experimentales; EPc (■) quesos experimentales elaborados con pepstatina. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

La Figura 5.18 muestra los recuentos del fermento primario y de los lactobacilos adjuntos y adventicios en los quesos de la experiencia de la plasmina. El recuento de lactococos disminuyó en alrededor 1,5 ciclos log durante el curso de la maduración, y presentó una tendencia de desarrollo similar en todos los quesos, independientemente de la adición de

plasma o cultivo adjunto. Este resultado indicó que la presencia de los lactobacilos adjuntos o que el incremento en la actividad de plasmina en los quesos, no interfirió con el desarrollo y supervivencia de las células del fermento primario. El cultivo adjunto de *Lb. plantarum* I91 se adicionó a la leche de elaboración al nivel de 10^4 UFC/ml, pero éste creció rápidamente durante la elaboración alcanzando recuentos de $\sim 10^6$ UFC/g en ambos quesos experimentales de 1 día. A partir de ese momento, el recuento de los lactobacilos adjuntos se incrementó gradualmente y se mantuvo en niveles elevados ($\sim 10^8$ UFC/g queso) hasta el final de la maduración. De manera similar a los resultados obtenidos en la experiencia del coagulante, la cepa de *Lb. plantarum* I91 ensayada permaneció viable durante la maduración de los quesos tipo Cheddar miniatura. En los quesos controles elaborados con y sin solución de plasmina, los lactobacilos adventicios permanecieron por debajo de 10^3 UFC/g durante los 60 días de maduración. El incremento de la actividad de plasmina de los quesos, y en consecuencia, el aumento de la proteólisis primaria mediada por la plasmina, no afectaron la velocidad y extensión de crecimiento de los lactobacilos, dado que los lactobacilos adventicios y adjuntos en quesos controles y experimentales, respectivamente, elaborados con y sin agregado de plasmina, presentaron una evolución similar durante la maduración.

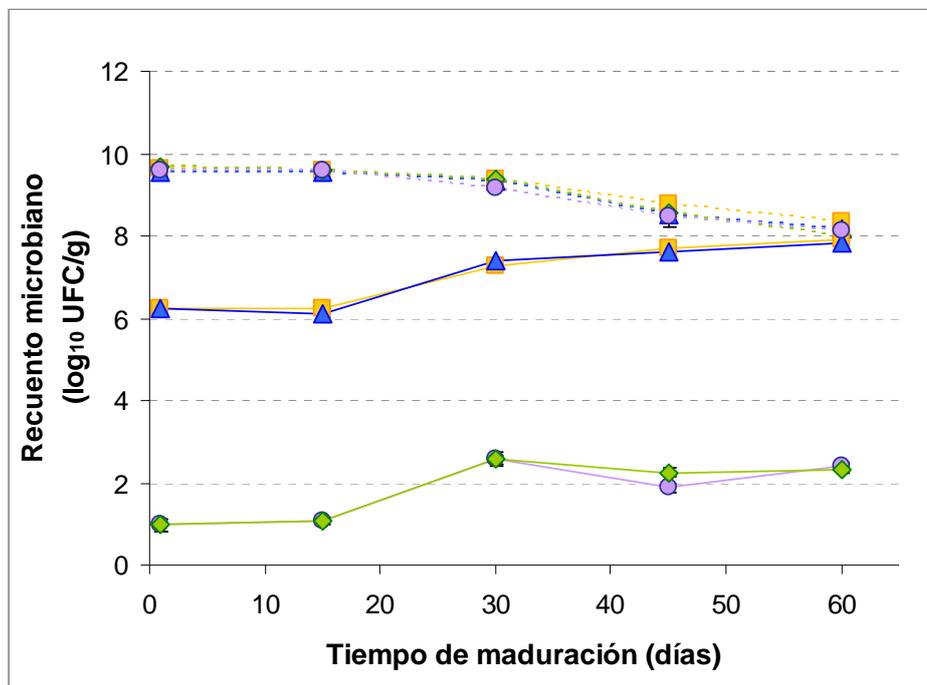


Figura 5.18. Evolución del fermento primario (línea de puntos) y de los lactobacilos (línea continua) en los quesos de la experiencia de la plasmina durante la maduración. Cp (●) quesos controles; CPp (◆) quesos controles elaborados con plasmina; Ep (▲) quesos experimentales; Epp (■) quesos

experimentales elaborados con plasmina. Se informa el promedio y la desviación estándar de dos ensayos de elaboración de queso.

4. Conclusiones

La proteólisis primaria causada por el coagulante residual y la plasmina no afectó el crecimiento y actividad bioquímica de los lactobacilos adventicios y adjuntos en quesos Cheddar miniatura, indicando que no representa un factor limitante para el desarrollo y actividad peptidolítica de lactobacilos en el modelo de queso estudiado. Contrariamente a lo observado por estudios anteriores, que sugieren que la actividad proteolítica de las bacterias del fermento primario pueden favorecer el crecimiento y la peptidólisis de las NSLAB y de los adjuntos de lactobacilos en quesos, el presente trabajo indicó que la proteólisis mediada por las proteasas no microbianas, generalmente adicionadas (coagulante) o naturalmente presentes (plasmina) en la leche de elaboración, no estimuló el desarrollo de los lactobacilos o su actividad bajo las condiciones de estudio.

Conclusiones del trabajo de tesis

El presente trabajo de tesis permitió la selección de dos cepas de lactobacilos mesófilos para la formulación de fermentos adjuntos para quesería: *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91. Tanto en modelos experimentales como en elaboraciones de queso a escala piloto, ambas cepas mostraron buenas propiedades tecnológicas y cumplieron con los requisitos establecidos para fermentos adjuntos. En efecto, las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, mostraron una excelente supervivencia y adaptación en ambos modelos experimentales desarrollados (queso Cremoso miniatura y extracto soluble de queso Reggianito), como así también en distintas variedades de queso (Cremoso, Pategrás y Cheddar), lo que pone en evidencia su robustez frente a distintas tecnologías de elaboración y condiciones medioambientales. Por otro lado, su incorporación como adjuntos en elaboraciones de queso permitió controlar el crecimiento de microorganismos adventicios potencialmente perjudiciales, conduciendo a una mayor uniformidad en la calidad del producto final. Asimismo, a través de sus equipos enzimáticos vinculados con la degradación de péptidos y con la formación de aminoácidos, ambas cepas de lactobacilos condujeron a un incremento de la proteólisis secundaria, y en consecuencia, a una aceleración del proceso de maduración. Esta característica resulta de gran interés en el sector industrial, dado que permite reducir sustancialmente los costos de producción. Finalmente, ambas cepas permitieron obtener quesos con características sensoriales mejoradas, ya que aportaron notas de aroma y sabor más intensas y distintivas.

Además de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, otros dos fermentos se evaluaron como adjuntos, *Lb. rhamnosus* I73 y *Lb. rhamnosus* I77. Dichas cepas no cumplieron con uno de los requisitos establecidos para los cultivos adjuntos, ya que contribuyeron significativamente a la acidificación del queso. Sin embargo, presentan otras propiedades de gran interés, como su capacidad peptidolítica y su potencialidad probiótica, y su incorporación al alimento podría solucionarse mediante diversas estrategias tecnológicas.

El trabajo de tesis desarrollado permitió obtener información novedosa acerca de aspectos poco conocidos del crecimiento y expresión bioquímica de los lactobacilos mesófilos durante la maduración de quesos. En efecto, se encontró que la viabilidad y la actividad peptidolítica de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 varían de acuerdo a la actividad y especificidad de las enzimas proteolíticas del fermento primario utilizado en la elaboración

del queso, pero no resultan afectadas por la actividad proteolítica de las principales enzimas no microbianas (coagulante y plasmina), responsables de la proteólisis primaria en el proceso de maduración. Los fermentos adjuntos fueron capaces de crecer y ejercer acciones bioquímicas cuantificables, aún en quesos con limitada proteólisis, ya sea que ésta fuera determinada por la baja actividad de enzimas no microbianas, como por la etapa temprana de la maduración.

Anexo

1. Impacto de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 en los perfiles peptídicos

1.1. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh209 del inicio de la maduración

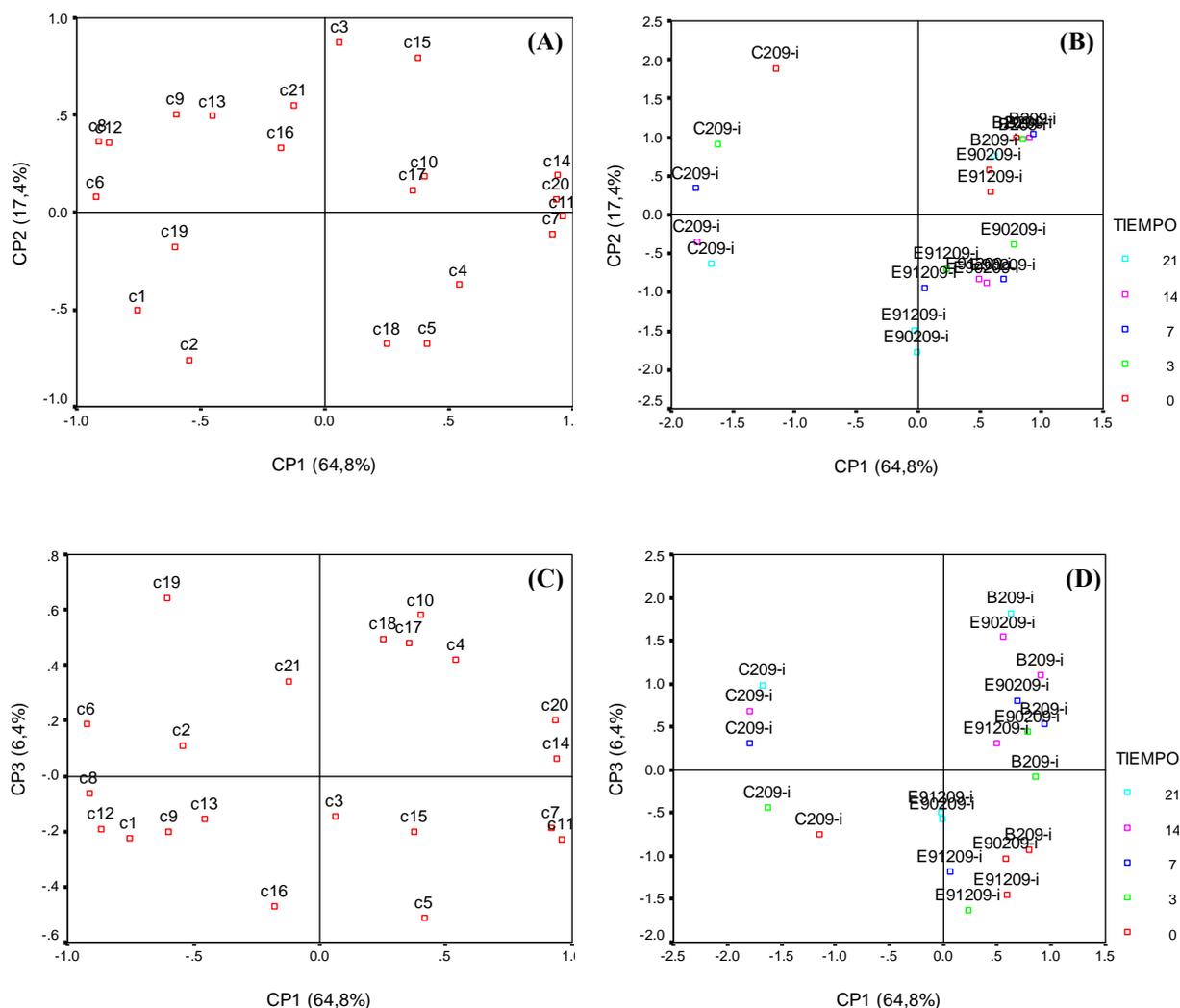


Figura I.1. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh209 del inicio de la maduración (i). **A** y **C**: Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B** y **D**: Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

1.2. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh209 de 90 días de maduración

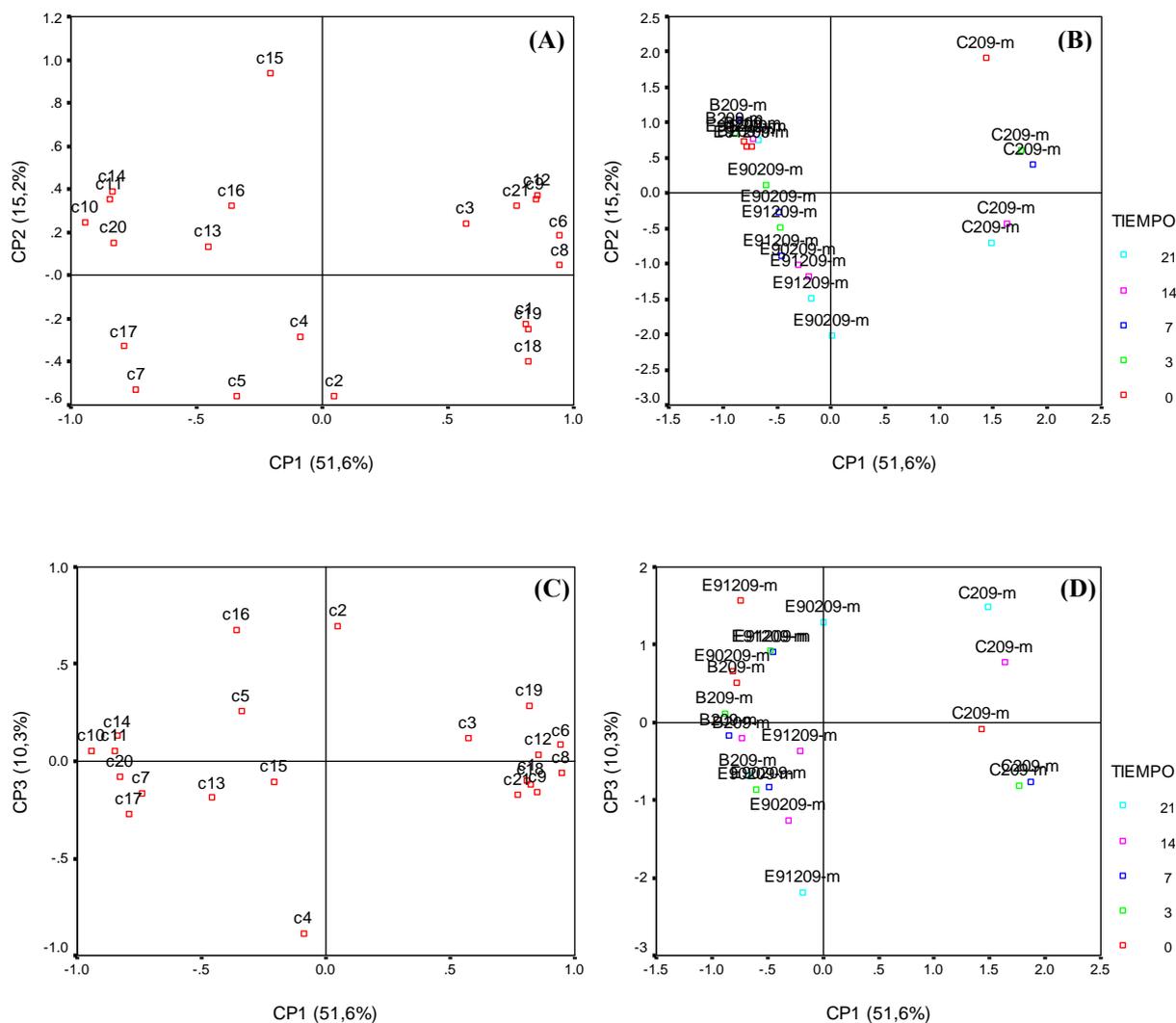


Figura 1.2. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh209 de 90 días de maduración (m). **A y C:** Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B y D:** Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

1.3. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh138 del inicio de la maduración

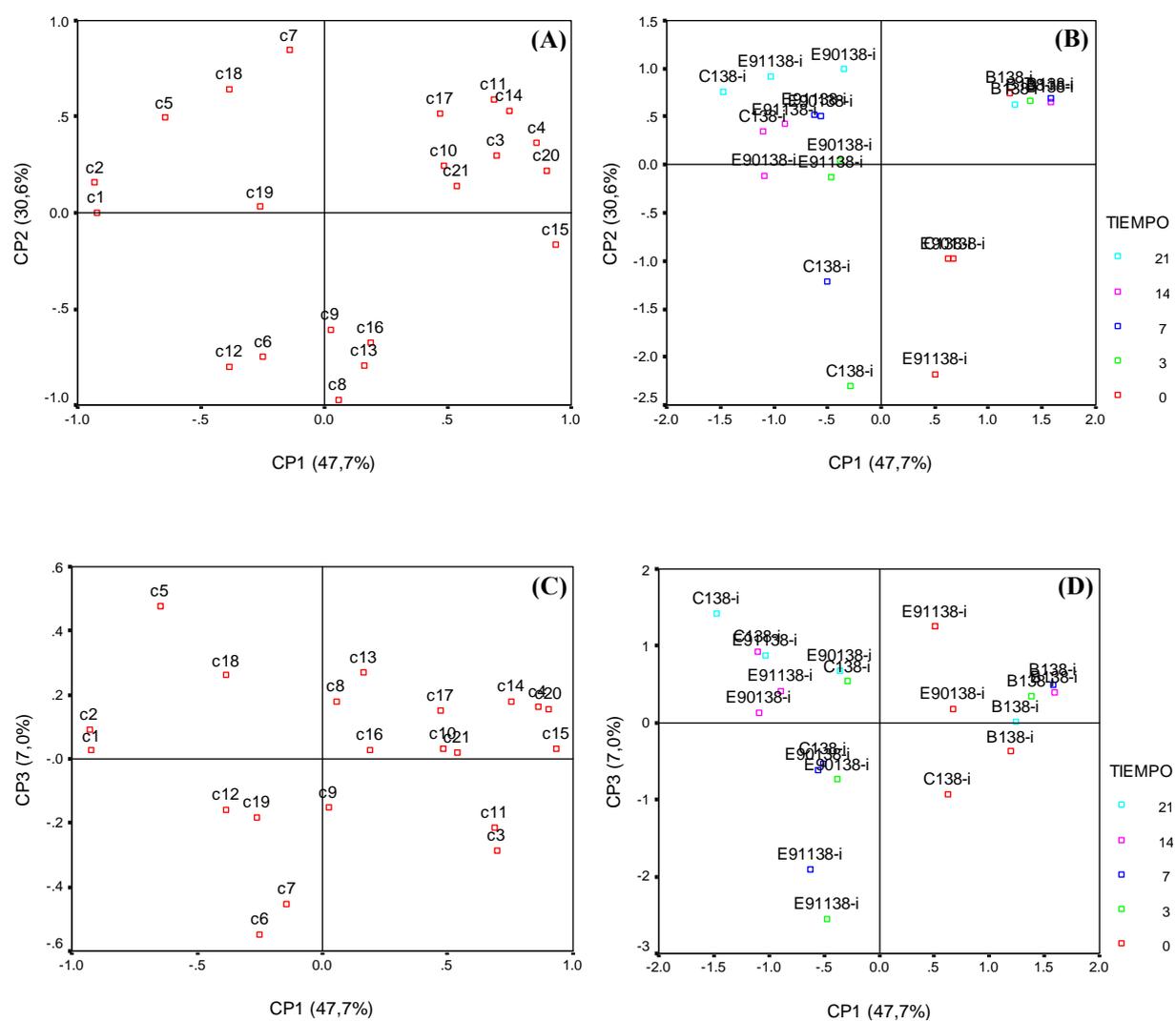


Figura I.3. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh138 del inicio de la maduración (i). **A** y **C**: Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B** y **D**: Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

1.4. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh138 de 90 días de maduración

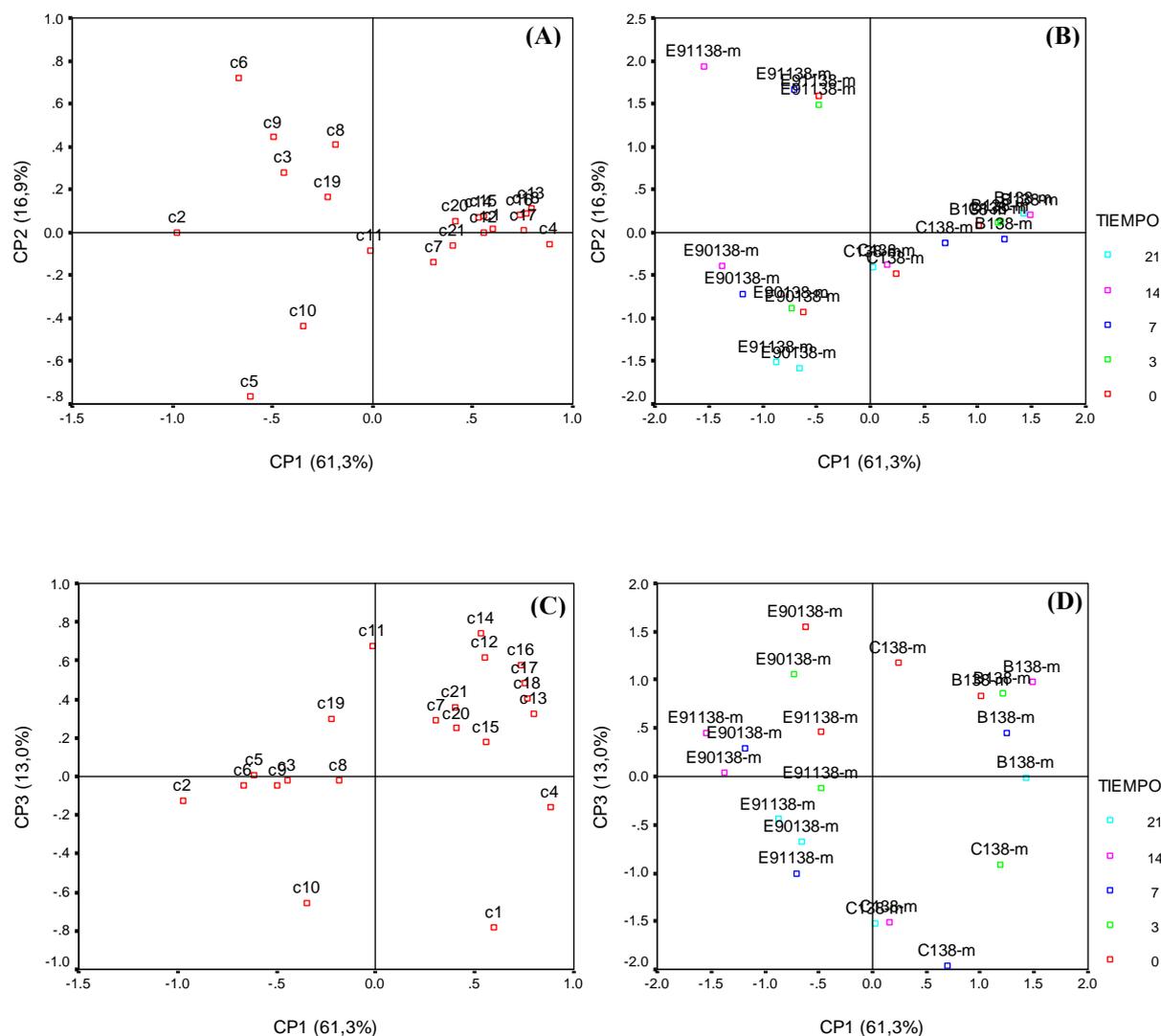


Figura I.4. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh138 de 90 días de maduración (m). **A** y **C**: Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B** y **D**: Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

2. Influencia de la peptidólisis causada por el fermento primario en las actividades peptidolíticas de los lactobacilos mesófilos en estudio

2.3. Efecto de la actividad de *Lb. casei* I90 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 180 días de maduración

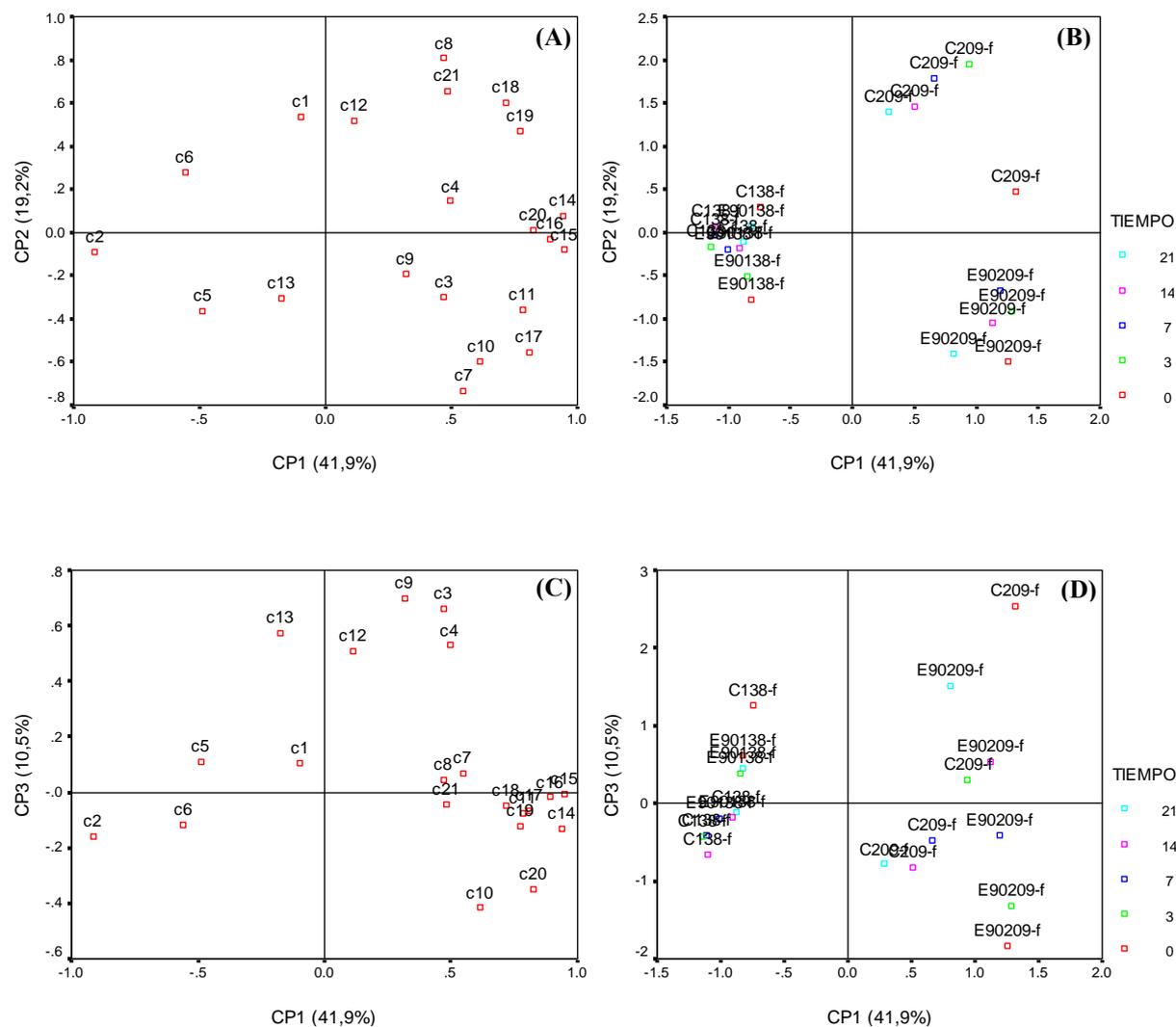


Figura I.7. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. casei* I90 (E90), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración (f). **A y C:** Gráficos de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente. **B y D:** Gráficos de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2 y CP1 vs. CP3, respectivamente.

2.4. Efecto de la actividad de *Lb. plantarum* I91 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 180 días de maduración

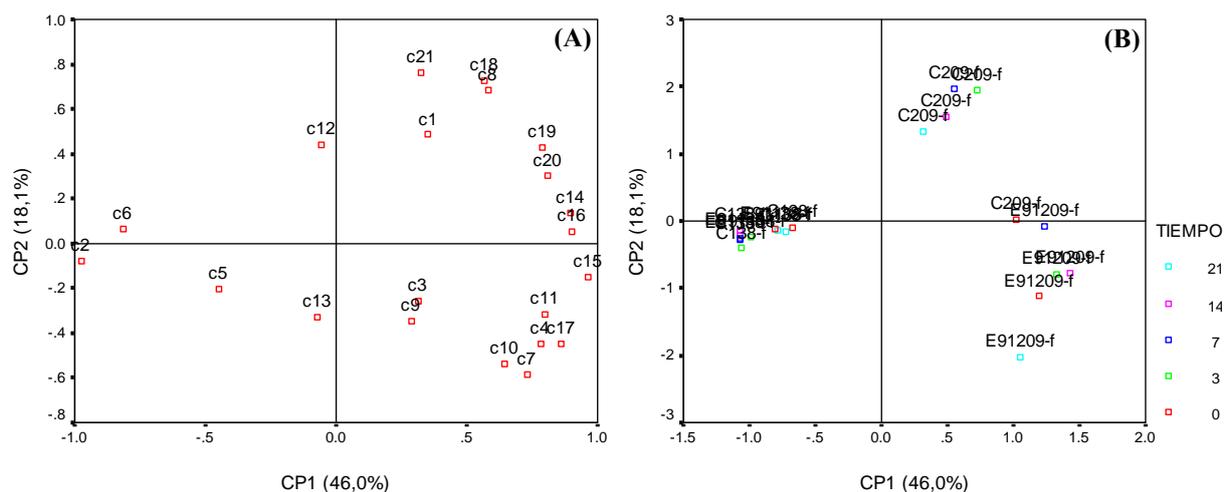


Figura I.8. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 (E91), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración (f). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

3. Impacto de las cepas de *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 en la formación de aminoácidos

3.1. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh209 del inicio de la maduración

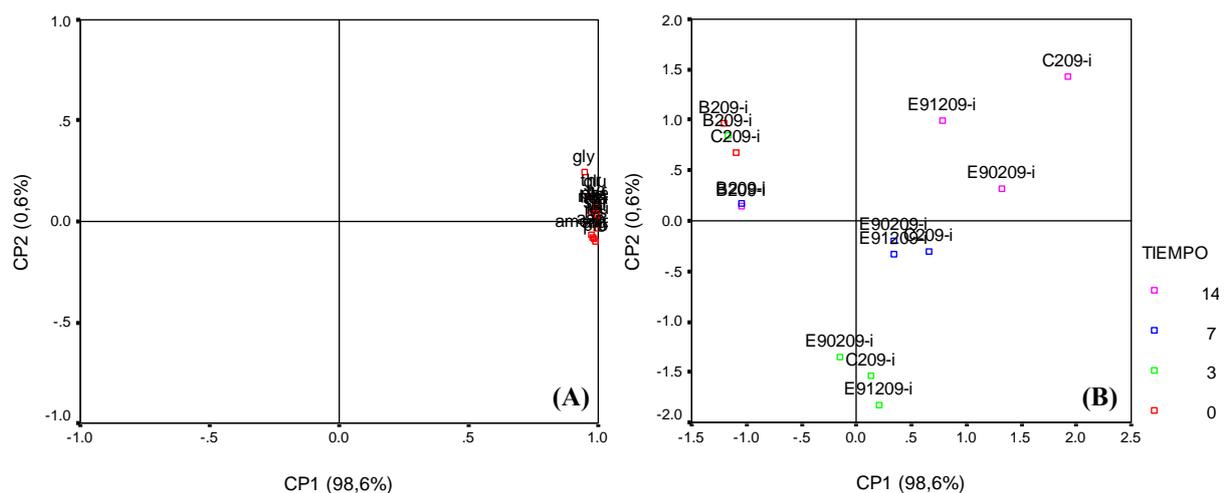


Figura I.9. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh209 del inicio de la maduración (i). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

3.2. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh209 de 90 días de maduración

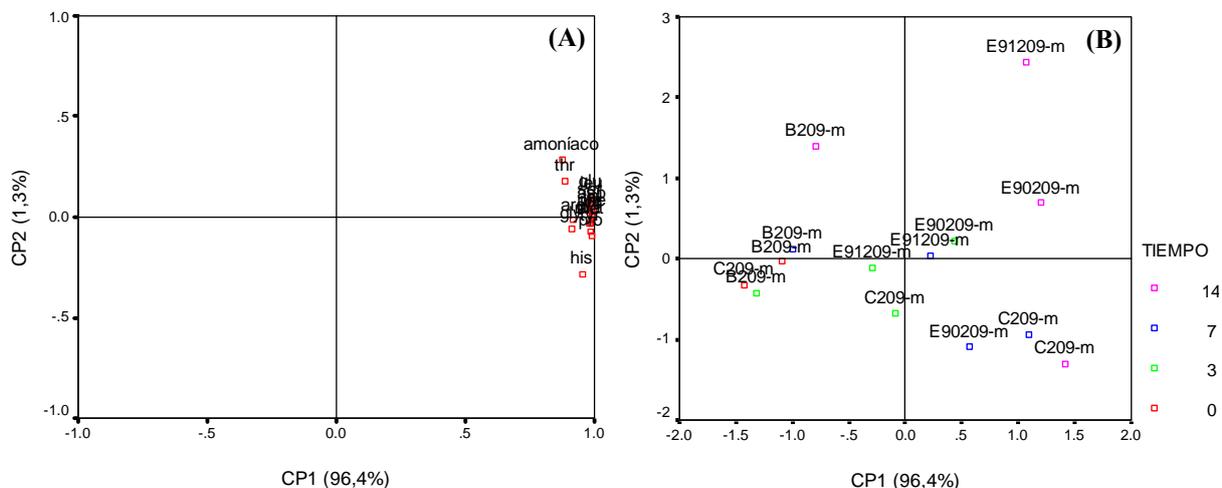


Figura I.10. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh209 de 90 días de maduración (i). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

3.3. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh138 del inicio de la maduración

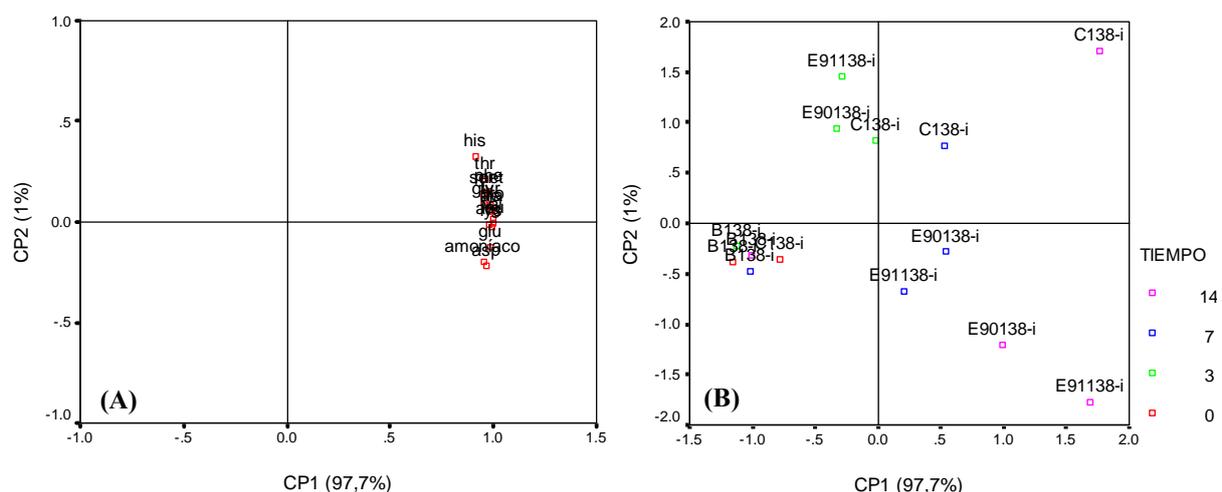


Figura I.11. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh138 del inicio de maduración (i). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

3.4. Extractos controles, blancos y experimentales (*Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91) preparados con quesos Lh138 de 90 días de maduración

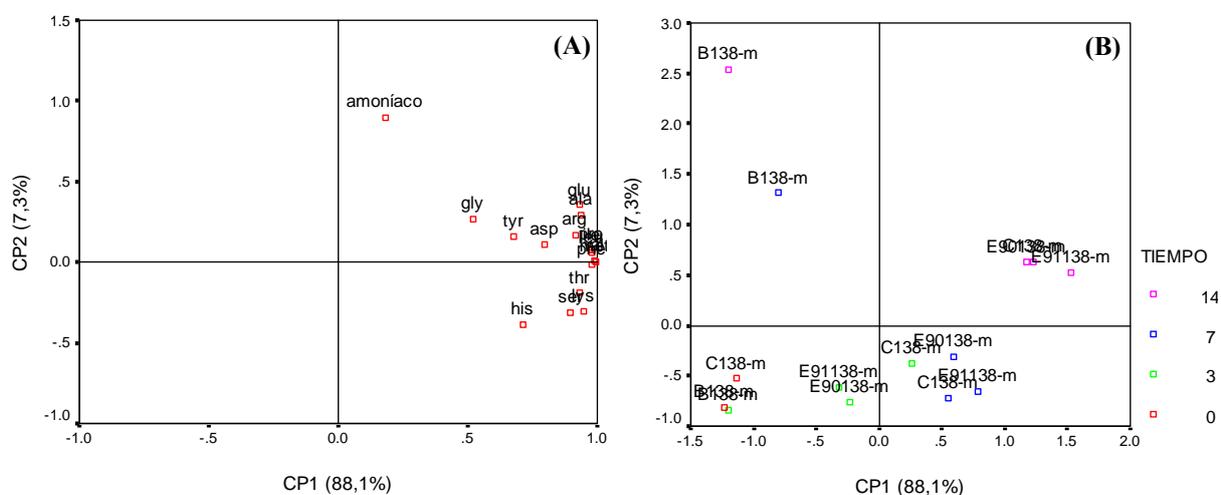


Figura I.12. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C), blancos (B) y experimentales (E91 y E90) preparados con los quesos Lh138 de 90 días de maduración (m). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

4. Influencia de la peptidólisis causada por el fermento primario en la producción de aminoácidos libres por los lactobacilos mesófilos en estudio

4.1. Efecto de la actividad de *Lb. casei* I90 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 del inicio de la maduración

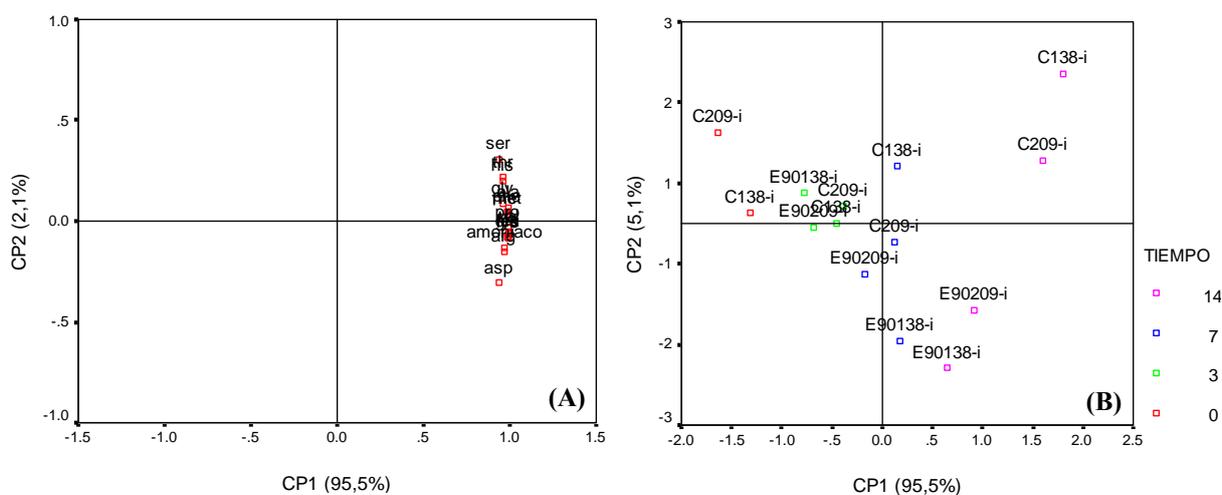


Figura I.13. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. casei* I90 (E90), preparados con

los quesos Lh138 y Lh209 del inicio de la maduración (i). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

4.2. Efecto de la actividad de *Lb. plantarum* I91 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 del inicio de la maduración

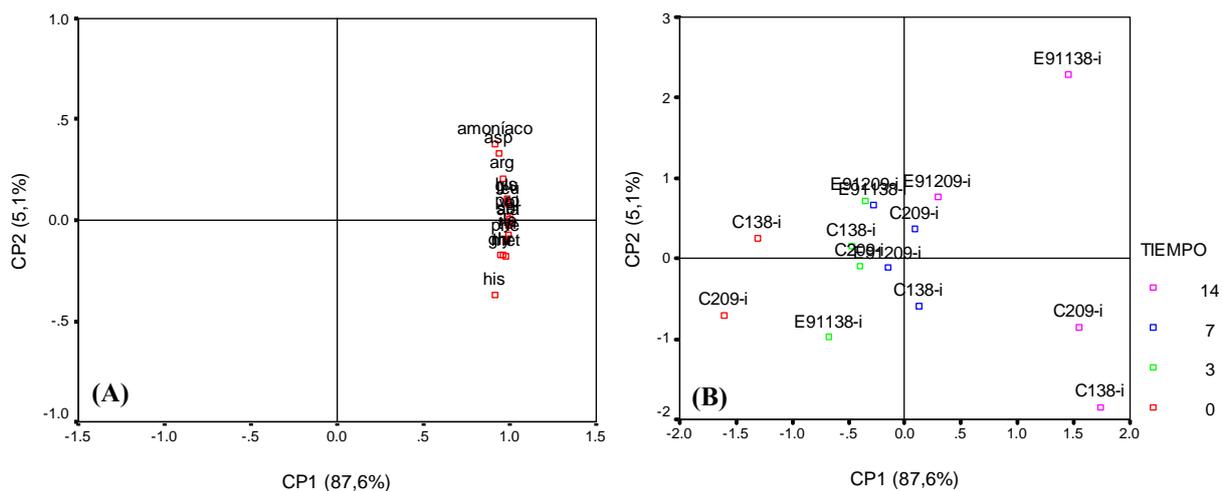


Figura I.14. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 (E91), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 del inicio de la maduración (i). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

4.3. Efecto de la actividad de *Lb. casei* I90 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 180 días de maduración

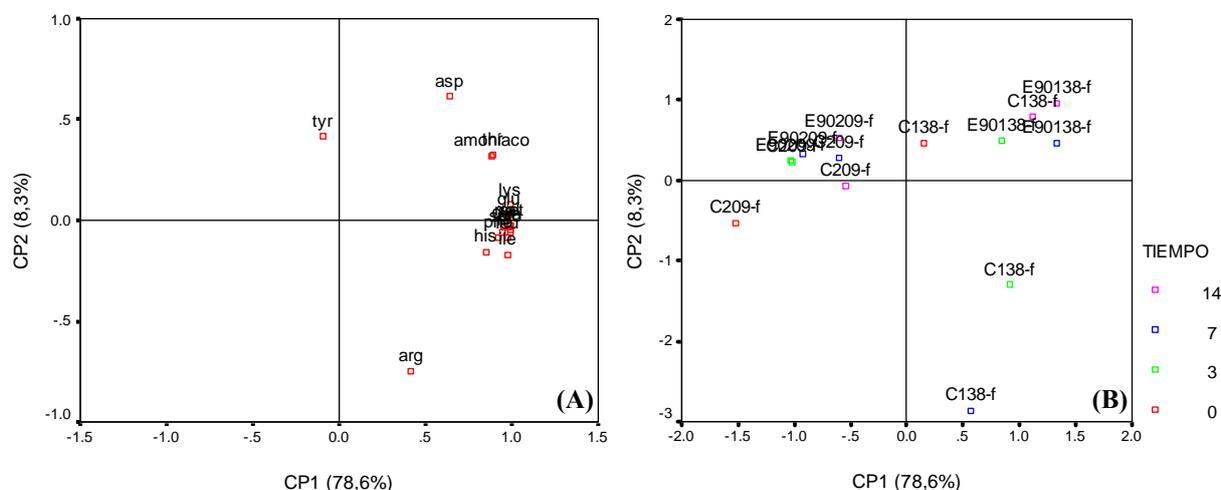


Figura I.15. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. casei* I90 (E90), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración (f). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

4.4. Efecto de la actividad de *Lb. plantarum* I91 en modelos preparados con quesos Lh209 y Lh138 de 180 días de maduración

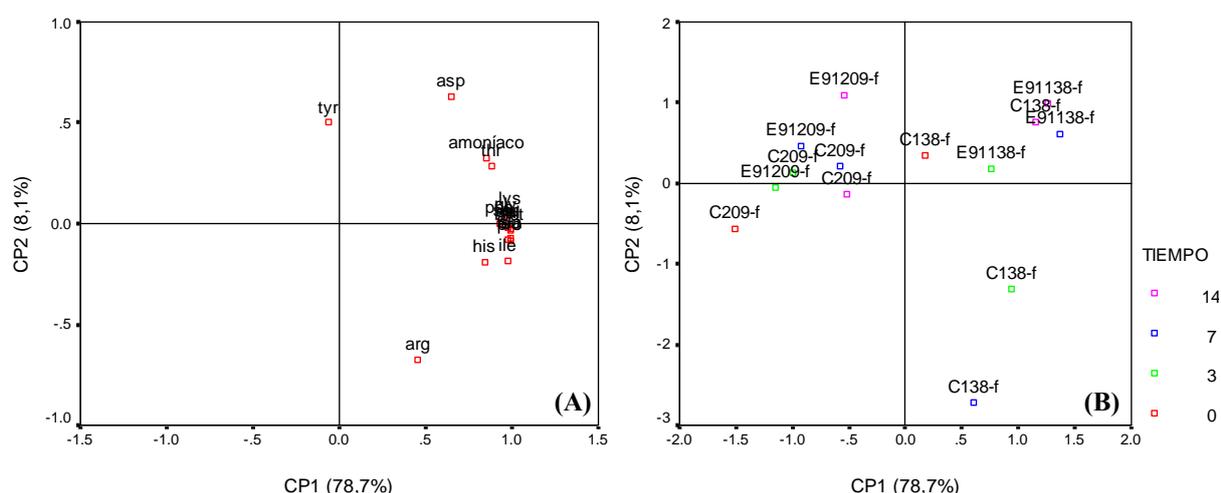


Figura I.16. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL individuales de los extractos solubles controles (C) y experimentales inoculados con *Lb. plantarum* I91 (E91), preparados con los quesos Lh138 y Lh209 de 180 días de maduración (f). **A:** Gráfico de los *loadings* de las variables independientes sobre CP1 vs. CP2. **B:** Gráfico de los *scores* de las muestras sobre CP1 vs. CP2.

Bibliografía

1. Abo-Elnaga, I. G. y Plapp, R. (1987). Peptidases of *Lactobacillus casei* and *L. plantarum*. J. Basic. Microbiol. 27:123-130.
2. Adamberg, K.; Antonsson, M.; Vogensen, F. K.; Nielsen, E. W.; Kask, S.; Møller, P. L. y Ardö, Y. (2005). Fermentation of carbohydrates from cheese sources by non-starter lactic acid bacteria isolated from semi-hard Danish cheese. Int. Dairy J. 15:873–882.
3. AFNOR, NFV 09-013. (1995). Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Analyse sensorielle; Méthodologie: Essai triangulaire. AFNOR, Paris, Francia, pág. 201-208.
4. Agarwal, S.; Powers, J. R.; Swanson, B. G.; Chen, S.; y Clark, S. (2006b). Cheese pH, protein concentration, and formation of calcium lactate crystals. J. Dairy Sci. 89:4144-4155.
5. Agarwal, S.; Sharma, K.; Swanson, B. G.; Yüksel, G. Ü. y Clark, S. (2006a). Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. J. Dairy Sci. 89:1452–1466.
6. Amarita, F.; Requena, T.; Taborda, G.; Amigo, L. y Pelaez, C. (2001). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. J. Appl. Microbiol. 90:971-978.
7. Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. J. Dairy Res. 50:45-55.
8. ANMAT (2008). Código Alimentario Argentino. Cap. VIII: Alimentos lácteos. En vigencia. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>.
9. Antonsson, M.; Molin, G. y Ardö, Y. (2003). *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. Int. J. Food Microbiol. 85:159-169.
10. AOAC (1990). Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, Vol. II; Official method 985.35 - Minerals in ready-to-feed milk-based infant formula - Atomic absorption spectrophotometric method (Ed.: Heilrich, K.). AOAC, Arlington, Virginia, Estados Unidos, pág. 1110.
11. Aparo, L.; Candiotti, M. C.; Ceresoli, A. y Hynes, E. (2004). Determinación de la actividad de la enzima coagulante residual en quesos. Rev. Argent. Lactol. 23:87–98.
12. Ardö, Y. (1999). Bulletin IDF 337: Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation (Part 2); Cap. 2: Evaluating proteolysis by analyzing the N content of cheese fraction (Ed.: Ardö, Y.). International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, pág. 4–9.
13. Ardö, Y.; Thage, B. V. y Madsen, J. S. (2002). Dynamics of free amino acid composition in cheese ripening. Austr. J. Dairy Technol. 57:109-115.
14. Arizcum, C.; Barcina, Y. y Torr, P. (1997). Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazábal cheeses. Lait. 77:729-736.
15. Awad, S. (2006). Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. Food Chem. 97:394–400.
16. Banks, J. M. (2003). Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1; Cheddar-Type Cheeses (Eds.: Rogisniski, H.; Fuquay, J. W. y Fox, P. F.). Academic Press, Reino Unido, pág. 356-363.
17. Banks, J. M. y Williams, A. G. (2004). The role of nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. Int. J. Dairy Technol. 57:145-152.

18. Banks, J. M.; Yvon, M.; Gripon, J. C.; de la Fuente, M. A.; Brechany, E. Y.; Williams, A. G. y Muir, D. D. (2001). Enhancement of amino acid catabolism in Cheddar cheese using α -ketoglutarate: amino acid degradation in relation to volatile compounds and aroma character. *Int. Dairy J.* 11:235–243.
19. Barrett, F. M.; Kelly, A. L.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1999). Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 9:421-427.
20. Bastian, E. D. y Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *Int. Dairy J.* 6:435-457.
21. Benech, R. -O.; Kheadr, E. E.; Lacroix, C. y Fliss, I. (2003). Impact of nisin producing culture and liposome-encapsulated nisin on ripening of *Lactobacillus* added-Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 86:1895-1909.
22. Beresford, T. P. (2003). Dairy processing. Improving quality; Cap. 20: Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality (Ed.: Smit, G.). CRC Press, Cambridge, Inglaterra, pág. 448-469.
23. Beresford, T. P.; Fitzsimons, N. A.; Brennan, N. L. y Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11:259-274.
24. 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.
25. Bergamini, C. V.; Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2006b). Herramientas quimimétricas para la valoración de un fermento adjunto para quesería. XXVI Congreso Argentino de Química. San Luis, Argentina, 13 al 15 de Setiembre. Contenido de la conferencia editado en CD.
26. Bergamini, C. V.; Hynes, E. y Zalazar, C. A. (2006a). Influence of probiotic bacteria in the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *Int. Dairy J.* 16:856-866.
27. 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. *Int. Dairy J.* 14:723–736.
28. Berthier, F.; Beuvier, E.; Dasen, A. y Grappin, R. (2001). Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *Int. Dairy J.* 11:293–305.
29. Blakesley, R. W. y Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82:580-581.
30. Borgognone, M. G.; Bussi, J. y Hough, G. (2001). Principal component analysis in sensory analysis: covariance or correlation matrix? *Food Qual. Pref.* 12:323-326.
31. 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. *Int. Dairy. J.* 14:791-800.
32. Bover-Cid, S.; Miguélez-Arrizado, M. J.; Becker, B.; Holzapfel, W. H. y Vidal-Carou, M. C. (2008). Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiol.* 25:269–277.

33. Bradley, R. L.; Arnold, E.; Barbano, D. M.; Semerad, R. G.; Smith, D. E. y Vines, B. K. (1993). Standard methods for the examination of dairy product; Cap. 15: Chemical and physical methods (Ed.: Marshall, R.). American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, pág. 433-531.
34. 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. *J. Dairy Sci.* 90:4532-4542.
35. Broadbent, J. R.; Houck, K.; Johnson, M. E. y Oberg, C. J. (2003). Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. *J. Dairy Sci.* 86:2773–2782.
36. Broome, M. C.; Krause, D. A. y Hickey, M. W. (1990). The use of non-starter lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. *Aust. J. Dairy Technol.* 45:67-73.
37. Broome, M. C.; Powell, I. B. y Limsowtin, G. K. Y. (2003). Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1; Starter cultures: Specific properties. (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. W. y Fox, P. F.). Academic Press, Reino Unido, pág. 269-275.
38. Bude-Ugarte, M.; Guglielmotti, D.; Giraffa, G.; Reinheimer, J. A. y Hynes, E. (2006). Non-starter lactobacilli from Argentinean cheeses. *J. Food Prot.* 69:2983-2991.
39. Bullock, D. H. y Irvine, O. R. (1956). A chromatographic study of Cheddar cheese ripening. *J. Dairy. Sci.* 39:1229-1235.
40. Candioti, M. C.; Hynes, E. R.; Quiberoni, A.; Palma, S. B.; Sabbag, N. y Zalazar, C. A. (2002). Reggiano Argentino cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *Int. Dairy J.* 12:923–931.
41. Cantoni, C. y Molna, M. R. (1967). Investigations on the glycerol metabolism of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 30:197-205.
42. Casadei, M. A.; Ingram, R.; Hitchings, E.; Archer, J. y Gaze, J. E. (2001). Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* to pH and ethanol. *Int. J. Food Microbiol.* 63:125–134.
43. Casey, M. G.; Häni, J. P.; Gruskovnjak, J.; Schaeren, W. y Wechsler, D. (2006). Characterization of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. *Lait.* 86:407–414.
44. 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. *J. Appl. Microbiol.* 86:653–659.
45. Chapman, H. R. y Sharpe, M. E. (1981). Dairy Microbiology; Microbiology of cheese. (Ed.: Robinson, R. K.). Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido, pág. 157–243.
46. 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. *Int. Dairy J.* 4:251-269.
47. Choi, Y. J.; Miguez, C. B. y Lee, B. H. (2004). Characterization and heterologous gene expresión of a novel estearase from *Lactobacillus casei* CL96. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3213-3221.

48. Choisy, M.; Desmazeaud, M.; Gueguen, M.; Lenoir, L.; Schmidt, J. L. y Tourneur, C. (1997). *Le Fromage*, 3^{er} edición; *L’Affinage du fromage, les phénomènes microbiens*. (Eds.: Eck, A. S. y Gillis, J. C.). Tec & Doc Lavoisier, Paris, Francia, pág. 377-440.
49. Chou, Y. -E.; Edwards, C. G.; Luedecke, L. O.; Bates, M. P. y Clark, S. (2003). Nonstarter lactic acid bacteria and aging temperature affect calcium lactate crystallization in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 86:2516–2524.
50. Christen, G. L.; Davidson, P. M.; McAllister, J. S. y Roth, L. A. (1993). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products; Coliform and other indicator bacteria*. (Ed.: Marshall, R. T.). American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, pág. 247-269.
51. Christensen, J. E.; Johnson, M. E. y Steele, J. L. (1995). Production of Cheddar cheese using *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *Int. Dairy J.* 5:367–379.
52. Christiansen, P.; Waagner Nielsen, E.; Vogensen, F. K.; Brogren, C. -H. y Ardö, Y. (2006). Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *Int. Dairy J.* 16:1196–1204.
53. Cogan, T. M.; Beredsford, T. P.; Steele, J.; Broadbent, J.; Shah, N. P. y Ustunol, Z. (2007) Advanced in starter cultures and cultured foods. *J. Dairy Sci.* 90:4005-4021.
54. Coker, C. J.; Crawford, R. A.; Johnston, K. A.; Singh, H. y Creamer, L. K. (2005). Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data – a review. *Int. Dairy J.* 15:631-643.
55. Collins, Y. F.; McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13:841–866.
56. Coolbear, T.; Crow, V.; Harnett, J.; Harvey, S.; Holland, R. y Martley, F. (2008). Developments in cheese microbiology in New Zealand-Use of starter and non-starter lactic acid bacteria and their enzymes in determining flavour. *Int. Dairy J.* 18:705-713.
57. Coppola, R.; Nann, M.; Iorizzo, M.; Sorrentino, A.; Sorrentino, E.; Chiavari, C. y Grazia, L. (2000). Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Lait.* 80:479-490.
58. Cromie, S. J.; Giles, J. E. y Dulley, J. R. (1987). Effect of elevated ripening temperature on the microflora of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 54:69-76.
59. Crow, V. L.; Coolbear, T.; Goparl, 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. *Int. Dairy J.* 5:855–875.
60. 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.
61. Crow, V.; Curry, B.; Christison, M.; Hellier, K.; Holland, R. y Liu, S. -Q. (2002). Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Aust. J. Dairy Technol.* 57:99–105.
62. Cuesta, P.; Fernández-García, E.; González de Llano, D.; Montilla, A. y Rodríguez, A. (1996). Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega'l Pitu cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 79:1693-1698.
63. Curtin, A. C. y McSweeney, P. L. H. (2003). Catabolism of aromatic amino acids in cheese-related bacteria: aminotransferase and decarboxylase activities. *J. Dairy Res.* 70:249–252.

64. Darukaradhya, J.; Phillips, M. y Kailasapathy, K. (2006). Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 16:439-445.
65. De Angelis, M.; Corsetti, A.; Tosti, N.; Rossi, J.; Corbo, M. R. y Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2011-2020.
66. De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Huet, C.; Crecchio, C.; Fox, P. F. y Gobbetti, M. (2004). Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1336-1346.
67. De Figueroa, R. M.; Alvarez, F.; De Ruiz Holgado, A. P.; Oliver, G. y Sesma, F. (2000). Citrate utilisation by homo- and heterofermentative lactobacilli. *Microbiol. Res.* 154:313-320.
68. De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.* 38:105-112.
69. Demarigny, Y.; Beuvier, E.; Dasen, A. y Duboz, G. (1996). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait.* 76:371-387.
70. Depouilly, A.; Dufrene, F.; Beuvier, E. y Berthier, F. (2004). Genotypic characterisation of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Lait.* 84:155-167.
71. Desai, R.; Shah, N. P. y Powell, I. B. (2006). Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. *J. Dairy Sci.* 89:3345-3351.
72. Di Cagno, R.; Banks, J.; Sheehan, L.; Fox, P. F.; Brechany, E. Y.; Corsetti, A. y Gobbetti, M. (2003b). Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *Int. Dairy J.* 13:961-972.
73. Di Cagno, R.; De Angelis, M.; Upadhyay, V. K.; McSweeney, P. L. H.; Minervini, F.; Gallo, G. y Gobbetti, M. (2003a). Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *Int. Dairy J.* 13:145-157.
74. Di Cagno, R.; Quinto, M.; Corsetti, A.; Minervini, F. y Gobbetti, M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *Int. Dairy J.* 16:119-130.
75. Dias, B. y Weimer, B. (1998). Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli and brevibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3320-3326.
76. Dias, B. y Weimer, B. (1999). Production of volatile sulfur compounds in Cheddar cheese slurries. *Int. Dairy J.* 9:605-611.
77. Díaz-Muñiz, I. y Steele, J. L. (2006). Conditions required for citrate utilization during growth of *Lactobacillus casei* ATCC334 in chemically defined medium and Cheddar Cheese extract. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 90:233-243.
78. Díaz-Muñiz, I.; Banavara, D. S.; Budinich, M. F.; Rankin, S. A.; Dudley, E. G. y Steele, J. L. (2006). *Lactobacillus casei* metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: a bioinformatics approach. *J. Appl. Microbiol.* 101:872-882.

79. Dolci, P.; Alessandria, V.; Rantsiou, K.; Rolle, L.; Zeppa, G. y Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *Int. J. Food Microbiol.* 122:302–311.
80. Drake, M. A.; Karagül-Yüceer, Y.; Chen, X. Q. y Cadwallader, K. R. (1999). Characterization of desirable and undesirable lactobacilli from cheese in fermented milk. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 32:433-439.
81. Dudley, E. y Steele, J. L. (2005). Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 98:14–23.
82. El Abboudi, M.; El Soda, M.; Pandian, S.; Simard, R. E. y Olson, N. (1992). Purification of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus casei* subspecies. *Int. J. Food Microbiol.* 15:87-98.
83. El Soda, M. (1993). Accelerated maturation of cheese. *Int. Dairy J.* 3:531-544.
84. El Soda, M.; Bergere, J. -L. y Desmazeaud, M. J. (1978). Detection and localization of peptide hydrolases in *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Res.* 45:519-524.
85. El Soda, M.; Desmazeaud, M. J.; Le Bars, D. y Zevaco, C. (1986b). Cell-wall-associated proteinases in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Protect.* 49:361-365.
86. El Soda, M.; Korayem, M. y Ezzat, N. (1986a). The esterolytic and lipolytic activities of lactobacilli. III. Detection and characterization of the lipase system. *Milchwissenschaft.* 41:353-355.
87. El Soda, M.; Madkor, S. A. y Tong, P. S. (2000). Adjuncts cultures: recent developments and potential significance to cheese industry. A review. *J. Dairy Sci.* 83:609–619.
88. Farkye, N. y Fox, P. F. (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *J. Dairy Res.* 59:209-216.
89. Farkye, N. Y. (2000). *Encyclopedia of Food Microbiology; Microbiology of cheese-making and maturation.* (Eds.: Robinson, R. K.; Batt, C. A. y Patel, P. D.). Academic Press, Londres, Reino Unido, pág. 381–387.
90. Farkye, N. Y. y Fox, P. F. (1991). Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in Cheddar cheese: Cheese containing plasmin inhibitor, 6-aminohexanoic acid. *J. Agric. Food Sci.* 39:786–788.
91. Farkye, N. Y. y Landkammer, C. F. (1992). Milk plasmin activity influence on Cheddar cheese quality during ripening. *J. Food Sci.* 57:622-624.
92. Farkye, N. Y.; Madkor, S. A. y Atkins, H. G. (1995). Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *Int. Dairy J.* 5:715-725.
93. Fenelon, M. A.; Ryan, M. P.; Rea, M. C.; Guinee, T. P.; Ross, R. P.; Hill, C. y Harrington, D. (1999). Elevated temperature ripening of reduced fat Cheddar cheese made with or without lactacin 3147-producing starter culture. *J. Dairy. Sci.* 82:10-22.
94. Fernández de Palencia, P.; Peláez, C. y Martín-Hernández, M. C. (1997). Characterization of the aminopeptidase system from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731. *J. Agric. Food Chem.* 45:3778-3781.
95. FIL-IDF (1982). Formaggio e formaggio fuso. Determinazione della materia seca. Metodo di riferimento. N° 4:A. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, pág. 184-188.

96. FIL-IDF (1993). Latte. Determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento. N° 20:B. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, pág. 74-107.
97. FIL-IDF (1997). Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en matière grasse. Guide de directives generales aplicadas aux methodes butyrometriques. Norme FIL Internationale 152:A 1997, Bruselas, Bélgica.
98. Fitzsimons, N. A.; Cogan, T. M.; Condon, S. y Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterisation of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3418–3426.
99. Fitzsimons, N. A.; Cogan, T. M.; Condon, S. y Beresford, T. (2001). Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.* 90:600–608.
100. Folkertsma, B.; Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *Int. Dairy J.* 6:1117–1134.
101. Foucaud-Scheunemann, C. y Poquet, I. (2003). HtrA is a key factor in the response to specific stress conditions in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 224:53-59.
102. Fox, P. F. (1963). Potentiometric determination of salt in cheese. *J. Dairy Sci.* 46:744-745.
103. Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*; Cap. 10: Chemistry and biochemistry of cheese and fermented milks. Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido, pág. 379-436.
104. Fox, P. F. y Stepaniak, L. (1993). Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.* 3:509-530.
105. 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, pág. 236–281.
106. Fox, P. F.; Law, J.; McSweeney, P. L. H. y Wallace, J. (1993). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General Aspects; Cap. 10: Biochemistry of Cheese Ripening. (Ed.: Fox, P. F.). Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, pág. 389–438.
107. Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. y Lynch, C. M. (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 53:83-89.
108. Fox, P. F.; Wallace, J. M.; Morgan, S.; Lynch, C. M.; Niland, E. J. y Tobin, J. (1996). Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70:271-297.
109. Frank, J. F.; Christen, G. L. y Bullerman, L. B. (1993). Standard methods for the examination of dairy products; Cap. 8: Tests for groups of microorganisms. (Ed.: Marshall, R. T.). American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, pág. 271-286.
110. Fröhlich-Wyder, M. T. y Bachmann, H. P. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2: Major Cheese Groups; Cheeses with propionic acid fermentation. (Eds.: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M. y Guinee, T. P.). Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, pág. 141–156.
111. Fryer, T. F. (1970). Utilization of citrate by lactobacilli isolated from dairy products. *J. Dairy Res.* 37:9-15.

112. Gala, E.; Landi, S.; Solieri, L.; Nocetti, M.; Pulvirenti, A. y Giudici, P. (2008). Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 125:347–351.
113. Galgano, F.; Suzzi, G.; Favati, F.; Caruso, M.; Martuscelli, M.; Gardini, F. y Salzano, G. (2001). Biogenic amines during ripening in 'Semicotto Caprino' cheese: role of enterococci. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36:153-160.
114. Gao, S. y Steele, J. L. (1998). Purification and characterisation of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. *J. Food Biochem.* 22:197–211.
115. Gardiner, G.; Ross, R. P.; Collins, J. K.; Fitzgerald, G. y Stanton, C. (1998). Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2192-2199.
116. Gobbetti, M.; Fox, P. F. y Stepaniak, L. (1997a). Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *J. Dairy Sci.* 80:3099-3106.
117. Gobbetti, M.; Fox, P. F.; Smacchi, E.; Stepaniak, L. y Damiani, P. (1996). Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *J. Food Biochem.* 20:227–246.
118. Gobbetti, M.; Lanciotti, R.; De Angelis, M.; Corbo, M. R.; Massini, R. y Fox, P. F. (1999b). Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *Int. Dairy J.* 9:865-875.
119. Gobbetti, M.; Lanciotti, R.; De Angelis, M.; Corbo, M. R.; Massini, R. y Fox, P. F. (1999a). Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and *a_w* on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzym. Microb. Technol.* 25:795-809.
120. Gobbetti, M.; Morea, M.; Baruzzi, F.; Corbo, M. R.; Matarante, A.; Considine, T.; Di Cagno, R.; Guinee, T. y Fox, P. F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 12:511–523.
121. Gobbetti, M.; Smacchi, E. y Corsetti, A. (1997b). Purification and characterization of a cell surface-associated esterase from *Lactobacillus fermentum* DT41. *Int. Dairy J.* 7:13–21.
122. Gomez, M. J.; Gaya, P.; Nuñez, M. y Medina, M. (1996). Effect of *Lactobacillus plantarum* as adjunct starter on the flavour and texture of a semi-hard cheese made from pasteurised cows' milk. *Lait.* 76:461-472.
123. Grappin, R. y Beuvier E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int. Dairy J.* 7:751-761.
124. Gripon, J. C. (1993). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2: Major Cheese Groups; Cap. 4: Mould Ripened Cheeses. (Ed.: Fox, P. F.). Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, pág. 111-136.
125. 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. *Lait.* 55:502-516.

126. Guédon, E.; Martin, C.; Gobert, F.- X.; Ehrlich, S. D.; Renault, P. y Delorme, C. (2001). Réseau de régulation de la transcription des gènes du système protéolytique de *Lactococcus lactis*. Lait. 81:65-74.
127. Gueimonde, M.; Delgado, S.; Mayo, B.; Rusa Madiedo, P.; Margolles, A. y de los Reyes Gavilán, C. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* included in comercial fermented milks. Food Res. Int. 37:839-850.
128. Gummalla, S. y Broadbent, J. (2001). Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. J. Dairy Sci. 84:1011-1019.
129. Gummalla, S. y Broadbent, J. R. (1999). Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavour adjuncts. J. Dairy Sci. 82:2070–2077.
130. Hair, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L. y Black, W. C. (1999a). Análisis Multivariante; Cap. 3: Análisis factorial. Prentice Hall Iberia., Madrid, España, pág. 79-123.
131. Hair, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L. y Black, W. C. (1999b). Análisis Multivariante; Cap. 9: Análisis Cluster. Prentice Hall Iberia, Madrid, España, pág. 491-532.
132. 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. Int. Dairy J. 13:313-323.
133. Hansen, B. V.; Houlberg, U. y Ardö, Y. (2001). Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. Int. Dairy J. 11:225–233.
134. Hegazi, F. Z. y Abo-Elnaga, I. G. (1987). Proteolytic activity of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. Nahrung. 31:225-232.
135. Henri-Dubernet, S.; Desmasures, N. y Guéguen, M. (2004). Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in “Camembert de Normandie” cheese. Lait. 84:179–189.
136. Herreros, M. A.; Arenas, R.; Sandoval, M. H.; Castro, J. M.; Fresno, J. M. y Tornadijo, M. E. (2007). Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. Int. Dairy J. 17:328-335.
137. Hesari, J.; Ehsani, M. R.; Khosroshahi, A. y McSweeney, P. L. H. (2006). Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese. Lait. 86:291–302.
138. Hunter, E. A.; McNulty, D. A. y Banks, J. M. (1997). Statistical design and analysis of experiments in cheese technology. Lebensm. Wiss. U. Technol. 30:121-128.
139. Hurley, M. J.; O'Driscoll, B. M.; Kelly, A. L. y McSweeney, P. L. H. (1999). Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese. Int. Dairy J. 9:553-558.
140. Hynes, E. R.; Aparo, L. y Candiotti, M. C. (2004). Influence of residual milk-clotting enzyme on α_{s1} casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese. J. Dairy Sci. 87:565–573.
141. Hynes, E. R.; Bergamini, C. V.; Suárez, V. B. y Zalazar, C. A. (2003c). Proteolysis on Reggianito Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. J. Dairy Sci. 86:3831–3840.

142. Hynes, E. y Bergamini, C. V. (2006). Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de Quesos. Sección V; Cap. 2: Rol de las NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) en la maduración de quesos. (Eds.: Reinheimer, J. A. y Zalazar, C. A.). Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina, pág. 245-265.
143. Hynes, E.; Bach, C.; Lamberet, G.; Ogier, J. C.; Son, O. y Delacroix-Buchet, A. (2003a). Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese. *Lait*. 83:31-43.
144. Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (1999a). Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 54:24-27.
145. Hynes, E.; Meinardi, C.; Sabbag, N.; Cattaneo, T.; Candiotti, M. C. y Zalazar, C. A. (2001b). Influence of milk clotting enzyme concentration on the α_{s1} -casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *J. Dairy Sci.* 84:1335-1340.
146. Hynes, E.; Ogier, J. C. y Delacroix-Buchet, A. (2000). Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* 10:733-737.
147. Hynes, E.; Ogier, J. C. y Delacroix-Buchet, A. (2001a). Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. *Int. Dairy J.* 11:587-597.
148. Hynes, E.; Ogier, J. C. y Delacroix-Buchet, A. (2003b). Influence of starter and adjunct lactobacilli culture on ripening of miniature washed-curd cheeses. *Lait*. 83:17-29.
149. Hynes, E.; Zalazar, C. A. y Delacroix-Buchet, A. (1999b). Proteolysis during ripening of soft cheese. II. Effect of milk-clotting enzyme on Cremoso Argentino cheese ripening. *Microbiol. Alim. Nutr.* 17:199-205.
150. Hynes, E.; Zalazar, C. A. y McSweeney, P. L. H. (2005). Influence of defined and natural 'wild' thermophilic cultures on proteolysis in reggianito argentino hard cooked cheese. *Austr. J. Dairy Technol.* 60:259-263.
151. 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 ewe's-milk cheese. *Food Chem.* 100:71-80.
152. Jimeno, J.; Làzaro, M. J. y Sollberger, H. (1995). Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*. 75:401-413.
153. Johnson, M. E. y Lucey, J. A. (2006). Major technological advances and trends in cheese. *J. Dairy Sci.* 89:1174-1178.
154. Johnson, M. E.; Riesterer, B. A. y Olson, N. F. (1990). Influence on nonstarter bacteria on calcium lactate crystallization on the surface of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 73:1145-1149.
155. Jordan, K. N. y Cogan, T. M. (1993). Identification and growth of nonstarter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Ir. J. Agric. Food Res.* 32:47-55.
156. Jordan, K. N. y Cogan, T. M. (1999). Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:136-140.
157. Jyoti, B. D.; Suresh, A. K. y Venkatesh, K. V. (2003). Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:509-514.

158. Katsiari, M. C.; Voutsinas, L. P. y Kondyli, E. (2002). Improvement of sensory quality of low-fat Kefalograviera-type cheese with commercial adjunct cultures. *Int. Dairy J.* 12:757–764.
159. Kelly, A. L. y McSweeney, P. L. H. (2003). Advanced dairy chemistry – 1. Proteins, Parte A; Cap. 11.3: Indigenous proteinases in milk. (Eds.: Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Estados Unidos, pág. 495–521.
160. Kelly, A. L. y O'Donnell, H. J. (1998). Composition, gel properties and microstructure of Quarg as affected by processing parameters and milk quality. *Int. Dairy J.* 8:295-301.
161. Kennes, C.; Dubourguier, H. C.; Albagnac, G. y Nyns, E. J. (1991). Citrate metabolism by *Lactobacillus plantarum* isolated from orange juice. *J. Appl. Bacteriol.* 70:380-384.
162. 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. *Int. Dairy J.* 16:797-804.
163. Khalid, N. M. y Marth, E. H. (1990a). Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 73:3068-3076.
164. Khalid, N. M. y Marth, E. H. (1990b). Lactobacilli their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *J. Dairy Sci.* 73:2669-2684.
165. Kiernan, R. C.; Beresford, T. P.; O' Cuinn, G. y Jordan, K. N. (2000). Autolysis of lactobacilli during Cheddar cheese ripening. *Irish J. Agric. Food Res.* 39:95–106.
166. Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Langsrud, T. y Yvon, M. (2003). Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:734-739.
167. Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Langsrud, T.; Le Bars, D. y Yvon, M. (2004). The nature of the aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *Int. Dairy J.* 14:227–235.
168. 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. *Int. Dairy J.* 11:217–224.
169. Kleter, G. (1977). The ripening of Gouda cheese made under strictly aseptic conditions. 2. The comparison of the activity of different starters and the influence of certain lactobacillus strains. *Neth. Milk Dairy J.* 31:177-187.
170. 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. *J. Dairy Sci.* 91:2947-2959.
171. 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, pág. 823-830.
172. Kongo, J. M.; Gomes, A. M.; Malcata, F. X. y McSweeney, P. L. H. (2009). Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chem.* 112:131–138.

173. Kongo, J. M.; Ho, A. J.; Malcata, F. X. y Wiedmann, M. (2007). Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *J. Appl. Microbiol.* 103:1838-1844.
174. Kristoffersen, T. (1956). Degradation of amino acids by *Lactobacillus casei* in relation to flavour development in Cheddar cheese. *Iowa State College J. Sci.* 30:399-400.
175. Kuchroo, C. N. y Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft.* 37:331-335.
176. Laan, H.; Tan, S. E.; Bruinenberg, P.; Limsowtin, G. y Broome, M. (1998). Aminopeptidase activities of starter and non-starter lactic acid bacteria under simulated Cheddar cheese ripening conditions. *Int. Dairy J.* 8:267-274.
177. Laht, T. -M.; Kask, S.; Elias, P.; Adamberg, K. y Paalme, T. (2002). Role of arginine in the development of secondary microflora in Swiss-type cheese. *Int. Dairy J.* 12:831-840.
178. Lane, C. N. y Fox, P. F. (1996). Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 6:715-728.
179. Lane, C. N.; Fox, P. F.; Johnston, D. E. y McSweeney, P. L. H. (1997b). Contribution of coagulant to proteolysis and textural changes in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7:453-464.
180. Lane, C. N.; Fox, P. F.; Walsh, E. M.; Folkertsma, B. y McSweeney, P. L. H. (1997a). Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Lait.* 77:561-573.
181. Lapujade, P.; Coccagn-Bousquet, M. y Loubiere, P. (1998). Glutamate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2485-2489.
182. Lau, K. Y.; Barbano, D. M. y Rasmussen, R. R. (1990). Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and Cheddar cheese yield. *J. Dairy Sci.* 73:561-570.
183. Lau, K. Y.; Barbano, D. M. y Rasmussen, R. R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 74:727-740.
184. Law, J. y Haandrikman, A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7:1-11.
185. Lee, B. H.; Laleye, L. C.; Simard, R. E.; Holley, R. A.; Emmons, D. B. y Giroux, R. N. (1990). Influence of homofermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 55:386-390.
186. Lee, S. Y. y Lee, B. H. (1990). Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG. *J. Food Sci.* 55:119-126.
187. Lei, V. y Jakobsen, M. (2004). Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *J. Appl. Microbiol.* 96:384-397.
188. Litopoulou-Tzanetaki, E. (1990) Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.* 55:111-113.
189. Liu, S. -Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83:115-131.
190. Lloyd, G. T.; Harwood, J. F. y Barlow, I. (1980). The effect of yogurt culture YB on the flavour and maturation of Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 35:137-139.

191. 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. *Lait*. 77:441-459.
192. Lynch, C. M.; McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* 6:851–867.
193. Lynch, C. M.; Muir, D. D.; Banks, J. M.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1999). Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 82:1618-1628.
194. Madkor, S. A.; Tong, P. S. y El Soda, M. (2000). Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 83:1684-1691.
195. Magboul, A. A. A.; Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1997). Purification and characterization of a proteinase from *Lactobacillus plantarum* DPC2739. *Int. Dairy J.* 7:693-700.
196. Mangia, N. P.; Murgia, M. A.; Garau, G.; Sanna, M. G. y Deiana, P. (2008). Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiol.* 25:366–377.
197. Mannu, L.; Comunian, R. y Scintu, M. F. (2000). Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 10:383-389.
198. Manolopoulou, E.; Sarantinopoulos, P.; Zoidou, E.; Aktypis, A.; Moschopoulou, E.; Kandarakis, I. G. y Anifantakis, E. M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 82:153– 161.
199. Maragkoudakis, P. A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B. y Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16:189–199.
200. Martínez-Cuesta, M. C.; Fernández de Palencia, P.; Requena T. y Peláez C. (1998). Enhancement of proteolysis by a *Lactococcus lactis* bacteriocin producer in a Cheese model system. *J. Agric. Food Chem.* 46:3863-3867.
201. Martínez-Cuesta, M. C.; Fernández de Palencia, P.; Requena, T. y Peláez, C. (2001). Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for favour development in cheese. *Int. Dairy J.* 11:577–585.
202. Martley, F. G. y Crow, V. L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3:461-483.
203. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michote, Y. y Kaufman, L. (1988a). *Chemometrics: a textbook*; Cap. 21: Principal Components and Factor Analysis. Elsevier Science Publishers B. N., Amsterdam, Holanda, pág. 339-370.
204. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michote, Y. y Kaufman, L. (1988b). *Chemometrics: a textbook*; Cap. 13: Regression Methods. Elsevier Science Publishers B. N., Amsterdam, Holanda, pág. 165-189.
205. McBride, R. y Muir, D. D. (1999). *Technology of Cheesemaking; The grading and sensory profiling of cheese.* (Ed.: Law, B. A.). Sheffield Academic Press, Sheffield, Inglaterra, pág. 281-314.

206. McSweeney, P. L. H. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects; Cap. 14.1: Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview (Ed.: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. y Guinee, T.). Academic Press, Estados Unidos, pág. 347-360.
207. 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, pág. 361-371.
208. McSweeney, P. L. H. y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Lait*. 80:293–324.
209. McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Lucey, J. A.; Jordan, K. N. y Cogan, T. M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 3:613-634.
210. McSweeney, P. L. H.; Walsh, E. M.; Fox, P. F.; Cogan, T. M.; Drinan, F. D.; Castelo-Gonzalez, M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish J. Agric. Food Res.* 33:183–192.
211. Medina, R.; Katz, M.; González, S. y Oliver, G. (2001). Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *J. Food Protect.* 64:559-563.
212. Menéndez, S.; Centeno, J. A.; Godínez, R. y Rodríguez-Otero, J. L. (2000). Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *Int. Dairy J.* 59:37–46.
213. Metwalli, A. A. M.; de Jongh, H. H. J. y van Boekel, M. A. J. S. (1998). Heat inactivation of bovine plasmin. *Int. Dairy J.* 8:47–56.
214. Michaelidou, A.; Katsiari, M. C.; Voutsinas, L. P.; Kondyli, E. y Alichanidis, E. (2003). Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. *Int. Dairy J.* 13:743-753.
215. Milesi, M. M.; Candioti, M. y Hynes, E. (2007). Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheesemaking and ripening. *LWT – Food Sci. Technol.* 40:1427-1433.
216. Milesi, M. M.; McSweeney, P. L. H. y Hynes, E. R. (2008). Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *J. Appl. Microbiol.* 105:884-892.
217. Mittelman, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.* 81:2760–2764.
218. Morea, M.; Matarante, A.; Di Cagno, R.; Baruzzi, F. y Minervini, F. (2007). Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese. *Int. Dairy J.* 17:525-534.
219. Morgan, S. M.; 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. *Int. Dairy J.* 12:985–993.
220. Morgan, S.; Ross, R. P. y Hill, C. (1997). Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *J. Dairy Sci.* 80:1–10.

221. Muehlenkamp-Ulate, M. R. y Warthesen, J. J. (1999). Evaluation of several nonstarter lactobacilli for their influence on Cheddar cheese slurry proteolysis. *J. Dairy Sci.* 82:1370-1378.
222. Naylor, J. y Sharpe, M. E. (1958a). Lactobacilli in Cheddar cheese. III. The source of lactobacilli in cheese. *J. Dairy Res.* 25:431-438.
223. Naylor, J. y Sharpe, M. E. (1958b). Lactobacilli in Cheddar cheese. II. Duplicate cheeses. *J. Dairy Res.* 25:421-430.
224. Ng-Kwai-Hang, K. F. y Kroeker, E. M. (1984). Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 67:3052-3056.
225. Noël, Y.; Ardö, Y.; Pochet, S.; Hunter, A.; Lavanchy, P.; Luginbühl, W.; Le Bars, D.; Polychroniadou, A. y Pellegrino, L. (1998). *Lait.* 78:569-588.
226. Novella-Rodríguez, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Roig-Sagués, A. X.; Trujillo-Mesa, A. J. y Vidal-Carou, M. C. (2002). Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 85:2471-2478.
227. O'Farrell, I. P.; Sheehan, J. J.; Wilkinson, M. G.; Harrington, D. y Kelly, A. L. (2002). Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese. *Lait.* 82:305-316.
228. O'Mahony, J. A.; Lucey, J. A. y McSweeney, P. L. H. (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 88:3101-3114.
229. 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. *J. Appl. Microbiol.* 95:1235-1241.
230. 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. *Int. Dairy J.* 6:1149-1165.
231. Oliszewski, R.; Medina, R. B.; Gonzalez, S. N. y Perez Chaia, A. B. (2007). Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats' milk and cheeses. *Food Chem.* 101:1446-1450.
232. Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N. P. (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* 16:446-456.
233. Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N. P. (2007). Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *Int. Dairy J.* 17:67-78.
234. Ortigosa, M.; Arizcun, C.; Irigoyen, A.; Oneca, M. y Torre, P. (2006). Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes'-milk cheese. *Food Microbiol.* 23:591-598.
235. Oumer, A.; Gaya, P.; Fernández-García, E.; Mariaca, R.; Garde, S.; Medina, M. y Nuñez, M. (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* 68:117-129.

236. Palles, T.; Beresford, T.; Condon, S. y Cogan, T. M. (1998). Citrate metabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 85:147–154.
237. Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Mathara, J. M.; Guerzoni, M. E. y Holzapfel, W. H. (2006). Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *Int. J. Food Microbiol.* 107:1-11.
238. Pearse, M. J. y Mackinlay, A. G. (1989). Biochemical aspects of syneresis: a review. *J. Dairy Sci.* 72:1401–1407.
239. Pedersen, C.; Jonsson, H.; Lindberg, J. E. y Roos, S. (2004). Microbiological characterization of wet wheat distillers' grain, with focus on isolation of lactobacilli with potential as probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1522-1527.
240. Peláez, C. y Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int. Dairy J.* 15:831-844.
241. Perotti, M. C.; Bernal, S. M.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (2005). Free fatty acids profiles of Reggiano Argentine cheese produced with different starters. *Int. Dairy J.* 15:1150-1155.
242. Peterson, S. D. y Marshall, R. T. (1990). Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: A Review. *J. Dairy Sci.* 73:1395-1410.
243. Peterson, S. D.; Marshall, R. T. y Heymann, H. (1990). Peptidase profiling of lactobacilli associated with Cheddar cheese and its application to identification and selection of strains for cheese ripening studies. *J. Dairy Sci.* 73:1454-1464.
244. Picon, A.; Gaya, P. y Nuñez, M. (2007). Lowering hydrophobic peptides and increasing free amino acids in cheese made with a *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein. *Int. Dairy J.* 17:218-225.
245. Pintado, A. I. E.; Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Pintado, M. M. E.; Gomes, A. M. P. y Malcata, F. X. (2008). Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *Int. Dairy J.* 18:631-640.
246. Piraino, P.; Parente, E. y McSweeney, P. L. H. (2004). Processing of chromatographic data for chemometric análisis of peptide profiles from cheese extracts: a novel approach. *J. Agric. Food Chem.* 52:6904-6911.
247. Piraino, P.; Zotta, T.; Ricciardi, A. y Parente, E. (2005). Discrimination of commercial Caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis. *Int. Dairy J.* 15:1138–1149.
248. Polychroniadou, A. (1988). A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. *J. Dairy Res.* 55:585–596.
249. Poquet, I.; Saint, V.; Sez nec, E.; Simoes, N.; Bolotin, A. y Gruss, A. (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol. Microbiol.* 35:1042-1051.
250. Poveda, J. M.; Cabezas, L. y McSweeney, P. L. H. (2004a). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chem.* 84:213–218.
251. Poveda, J. M.; García, A.; Martín-Alvarez, P. J. y Cabezas, L. (2004b). Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. *Food Chem.* 84:29-33.

252. Poveda, J. M.; Sousa, M. J.; Cabezas, L. y McSweeney, P. L. H. (2003). Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *Int. Dairy J.* 13:169-178.
253. Poznanski, E.; Cavazza, A.; Cappa, F. y Coconcelli, P. S. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol.* 92:141-151.
254. Pripp, A. H.; Shakeel-Ur Rehman; McSweeney, P. L. H.; Sørhaug, T. y Fox, P. F. (2000a). Comparative study by multivariate statistical analysis of proteolysis in a sodium caseinate solution under cheese-like conditions caused by strains of *Lactococcus*. *Int. Dairy J.* 10:25-31.
255. Pripp, A. H.; Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1999). Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single-strain starters on proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses. *Int. Dairy J.* 9:473-479.
256. Pripp, A. H.; Skeie, S.; Isaksson, T.; Borge, G. I. y Sørhaug, T. (2006). Multivariate modeling of relationships between proteolysis and sensory quality of Präst cheese. *Int. Dairy J.* 16:225-235.
257. Pripp, A. H.; Stepaniak, L. y Sørhaug, T. (2000b). Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 10:249-253.
258. Pritchard, G. G. y Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:179-206.
259. Puchades, R.; Lemieux, L. y Simard, R. E. (1989). Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *J. Food Sci.* 54:885-888.
260. 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. *Rev. Argent. Lactol.* 15:13-34.
261. Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. y Reinheimer, J. (2005) Nuevas y clásicas bacterias causantes de defectos gasógenos en quesos blandos. *Rev. Argent. Lactol.* 23:19-32.
262. Quiberoni, A.; Reinheimer, J. A. y Suárez, V. B. (1998). Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage-resistant mutants in hard cheese production. *Int. Dairy J.* 8:941-949.
263. Randazzo, C. L.; De Luca, S.; Todazo, A.; Restuccia, C.; Lanza, C. M.; Spagna, G. y Caggia, C. (2007). Preliminary characterization of wild lactic acid bacteria and their abilities to produce flavour compounds in ripened model cheese system. *J. Appl. Microbiol.* 103:427-435.
264. Randazzo, C. L.; Pitino, I.; De Luca, S.; Scifò, G. O. y Caggia, C. (2008). Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 122:269-278.
265. Rapposch, S.; Eliskases-Lechner, F. y Ginzinger, W. (1999). Growth of facultatively heterofermentative lactobacilli on starter cell suspensions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5597-5599.

266. Reid, G. (2005). The importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Curr. Pharm. Des.* 11:11-16.
267. 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. *Int. Dairy J.* 6:869–879.
268. Reinheimer, J.; Suárez, V.; Bailo, N. y Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinean hard cheese production. *J. Food Prot.* 54:796–799.
269. Richardson, B. C. y Pearce, K. N. (1981). The determination of plasmin in dairy products. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 16:209-220.
270. Rijnen, L.; Courtin, P.; Gripon, J. C. y Yvon, M. (2000). Expresión of a heterologous glutamate dehydrogenase gene in *Lactococcus lactis* highly improves the conversion of amino acids to aroma compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1354–1359.
271. Rijnen, L.; Yvon, M.; van Kranenburg, R.; Courtin, 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. *Int. Dairy J.* 13:805–812.
272. Roberts, M.; Wijesundera, C. M.; Bruinenberg, P. G. y Limsowtin, G. K. Y. (1995). Development of an aseptic cheese curd slurry system for cheese ripening studies. *Aust. J. Dairy Technol.* 50:66-69.
273. Ross, R. P.; Fitzgerald, G.; Collins, K. y Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures – probiotic cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 57:71-78.
274. Ryan, M. P.; Rea, M. C.; Hill, C. y Ross, R. P. (1996). An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:612-619.
275. Rynne, N. M.; Beresford, T. P.; Kelly, A. L. y Guinee, T. P. (2004). Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 14:989–1001.
276. Rynne, N. M.; Beresford, T. P.; Kelly, A. L. y Guinee, T. P. (2007). Effect of milk pasteurisation temperature on age-related changes in lactose metabolism, pH and the growth of non-starter lactic acid bacteria in half-fat Cheddar cheese. *Food Chem.* 100:375–382.
277. Sallami, L.; Kheadr, E. E.; Fliss, I. y Vuilleumard, J. C. (2004). Impact of autolytic, proteolytic, and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 87:1585-1594.
278. Sánchez, I.; Seseña, S.; Poveda, J. M.; Cabezas, L. y Palop, L. (2006). Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 107:265-273.
279. Sánchez, I.; Seseña, S.; Poveda, J. M.; Cabezas, L. y Palop, L. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 102:355– 362.
280. Savoie, S.; Champagne, C. P.; Chiasson, S. y Audet, P. (2007). Media and process parameters affecting the growth, strain ratios and specific acidifying activities of a mixed

- lactic starter containing aroma-producing and probiotic strains. *J. Appl. Microbiol.* 103:163-174.
281. Scarpellino, R. y Kosikowski, F. V. (1962). Evolution of volatile compounds in ripening raw and pasteurised milk Cheddar cheese observed by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 45:343-348.
 282. Scherze, I.; Sienkiewicz, T. y Krenkel, K. (1994). Studies on proteolytic degradation of caseins. 2. Influence of plasmin on the proteolysis in Gouda cheese. *Milchwissenschaft.* 49:564–569.
 283. Scolari, G.; Vescovo, M. y Rossi, G. (1996). Substrate models for studies on peptidolytic activity of *Lactobacillus casei*. *Int. Dairy J.* 6:921-935.
 284. Shakeel-Ur-Rehman; Banks, J. M.; Brechany, E. Y.; Muir, D. D.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2000c). Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *Int. Dairy J.* 10:55-65.
 285. Shakeel-Ur-Rehman; Banks, J. M.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2000b). Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *Int. Dairy J.* 10:45-53.
 286. Shakeel-Ur-Rehman; Feeney, E. P.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1998b). Inhibition of residual coagulant in cheese using pepstatin. *Int. Dairy J.* 8:987-992.
 287. Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2000a). Methods used to study non-starter microorganisms in cheese: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 53:113-119.
 288. Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Madkor, S. y Farkye, N. (2001). Alternatives to pilot plan experiments in cheese-ripening studies. *Int. J. Dairy Technol.* 54:121-126.
 289. Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1998a). Protocol for the manufacture of miniature cheeses. *Lait.* 78:607-620.
 290. Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1999). A study on the role of indigenous microflora of raw milk on the ripening of Cheddar cheese. *Milchwissenschaft.* 54:388-392.
 291. Shakeel-Ur-Rehman; Waldron, D. y Fox, P. F. (2004). Effect of modifying lactose concentration in cheese curd on proteolysis and in quality of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 14:591–597.
 292. Shalabi, S. I. y Fox, P. F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese, comparison of methods. *Irish J. Food Sci. Technol.* 11:135–151.
 293. Sheehan, J. J.; Fenelon, M. A.; Wilkinson, M. G. y McSweeney, P. L. H. (2007). Effect of cook temperature on starter and non-starter lactic acid bacteria viability, cheese composition and ripening indices of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *Int. Dairy J.* 17:704-716.
 294. Singh, T. K.; Gripon, J. -C. y Fox, P. F. (1999). Bulletin IDF 337: Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation (Part 2); Cap. 4: Chromatographic analysis and identification of peptides in cheese (Ed.: Ardö, Y.). International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, pág. 17-23.
 295. Siragusa, S.; De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Rizzello, C. G.; Coda, R. y Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of italian cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7283–7290.

296. Skeie, S. y Ardö, Y. (2000). Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 33:499-505.
297. 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. *Int. Dairy J.* 18:169-177.
298. 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. *Int. Dairy J.* 18:158-168.
299. Smit, G.; Braber, A.; Van Spronsen, W.; Van Den Berg, G. y Exterkate, F. A. (1995). Bioflavour 95; Ch-easy model: a cheese-based model to study cheese ripening. (Eds.: Étievant, P. y Schreier, P.). INRA, Dijon, Paris, Francia, pág. 185-190.
300. 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 Microbiol. Rev.* 29:591-610.
301. Smit, G.; Van Hylckama Vlieg, J. E. T.; Smit, B. A.; Ayad, E. H. E. y Engels, W. J. M. (2002). Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria. *Austr. J. Dairy Technol.* 57:61-68.
302. Somers, E. B.; Johnson, M. E. y Wong, A. C. L. (2001). Biofilm formation and contamination of cheese by non-starter lactic acid bacteria in the dairy environment. *J. Dairy Sci.* 84:1926-1936.
303. Somers, J. M.; Guinee, T. P. y Kelly, A. L. (2002). The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of mozzarella-type cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 55:5-11.
304. Sousa, M. J. y McSweeney, P. L. H. (2001). Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camembert-type cheese. *Irish J. Agric. Food Res.* 40:83-95.
305. Sousa, M. J.; Ardö, Y. y McSweeney, P. H. L. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11:327-345.
306. Stanley, G. (1998). *The Technology of Dairy Products*; Cap. 2: Microbiology of fermented milk products. (Ed.: Early, R.). Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido, pág. 50-80.
307. Stuart, M. R.; Chou, L. S. y Weimer, B. C. (1999). Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:665-673.
308. Swearingen, P. A.; O'Sullivan, D. J. y Warthesen, J. J. (2001). Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality. *J. Dairy Sci.* 84:50-59.
309. Tammam, J. D.; Williams, A. G.; Noble, J. y Lloyd, D. (2000). Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:370-374.
310. 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 Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 82:271-278.

311. Tavaría, F. K. y Malcasa, F. X. (2003). Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzym. Microb. Technol.* 33:236–243.
312. Tavaría, F. K.; Dahl, S.; Carballo, F. J. y Malcasa, F. X. (2002). Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 85:2462–2470.
313. Tavaría, F. K.; Tavares, T. G.; Silva-Ferreira, A. C. y Malcata, F. X. (2006). Contribution of coagulant and native microflora to the volatile-free fatty acid profile of an artisanal cheese. *Int. Dairy J.* 16:886-894.
314. Thage, B. V.; Broe, M. L.; Petersen, M. H.; Petersen, M. A.; Bennedsen, M. y Ardö, Y. (2005). Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* with different aminotransferase profiles. *Int. Dairy J.* 15:795-805.
315. Thomas, T. D. (1987). Cannibalism among bacteria found in cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 22:215-219.
316. Turner, K. W.; Lawrence, R. C. y Lelievre, J. (1986). A microbiological specification for milk for aseptic cheesemaking. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 21:249-254.
317. Upadhyay, V. K.; Sousa, M. J.; Ravn, P.; Israelsen, H.; Kelly, A. L. y McSweeney, P. L. H. (2004). Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Lait.* 84:527–538.
318. Veljovic, K.; Terzic-Vidojevic, A.; Vukasinovic, M.; Strahinic, I.; Begovic, J.; Lozo, J.; Ostojic, M. y Topisirovic, L. (2007). Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlata cheese. *J. Appl. Microbiol.* 103:2142-2152.
319. Vinderola, C. G.; Medici, M. y Perdigon, G. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 96:230–243.
320. Visser, S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. *J. Dairy Sci.* 76:329-350.
321. Vizoso-Pinto, M. G.; Franz, C. M. A. P.; Schillinger, U. y Holzapfel, W. H. (2006). *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109:205–214.
322. Wallace, J. M. y Fox, P. F. (1997). Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *Int. Dairy J.* 7:157–167.
323. Walsh, E. M.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1996). Use of antibiotics to inhibit non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 6:425-431.
324. Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M. A. J. S. (1999). *Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes*; Cap. 23: Cheese ripening and properties. Marcel Dekker, Inc.; Nueva York, Estados Unidos, pág. 601-638.
325. Weimer, B.; Dias, B.; Ummadi, M.; Broadbent, J.; Brennand, C.; Jaegi, J.; Johnson, M.; Milani, F.; Steele, J. y Sissen, D. V. (1997). Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence Cheddar cheese ripening. *Lait.* 77:383-393.
326. Westby, A.; Nuraida, L.; Owens, J. D. y Gibbs, P. A. (1993). Inability of *Lactobacillus plantarum* and other lactic acid bacteria to grow on D-ribose as sole source of fermentable carbohydrate. *J. Appl. Bacteriol.* 75:168-175.

327. Wijesundera, C. M.; Roberts, M. y Limsowtin, G. K. Y. (1997). Flavor development in aseptic cheese curd slurries prepared with single-strain starter bacteria in the presence and absence of adjuncts. *Lait*. 77:121-131.
328. Wilkinson, M. G. (1993). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1; Cap. 14: Acceleration of Cheese Ripening. (Ed.: Fox, P. F.). Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, pág. 523–555.
329. Wilkinson, M. G. y Kilcawley, K. N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 15:817–830.
330. Wilkinson, M. G.; Guinee, T. P.; O’Callaghan, D. M. y Fox, P. F. (1994). Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *J. Dairy Res.* 61:249-262.
331. 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. *Int. Dairy J.* 7:763–774.
332. Williams, A. G.; Choi, S. -C. y Banks, J. M. (2002). Variability of the species and strain phenotype composition of the non-starter lactic acid bacterial population of Cheddar cheese manufactured in a commercial creamery. *Food Res. Int.* 35:483-493.
333. Williams, A. G.; Felipe, X. y Banks, J. M. (1998). Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobactillus* spp. and non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 8:255–266.
334. Williams, A. G.; Noble, J. y Banks, J. M. (2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 11:203–215.
335. Williams, A. G.; Withers, S. E. y Banks, J. M. (2000). Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 10:17-23.
336. Wouters, J. T. M.; Ayad, E. H. E.; Hugenholtz, J. y Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12:91–109.
337. Yvon, M. (2006). Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 61:16-24.
338. Yvon, M.; Berthelot, S. y Gripon, J. C. (1998). Adding α -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *Int. Dairy J.* 8:889–898.
339. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:414–419.
340. 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, pág. 20-49.
341. Zárata, V.; Belda, F.; Pérez, C. y Cardell, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats’ milk cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7:635-641.