







UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Selección de bacterias lácticas, aisladas de un queso de cabra artesanal, en función de su aptitud tecnológica y elaboración de un cultivo iniciador destinado a la industrialización de quesos artesanales

Memoria presentada por

**M<sup>a</sup> Adoración Herreros Elías**

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de León

León, Julio de 2010





Universidad de León

**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Drs. Dña M<sup>a</sup> Eugenia Tornadijo Rodríguez y D. José M<sup>a</sup> Fresno Baro como Directores<sup>1</sup> de la Tesis Doctoral titulada “**Selección de bacterias lácticas, aisladas de un queso de cabra artesanal, en función de su aptitud tecnológica y elaboración de un cultivo iniciador destinado a la industrialización de quesos artesanales**” realizada por D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Adoración Herreros Elías en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en  
León a 7 de Julio de 2010.

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Eugenia Tornadijo Rodríguez    Fdo.: Dr. José M<sup>a</sup> Fresno Baro

---

<sup>1</sup> Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.





Universidad de León

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y  
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos en su reunión celebrada el día 13 de Julio de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada **“Selección de bacterias lácticas, aisladas de un queso de cabra artesanal, en función de su aptitud tecnológica y elaboración de un cultivo iniciador destinado a la industrialización de quesos artesanales”**, dirigida por la Dra. Dña. Mª Eugenia Tornadijo Rodríguez y el Dr. D. José Mª Fresno Baro, elaborada por Dª Mª Adoración Herreros Elías y cuyo título en inglés es el siguiente **“Selection of lactic acid bacteria strains, isolated from artisanal goat’s milk cheese on their technological characteristics, and preparation of a native starter culture for the industrialization of artisanal cheeses”**.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 13 de Julio de 2010.

La Secretaria,

Fdo.: Mª Rosario García Armesto

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Carlos Alonso Calleja





Esta Tesis Doctoral ha sido subvencionada por el  
Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del **Proyecto**  
**AGL 2001-0092-CO2-01**

***A mi familia***

# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	»	1
I.1. QUESOS DE ESPAÑA .....	»	3
I.1.1. QUESOS TRADICIONALES .....	»	3
I.1.2. QUESOS ESPAÑOLES CON DISTINTIVO DE CALIDAD .....	»	5
I.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS QUESOS TRADICIONALES .....	»	10
I.2.1. GENERALIDADES .....	»	10
I.2.2. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS QUESOS .....	»	12
I.2.2.1. Aspectos relativos a la materia prima, tecnología de elaboración y la fabricación de los quesos .....	»	12
I.2.2.2. Análisis químicos y físico-químicos realizados sobre la materia prima y el queso a lo largo de la maduración .....	»	13
I.2.2.3. Estudio de los índices madurativos: parámetros glucolíticos, proteolíticos y lipolíticos .....	»	14
I.2.2.4. Estudio microbiológico de la materia prima y del queso a lo largo de la maduración .....	»	15
I.2.2.5. Análisis sensorial de los quesos .....	»	19
I.2.2.6. Obtención de un cultivo iniciador .....	»	22
I.2.2.7. Puesta a punto de un sistema de fabricación industrial .....	»	24
I.3. CALIDAD DE LOS QUESOS TRADICIONALES DE ESPAÑA .....	»	24
I.3.1.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE LOS QUESOS .....	»	24
I.4. LA INDUSTRIALIZACIÓN DE LOS QUESOS ARTESANALES .....	»	28
I.4.1. CULTIVOS INICIADORES: DEFINICIÓN, FUNCIÓN Y CLASIFICACIÓN .....	»	30
I.4.1.1. Definición y función de los cultivos iniciadores .....	»	30
I.4.1.2. Clasificación de los fermentos lácticos .....	»	34

I.4.2. BACTERIÓFAGOS: PRINCIPAL AMENAZA DE LOS FERMENTOS LÁCTICOS .....	»	37
I.4.3. CONTRIBUCIÓN DE LOS FERMENTOS LÁCTICOS A LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS: POTENCIAL ENZIMÁTICO .....	»	41
I.4.3.1. Actividad proteolítica de las bacterias lácticas .....	»	43
I.4.3.1.1. Proteinasa de las bacterias lácticas .....	»	43
I.4.3.1.2. Peptidasas de las bacterias lácticas .....	»	44
I.4.3.2. Actividades esterasa y lipasa de las bacterias lácticas .....	»	48
<b>II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....</b>	<b>»</b>	<b>51</b>
<b>III. PUBLICACIONES.....</b>	<b>»</b>	<b>57</b>
III.1. ARTÍCULO I. Estudio de las características tecnológicas de cepas de bacterias lácticas aisladas de un queso artesanal de cabra, el queso de Armada, variedad sobado. ....	»	59
III.2. ARTÍCULO II. Estudio de la actividad esterolítica de las bacterias ácido lácticas aisladas del queso de Armada, variedad sobado .....	»	61
III.3. ARTÍCULO III. Estudio de la actividad antimicrobiana y de la resistencia a antibióticos de las cepas de bacterias lácticas aisladas de un queso artesanal de cabra, el queso de Armada, variedad sobado. ....	»	63
III.4. ARTÍCULO IV. Estudio preliminar acerca de la influencia de la adición de cultivos iniciadores autóctonos sobre las características organolépticas del queso de Armada, variedad sobado, elaborado con leche pasteurizada .....	»	65
III.5. COMUNICACIÓN A CONGRESO I. Influencia del tipo de cultivo iniciador en la evolución de las fracciones nitrogenadas durante la maduración del queso de Armada, variedad sobado. ....	»	67
III.6. COMUNICACIÓN A CONGRESO II. Modificaciones en el perfil peptídico del queso de Armada, variedad sobado, elaborado con distintos cultivos iniciadores autóctonos a lo largo de la maduración.....	»	69
III.7. COMUNICACIÓN A CONGRESO III. Cambios en el contenido de aminoácidos libres durante la maduración del queso de Armada, variedad sobado, elaborado con distintos cultivos iniciadores autóctonos a lo largo de la		

maduración.....	»	71
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	»	73
IV.1. CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO.....	»	75
IV.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO .....	»	81
IV.3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE CULTIVOS NATIVOS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL QUESO DE ARMADA ELABORADO CON LECHE PASTERIZADA .....	»	83
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	»	95
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	»	101

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Situación geográfica de los principales tipos de quesos incluidos en la Guía de los Quesos de España.....	Pág.	5
--	------	---

## Índice de Tablas

<b>Tabla I.</b> Principales variedades de Quesos de España .....	Pág.	4
<b>Tabla II.</b> Quesos de España con Denominación de Origen Protegida.....	»	7
<b>Tabla II (continuación).</b> Quesos de España con Denominación de Origen Protegida .....	»	8
<b>Tabla III.</b> Quesos de España con Indicación Geográfica Protegida .....	»	9

# **I. INTRODUCCIÓN**



## **I.1. QUESOS DE ESPAÑA**

### **I.1.1. QUESOS TRADICIONALES**

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, actualmente Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (M.A.R.M.), publicó el Catálogo de Quesos de España (M.A.P.A., 1990), donde se recogen un total de 81 variedades de quesos tradicionales, si bien en realidad este número es mayor. De hecho, la Guía de los Quesos de España ([www.cheesefromspain.com](http://www.cheesefromspain.com)) refiere más de 100 variedades de queso.

En general, los quesos de leche de vaca se encuentran en el norte, a lo largo de la Cornisa Cantábrica, desde Galicia hasta el País Vasco, y las zonas montañosas, tanto de la Cordillera Cantábrica como las pirenaicas de Aragón y Cataluña. Los quesos de leche de oveja se encuentran, generalmente, desde el norte, en Cantabria, País Vasco y Navarra, hasta las zonas llanas del interior de la Península, en Castilla y León, Castilla La Mancha, Aragón y Extremadura. Los quesos de cabra se encuentran sobre todo a lo largo de las zonas costeras mediterráneas, desde Cataluña hasta Andalucía, así como en Extremadura. En las islas, tanto Canarias como Baleares, se encuentran quesos sobre todo de leche de cabra, y algunos de leche de vaca, así como de mezcla. Los quesos con mezcla de leche se producen en toda la geografía, predominando en la mezcla el tipo de leche representativo de cada zona.

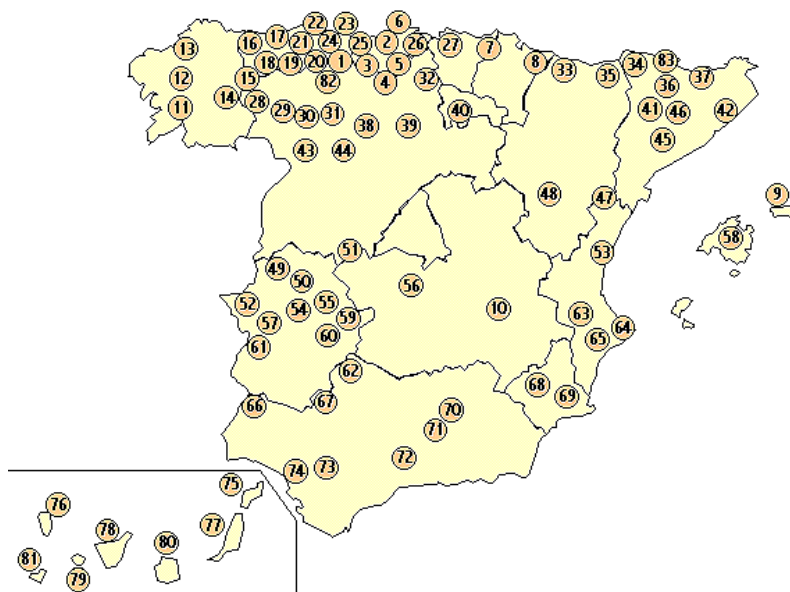
A continuación se muestran los principales quesos de España (Tabla I) y su situación geográfica (Figura 1).



**Tabla I. Principales variedades de Quesos de España**

 1	 2	 3	 4	 5	 6	 7
 8	 9	 10	 11	 12	 13	 14
 15	 16	 17	 18	 19	 20	 21
 22	 23	 24	 25	 26	 27	 28
 29	 30	 31	 32	 33	 34	 35
 36	 37	 38	 39	 40	 41	 42
 43	 44	 45	 46	 47	 48	 49
 50	 51	 52	 53	 54	 55	 56
 57	 58	 59	 60	 61	 62	 63
 64	 65	 66	 67	 68	 69	 70
 71	 72	 73	 74	 75	 76	 77
 78	 79	 80	 81	 82	 83	

Fuente: [www.cheesefromspain.com](http://www.cheesefromspain.com) (2010)



**Figura 1: Situación geográfica de los principales tipos de quesos incluidos en la Guía de los Quesos de España.** Cada número se corresponde con el queso que aparece en la Tabla I. *Fuente: www.cheesefromspain.com (2010).*

### I.1.2. QUESOS ESPAÑOLES CON DISTINTIVO DE CALIDAD

Las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) constituyen el sistema utilizado en nuestro país para el reconocimiento de una calidad diferenciada, consecuencia de características propias y diferenciales, debidas al medio geográfico en el que se producen las materias primas, se elaboran los productos y a la influencia del factor humano que participa en las mismas.

El Reglamento (CE) 510/2006 del Consejo, de 20 de marzo de 2006, sobre protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios, establece las definiciones de Denominación de Origen Protegida (DOP) e Indicación Geográfica Protegida (IGP).

En dicho Reglamento se define una DOP como: “el nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio originario de dicha región, de dicho

lugar determinado o de dicho país, cuya calidad o características se deben fundamental o exclusivamente al medio geográfico con sus factores naturales y humanos, y cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada”.

Las IGP se definen como: “el nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio originario de dicha región, de dicho lugar determinado o de dicho país, que posea una cualidad determinada, una reputación u otra característica que pueda atribuirse a dicho origen geográfico, y cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada”.













Además, el Reglamento (CE) 1898/2006 de la Comisión, de 14 de diciembre de 2006, establece disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 510/2006 del Consejo, sobre la protección de las IG y DO de los productos agrícolas y alimenticios.

Las diferencias entre Denominación de Origen Protegida e Indicación Geográfica Protegida se refieren a que la D.O.P. establece un vínculo “muy estrecho” con la tierra; la materia prima y el producto deben ser producidos, elaborados y transformados en la zona. En cambio, la I.G.P. establece un vínculo “más frágil” pues basta con que la elaboración, no ya la producción o transformación, tenga lugar en la zona y exista una característica particular del producto que justifique su origen.

La Especialidad Tradicional Garantizada (E.T.G.) se otorga a aquellos productos que se distinguen de los de la misma categoría por contar con “características específicas como haber sido producido a partir de materias primas tradicionales, o bien por presentar una composición tradicional o un modo de producción y/o transformación tradicional”.















Actualmente son 28 los quesos españoles que tienen como distintivo de calidad una Denominación de Origen Protegida o Indicación Geográfica Protegida. En las tablas II y III se muestran los quesos con Denominación de Origen e Indicación Geográfica Protegida (véase también el Catálogo de Quesos de España presentado en la página 4 de esta memoria; el número que acompaña a la DOP o a la IGP indica su situación en el mapa de la Figura 1).

Tabla II. Quesos de España con Denominación de Origen Protegida (DOP)

DENOMINACIONES DE ORIGEN (DOPs)	O.M./RESOLUCIÓN	B.O.E.	R.C.E. Nº	D.O.U.E.
 1 - Cabrales (mezcla, azul) (DOP)	29-06-90	12-07-90	1107/96 de 12-06-96	21-06-96
 4 - Picón Bejes Tresviso (mezcla, azul) (DOP)	01-03-94	08-03-94	1107/96 de 12-06-96	21-06-96
 5 - Quesos de Liébana (vaca) (DOP)	07-03-94	21-03-94	1107/96 de 12-06-96	21-06-96
 6 - Queso Nata de Cantabria (vaca) (DOP)	29-10-85 APA/398/07 de 13-02	13-11-85 26-02-07	1107/96 de 12-06-96 1068/07 de 17-09-07	21-06-96 18-09-07
 7 - Idiazábal (oveja) (DOP)	30-11-93 23-03-99 APA/1855/02 APA/2943/07	03-12-93 09-04-99 19-07-02 10-10-07	1107/96 de 12-06-96 2317/99 de 29-10-99	21-06-99 30-10-99
 8 - Roncal (oveja) (DOP)	11-03-91 3-10-01 Resolución 16-02-09	14-03-91 18-10-01 21-03-09	1107/96 de 12-06-96 1204/03 de 04-07-03	21-06-96 05-07-03
 9 - Mahón (vaca) (DOP)	24-06-85 24-11-93	05-07-85 03-12-93	1107/96 de 12-06-96 913/01 de 10-05-01	21-06-96 11-05-01
 10 - Queso Manchego (oveja) (DOP)	23-11-95 APA/3273/07 de 25-10	11-12-95 13-11-07	1107/96 de 12-06-96 561/09 de 26-06-09	21-06-96 27-06-09
 11 - Queso Tetilla (vaca) (DOP)	24-11-93	25-12-93	1107/96 de 12-06-96	21-06-96
 12 - Arzúa-Ulloa (vaca) (DOP)			20/10 de 12-01-10	13-01-10
 13 - San Simón da Costa (vaca) (DOP)	APA/1540/2005 de 17/5	30-05-05	1229/08 de 10-12-08	11-12-08
 14 - Cebreiro (vaca) (DOP)	APA/1559/2005 de 17/5	31-05-05	1014/08 de 16-10-08	17-10-08

O.M.: Orden Ministerial; B.O.E.: Boletín Oficial del Estado; R.C.E.: Registro de la Comisión Europea; D.O.U.E.: Diario Oficial de la Unión Europea.  
Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2010).  
Cada número se corresponde con el queso que aparece en la tabla I.

Tabla II. Quesos de España con Denominación de Origen Protegida (DOP) (continuación)

DENOMINACIONES DE ORIGEN (DOPs)	O.M./RESOLUCIÓN	B.O.E.	R.C.E. Nº	D.O.U.E.
16 - Afuega'l Pitu (vaca) (DOP) 	APA/1893/2004 de 7-06	18-06-04	723/08 de 25-06-08	26-07-08
19 - Queso Casín (mezcla) (DOP) 	Resolución 16-02-09	21-03-09		
21 - Gamonedo (mezcla) (DOP) 			676/08 de 16-07-08	17-07-08
40 - Queso Camerano (cabra) (DOP) 	Resolución 18-05-09	06-07-09		
43 - Queso Zamorano (oveja) (DOP) 	06-05-93	20-05-93	1107/96 de 12-06-96	21-06-96
54 - Torta del Casar (oveja) (DOP) 	APA/1144/2002 de 6-05 APA/2708/2005 de 8-08	23-05-02 19-08-05	1491/03 de 25-08-03	26-08-03
55 - Queso Ibores (cabra) (DOP) 			205/05 de 04-02-05	05-02-05
60 - Queso de la Serena (oveja) (DOP) 	14-04-93	27-04-93	1107/96 de 12-06-96	21-06-96
68 - Queso de Murcia (cabra) (DOP) 	10-10-01	25-10-01	1097/02 de 24-06-02	25-06-02
69 - Queso de Murcia al Vino (cabra) (DOP) 	10-10-01	25-10-01	1097/02 de 24-06-02	25-06-02
76 - Queso Palmero (cabra) (DOP) 	31-08-01	11-09-01	1241/02 de 10-07-02	11-07-02
77 - Queso Majorero (cabra) (DOP) 	06-09-96	14-09-96	378/99 de 19-02-99	20-02-99
80 - Queso Guía y Flor de Guía (mezcla) (DOP) 	Resolución 15-04-08	06-06-08		
83 - Queso de l'Alt Urgell y La Cerdanya (vaca) (DOP) 			2446/00 de 06-11-00	07-11-00

O.M.: Orden Ministerial; B.O.E.: Boletín Oficial del Estado; R.C.E.: Registro de la Comisión Europea; D.O.U.E.: Diario Oficial de la Unión Europea.  
Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2010).  
Cada número se corresponde con el queso que aparece en la tabla I.

Tabla III. Quesos de España con Indicación Geográfica Protegida (IGP)

INDICACIONES GEOGRÁFICAS PROTEGIDAS (IGPs)	O.M./RESOLUCIÓN	B.O.E.	R.C.E. Nº	D.O.U.E.
 20 - Queso Los Beyos (mezcla) (IGP)	Resolución 04-02-10	24-02-10		
 82 - Queso de Valdeón (mezcla) (IGP)			135/04 de 27-01-04	28-01-04

**O.M.:** Orden Ministerial; **B.O.E.:** Boletín Oficial del Estado; **R.C.E.:** Registro de la Comisión Europea; **D.O.U.E.:** Diario Oficial de la Unión Europea.  
**Fuente:** Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2010).  
 Cada número se corresponde con el queso que aparece en la tabla I.

Además, las diferentes Comunidades Autónomas, respaldan mediante Marcas de Garantía otras variedades de queso. En Aragón se incluye el Queso Fresco de Aragón y el Queso Curado de Aragón; en La Comunidad Valenciana, el Queso Blanquet (o Queso de Cabra de Alicante), Queso de Cassoleta, Queso de Servilleta, Queso de la Nucia y Queso Tronchón; en Cataluña, el Formatge; en Madrid, el Queso de Cabra de Madrid y el Queso Puro de Oveja de Madrid; y en Murcia, el Queso de Cabra Curado a La Almendra (MERCASA, 2009). En Castilla y León se incluía como Marcas de Garantía el Queso de la Región del Duero y el Queso Arribes de Salamanca. Sin embargo, en abril de 2010, la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León mediante Orden AYG/473/2010 (BOCYL Nº 70), por la que se da publicidad al informe favorable del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León en relación con la aprobación del reglamento de uso de la marca «Queso Castellano».

La Marca de Garantía establece y asegura la autenticidad de la zona geográfica de producción de leche y sus características, proceso de elaboración, así como las características del producto final. Una Marca de Garantía es aquel signo utilizado por una pluralidad de empresas bajo el control y utilización de su titular que certifica que los productos o servicios a los que se aplica cumplen unos requisitos comunes, en especial en lo que concierne a su calidad, componentes, origen geográfico, condiciones técnicas o modo de elaboración. Va acompañado de un Reglamento de uso en el que se indican los requisitos para pertenecer a dicha Marca, los sistemas y las responsabilidades.

## ***1.2. CARACTERIZACIÓN DE QUESOS TRADICIONALES***

### **1.2.1. GENERALIDADES**

Los estudios de caracterización o tipificación de los quesos tradicionales tienen como objetivo conocer los atributos que hacen de los mismos productos originales, específicos y característicos. Para lograrlo debe abordarse un estudio completo de la materia prima y la tecnología de fabricación, así como de la microbiota y de los procesos bioquímicos que transcurren durante la maduración de

los quesos. La caracterización desde el punto de vista sensorial es también fundamental para completar tales estudios. Dicha información nos permitirá comprender mejor los mecanismos que intervienen en la maduración de los quesos y los factores de los que depende la calidad de los mismos.

Los estudios de caracterización pueden contribuir también a la difusión del producto. De hecho, muchos de los quesos que actualmente gozan de un prestigio a nivel nacional o internacional tuvieron inicialmente una producción muy limitada y un ámbito de distribución local. Con la tipificación de los mismos se han podido poner a punto de sistemas de elaboración industrial, incrementando su volumen de producción y el ámbito de distribución.

Los estudios de caracterización de los quesos tienen interés desde un punto de vista científico, tecnológico y socioeconómico.

*Científico*, ya que se desarrollan y aplican métodos de análisis encaminados a conocer la composición química de la materia prima y del queso a lo largo de la maduración, así como la evolución que experimentan los diferentes grupos microbianos durante el transcurso de la misma.

*Tecnológico*, al permitir la puesta a punto de una tecnología de fabricación industrial que garantice tanto la calidad organoléptica de los quesos como la higiénica, de la que en ocasiones carecen los quesos artesanales y que, por último, permita uniformizar el producto.

La calidad de los quesos elaborados con leche cruda va a estar condicionada por la composición química y microbiológica de la leche de partida, por el proceso tecnológico de elaboración, las condiciones higiénicas mantenidas durante el proceso y las condiciones de maduración. El empleo de leche cruda y la falta de estandarización en las condiciones de elaboración y maduración de los quesos introducen variaciones en la calidad de los quesos elaborados de modo artesanal.

*Socioeconómico*, al permitir la industrialización de quesos que hasta el momento se venían elaborando de modo artesanal y con una producción muy limitada. La instalación de queserías artesanales en áreas rurales puede suponer un beneficio económico para la zona. Por otro lado, los productos tradicionales relacionados con áreas geográficas concretas que además cumplen unos requisitos de calidad, pueden recibir un distintivo de calidad. Dicho distintivo protege al producto frente a la utilización indebida de nombres geográficos y protege también al consumidor, al garantizarle un producto de calidad, en el que se controla la materia



prima, la tecnología de elaboración y el producto final, evitando así la comercialización de imitaciones.

En nuestro país son varios los quesos tradicionales en los que se ha abordado con mayor o menor profundidad estudios de caracterización, ya sean de vaca como el queso de vaca de León (Prieto y col., 1994; Rodríguez Medina y col., 1995), queso de Arzúa (Menéndez y col., 1998; Menéndez y col., 1999), queso Gamonedo (González del Llano y col., 1992), queso Afuega'l Pitu (Cuesta y col., 1996), Picón Bejes-Tresviso (Prieto y col., 1999; Prieto y col., 2000), Genestoso (Arenas y col., 2004; González y col., 2007) o Casín (Alegría y col., 2009); de oveja como el queso Los Pedroches (Carmona y col., 1999; Sanjuán y col., 2002), La Serena (Medina y col., 1991; Roa y col., 1997), Roncal (Arizcun y col., 1996; Izco y Torre, 2000), Idiazábal (Barcina y col., 1995; Ibáñez y col., 1995; Barron y col., 2001), Manchego (Gaya y col., 1988; 1993; Gómez y col., 1999; Cabezas y col., 2007), queso Castellano (Román Blanco y col., 1999; Fernández García y col., 2004) o Zamorano (Ferrazza y col., 2002, 2004; Fernández García y col., 2004); o de cabra como el queso Majorero (Requena y col., 1991), Babia-Laciana (Argumosa y col., 1992; Franco y col., 2003), Gredos (Medina y col., 1992), Ibores (González Crespo y Mas, 1993), Cendrat del Monset (Mor-Mur y col., 1994), Valdeteja (Carballo y col., 1994), Armada (Tornadijo y col., 1993; 1995; 1996; Fresno y col., 1996; 1997) o Tenerife (Zárate y col., 1997).

### **I.2.2. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS QUESOS**

La metodología de caracterización de los quesos incluye las siguientes fases o etapas:

#### **I.2.2.1. Aspectos relativos a la materia prima, la tecnología de elaboración y la fabricación de los quesos**

Se realizan estudios acerca de la producción, se estandariza el proceso tecnológico de fabricación y se fabrican las partidas de queso que se van a utilizar en el estudio de caracterización.

##### *1) Producción de la leche*

La leche que se destina a la elaboración de variedades concretas de queso debe proceder de especies y razas autorizadas y, en el caso de poseer una distinción de calidad, exclusivamente de ganaderías inscritas y controladas por el Consejo Regulador y situadas en la zona concreta de producción. Por lo general, se trata de especies autóctonas de la región cuyas condiciones de manejo y alimentación están reguladas en el respectivo Reglamento. Se recogen datos de producción diaria (mañana y tarde) y acerca del rendimiento quesero, aunque éste dependa también de otros factores como la tecnología de elaboración.

### *2) Estandarización del proceso tecnológico de fabricación de los quesos*

Se define la tecnología de elaboración, en lo referente sobre todo a la coagulación (dosis de cuajo empleado y tiempo de coagulación), operaciones de corte de la cuajada y desuerado (se determina también la composición química del suero), condiciones de maduración (temperatura, humedad relativa de los locales de maduración y tiempo de maduración necesario para que el queso desarrolle las características organolépticas deseables). La tecnología de elaboración va a repercutir en el rendimiento quesero. A este respecto señalar que cuando se elaboran quesos artesanales, la tecnología es bastante rudimentaria y la transformación de leche en queso resulta poco eficaz. Los conocimientos acerca del proceso de elaboración se aplicarán de modo normalizado a las fabricaciones industriales.

### *3) Elaboración de los quesos*

Se elaboran varias partidas de quesos, que se dejan madurar en las mismas condiciones durante un tiempo preestablecido, que dependerá del tipo de queso y del estudio a realizar. Se recogerán muestras de la leche de partida, la cuajada y de los quesos a lo largo del tiempo de maduración.

#### **I.2.2.2. Análisis químicos y físico-químicos realizados sobre la materia prima y el queso a lo largo de la maduración**

Con el objeto de obtener productos de alta calidad y para evitar fraudes, la leche es sometida a análisis de composición y análisis genéticos que verifiquen su procedencia.

De la leche y el queso se toman muestras (Norma FIL-IDF 50B:1985) a lo largo de la maduración y se determinan los siguientes parámetros químicos y físico-químicos: extracto seco, proteína, grasa, cloruros, cenizas, elementos minerales mayoritarios, pH, acidez titulable y actividad del agua.

La evolución del extracto seco en los quesos va a depender entre otros factores del grado de desuerado y de las pérdidas de humedad por evaporación durante la maduración. Las condiciones de las salas de maduración (temperatura y humedad relativa), además de otros factores influyen en este parámetro.

El contenido en cloruros se relaciona con el salazonado. Se puede expresar sobre extracto seco o sobre humedad. La relación sal/humedad indica la influencia del contenido salino sobre el crecimiento microbiano (Lawrence y Gilles, 1982) y también sobre el transcurso de las reacciones proteolíticas y lipolíticas. También condiciona la estabilidad del queso y la probabilidad de aparición de defectos de sabor, etc. La evolución del contenido en cenizas depende del salazonado realizado, la sal es el principal componente de las cenizas. Además, cuando se efectúa de modo no estandarizado como ocurre en muchos quesos artesanales, el contenido en cenizas puede ser muy variable de unos quesos a otros.

La evolución de la actividad del agua está influenciada por el contenido en nitrógeno no proteico y por el contenido en sal.

### **I.2.2.3. Estudio de los índices madurativos: parámetros glucolíticos, proteolíticos y lipolíticos**

Se determinan a lo largo de la maduración los parámetros glucolíticos, lipolíticos y proteolíticos.

Parámetros glucolíticos: lactosa y ácidos D y L-láctico.

La intensidad de la glucolisis está relacionada con el grado de acidificación y, por tanto, con el pH final que alcanza el queso. El pH guarda relación con la intensidad de desuerado, desmineralización, extensión de la proteolisis y evolución microbiana (Fox y col., 1990) y su evolución nos indica la microbiota que predomina y también la intensidad metabólica, así como la actividad proteolítica que luego se desarrolla y que, a su vez, depende del contenido en sal/humedad.

La detección de las formas isómeras del ácido láctico (D y L) nos indica la microbiota láctica predominante (Turner y Thomas, 1980; Thomas y Pearce, 1981) y

se relaciona también con el contenido en sal/humedad. Cuando predomina el ácido L-láctico, el contenido en lactobacilos es bajo. Con el incremento de este grupo microbiano, que tiene lugar con el transcurso de la maduración, aumenta la proporción de D-lactato ya que los lactobacilos pueden llevar a cabo la racemización del L-lactato en D-lactato, a través del enzima lactato deshidrogenasa o bien formar D-lactato a partir de lactosa.

Los parámetros proteolíticos que se determinan son: Nitrógeno Soluble a pH 4,4 expresado como porcentaje sobre Nitrógeno Total (% NS-pH4,4/NT) (representa el índice de la extensión de la proteólisis), % de Nitrógeno Soluble en TCA 12% sobre Nitrógeno Total (% NS-TCA12% /NT) (representa el índice de la profundidad de la proteólisis) y el contenido en Nitrógeno soluble en PTA 5%, expresado como porcentaje del Nitrógeno Total (NS-PTA5%/NT) constituye un buen índice del grado de actividad aminopeptidasa.

La actividad del agua, el contenido de humedad, la sal/humedad y el pH determinan la actividad enzimática de las proteasas y peptidasas microbianas.

Se estudian los parámetros lipolíticos a lo largo de la maduración: índice de acidez de la grasa y determinación y cuantificación de los ácidos grasos libres de cadena corta y larga.

El índice de acidez de la grasa indica el grado de lipólisis debido a las lipasas nativas de la leche y las de origen microbiano y cuya actuación se verá condicionada por el pH y la concentración de NaCl. En general, es menor la actividad lipasa microbiana con respecto a la lipasa nativa y se dirige sobre los mono y diglicéridos liberados bajo la acción de la lipasa nativa (Stadhouders y Veringa, 1973).

Por consiguiente, los parámetros químicos y físico-químicos se interrelacionan con los índices de maduración y de éstos a su vez con el transcurso de la maduración.

#### **I.2.2.4. Estudio microbiológico de la materia prima y del queso a lo largo de la maduración**

La leche se somete a estudios que garanticen su calidad bacteriológica (Norma FIL-IDF 161A:1995). La toma de muestras se lleva a cabo según la Norma FIL-IDF 50B:1985.

La preparación de muestras y de las diluciones para efectuar el estudio microbiológico a lo largo de la maduración, se efectúa siguiendo la Norma FIL-IDF 122B:1992.

Se toman muestras de cada partida y en cada momento de la maduración y tras su homogeneización se siembra el inóculo en el medio selectivo más apropiado para el recuento y aislamiento de los principales grupos microbianos: microbiota aerobia mesófila total, microbiota psicrotrofa, microbiota láctica general, lactobacilos, enterococos, micrococáceas, enterobacterias y microbiota fúngica.

Una vez efectuado el aislamiento de las cepas de cada grupo microbiano se procede a su identificación a nivel de género y especie.

### Factores que condicionan el crecimiento microbiano durante la elaboración y maduración de los quesos

La evolución que experimenta la población de bacterias lácticas a lo largo de la maduración de los quesos va a estar determinada tanto por factores extrínsecos (proceso tecnológico de elaboración o condiciones de maduración de los quesos) como intrínsecos, considerando aquí las características y peculiaridades de la materia prima y del queso.

El transcurso del proceso madurativo va a ser resultado de la interacción que se produce entre la microbiota y los factores abióticos de los quesos, que determinan las reacciones y las adaptaciones fisiológicas y morfológicas de los microorganismos al medio.

Los factores abióticos que condicionan el crecimiento microbiano y que a su vez son modificados por el propio metabolismo microbiano comprenden las características del medio de cultivo y de la atmósfera de crecimiento: actividad del agua ( $a_w$ ), concentración salina, pH, temperatura de maduración, el potencial redox y aditivos.

A continuación, se hace una breve referencia a cada uno de dichos factores:

### 1) Actividad del agua ( $a_w$ )

La  $a_w$  es un concepto que nos permite comprender mejor la relación entre los microorganismos y el agua en los alimentos. La  $a_w$  es directamente proporcional al contenido de humedad del queso e inversamente proporcional a la concentración de NaCl y otros compuestos de bajo peso molecular.

La  $a_w$  se puede definir como la relación entre la presión de vapor del agua presente en un sistema ( $p$ ) y la del agua pura ( $p_0$ ) a la misma temperatura.

$$a_w = p/p_0 \quad 0 \leq a_w \leq 1$$

Durante los primeros estadios de la maduración de los quesos, la  $a_w$  está en torno a 0,99, lo cual permite el crecimiento de todos los grupos microbianos. Con el desuerado, el salazonado y la maduración de los quesos, los niveles de  $a_w$  descienden (0,917-0,988) por debajo de los óptimos que requieren las bacterias que forman parte del cultivo iniciador, contribuyendo al control de su actividad metabólica y multiplicación.

Durante la maduración de los quesos, la  $a_w$  disminuye debido a la evaporación, la operación de salado, la hidrólisis de las proteínas a péptidos y aminoácidos o la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos.

Los quesos pueden tener diferencias en sus valores de  $a_w$  respecto a la corteza y la masa. Dichas diferencias se presentan sobre todo en los quesos madurados en salmuera semicurados y curados, en los que la  $a_w$  es más alta en el interior de los quesos.

### 2) Concentración de sal

La sal y la  $a_w$  están muy interrelacionadas, hasta el punto de que la inhibición de la microbiota del cultivo iniciador y bacterias patógenas por la sal es consecuencia, principalmente del efecto de reducción de la  $a_w$ .

El efecto inhibitorio de la sal está determinado más que por la concentración de sal añadida por la salmuera o salazonado en seco, por la concentración de sal disuelta en la humedad del queso, es decir, por el % sal/humedad.

### 3) pH

El pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos está en torno a un pH neutro, siendo pocas las poblaciones microbianas capaces de crecer a valores inferiores a 5,0.

Debido a la fermentación láctica y acumulación de ácidos orgánicos, el pH del queso puede disminuir hasta valores de 4,5 o inferiores. Valores tan bajos de pH no permiten el crecimiento de las especies ácido-sensibles.

Los principales ácidos orgánicos en los quesos son el ácido láctico, el ácido acético y el propiónico. El ácido láctico es el menos inhibidor del crecimiento microbiano y el propiónico el más inhibidor a la misma concentración y al pH del queso. Sin embargo, tiene más repercusión el ácido láctico ya que está presente en mayor concentración en la mayoría de los quesos, excepto en los quesos de pasta prensada cocida.

#### 4) La temperatura de maduración de los quesos

La temperatura de maduración es un compromiso entre la necesidad de asegurar las reacciones de maduración de los quesos y la de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes. Se trata de un factor que determina el transcurso de la maduración, incrementando la temperatura se puede acelerar la maduración de los quesos.

#### 5) El Potencial Redox (Eh)

El potencial Redox o potencial de óxido-reducción es una medida de la capacidad de un sistema químico/bioquímico para oxidarse (perder electrones) o reducirse (ganar electrones). Un estado oxidado o reducido está indicado por un valor (+) o (-) en mV, respectivamente. El Eh de la leche es aproximadamente +150 mV, mientras que el del queso es aproximadamente -250 mV. La reducción del Eh en el queso está relacionada con la fermentación láctica llevada a cabo por las bacterias lácticas.

Como consecuencia, el interior del queso es esencialmente un sistema anaerobio que sólo puede soportar el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos o anaerobios estrictos.

Los factores bióticos están determinados por la presencia de otros microorganismos de la misma o diferentes especies. De hecho, podemos considerar el queso como un sistema biológico en el que varios grupos microbianos comparten un mismo hábitat, estableciéndose entre ellos relaciones de competencia o asociaciones de tipo simbiótico. La competencia que se establece por los nutrientes

hace que los grupos microbianos mejor adaptados a las condiciones abióticas en ese momento (pH,  $a_w$ , concentración salina, etc.) o con un metabolismo más activo se acaben constituyendo como dominantes respecto al resto. Cuando se modifican esas condiciones, como consecuencia de la propia actividad microbiana o de diversas reacciones bioquímicas, puede verse favorecido, el crecimiento de un grupo microbiano diferente. Las asociaciones de tipo simbiótico también son frecuentes. Mientras ciertos microorganismos poseen capacidad enzimática suficiente para llevar a cabo la degradación de proteínas y péptidos de alto peso molecular, otros, en cambio, sólo son capaces de degradar los péptidos de bajo peso molecular y los aminoácidos. Éstos dependen, por tanto, de la acción microbiana de los primeros para poder acceder a los nutrientes. Lo mismo se podría considerar con respecto a la intensidad de la actividad lipolítica. Por consiguiente, ciertos microorganismos requieren la acción previa de otros para obtener los nutrientes necesarios.

#### **1.2.2.5. Análisis sensorial de los quesos**

Hasta hace no muchos años, la mayoría de los estudios de caracterización de los quesos no incluían un apartado dedicado a la evaluación sensorial. Todos los trabajos abordaban con mayor o menor profundidad la tecnología, microbiología o bioquímica a lo largo de la maduración, pero en ningún momento hacían referencia a la calidad sensorial, siendo ésta posiblemente la más importante desde el punto de vista del consumidor. Los consumidores más allá de demandar productos seguros para su salud, lo que realmente aprecian es su calidad sensorial, es decir, sabor, apariencia, olor, textura, etc. La tendencia creciente en Europa de una mayor industrialización en la producción de alimentos requiere llevar a cabo estudios de caracterización sensorial de los productos tradicionales que permitan su diferenciación de imitaciones (Cayot, 2007). En este punto, el análisis sensorial es una herramienta de gran utilidad.

El interés por el análisis sensorial en alimentos surgió en los años 40 del siglo pasado, alcanzando su máximo desarrollo a partir de los años 70. Esta ciencia incluye varios campos del conocimiento como la anatomía, fisiología o psicología. El análisis sensorial de un alimento aborda diversas propiedades que pueden ser evaluadas por los sentidos: vista (aspecto, color, forma, etc.); olfato (rancidez, acidez, afrutado, etc); tacto (rugoso, suave, blando, etc.); oído y gusto (dulce, salado, ácido, etc.).



La evaluación sensorial de la leche y productos lácteos se puede llevar a cabo mediante las Normas FIL-IDF 099-1, 099-2 y 099-3: 2009 en las que se abordan aspectos generales a cerca de la selección y entrenamiento de catadores, de los métodos recomendados para la evaluación y de los sistemas de puntuación aplicados y nomenclatura utilizada con el fin de estandarizar el proceso.

El estudio de la textura del queso se puede abordar desde dos puntos de vista: sensorial e instrumental. El análisis sensorial de la textura es complejo y tanto las propiedades geométricas como mecánicas del queso se evalúan en la boca y también con los dedos. Este análisis sensorial de la textura puede llevarse a cabo mediante dos tipos de pruebas: afectivas y analíticas. Las pruebas afectivas utilizan consumidores y sirven para comprobar el papel que juega la textura en la elección y aceptabilidad de un queso por parte del consumidor. Por el contrario, las pruebas analíticas utilizan paneles de catadores entrenados cuyas respuestas son tratadas como si fueran datos instrumentales. Las pruebas analíticas incluyen test discriminatorios y sobre todo el análisis descriptivo, el cual es considerado como la herramienta más importante cuando se requiere diferenciar entre las características de los quesos cualitativa y cuantitativamente y se desea establecer relación entre análisis sensorial e instrumental de textura.

La medida instrumental de la textura o de sus características reológicas puede ser clasificada en tres grupos: ensayos empíricos, imitativos y fundamentales (Scott-Blair, 1958).

En la actualidad y dada la dificultad de contar con paneles de catadores expertos, es cada vez más frecuente el uso de análisis instrumentales de la textura debido a su rapidez, economía y, sobre todo, objetividad, lo que conlleva la obtención de resultados más constantes y repetibles. No obstante, dado que los equipamientos instrumentales difícilmente reproducen con exactitud el acto de morder y masticar un alimento (Wilkinson y col., 2000), precisarán de la utilización de paneles de catadores que les permita establecer una correlación entre ambos métodos de análisis de la textura de un alimento.

Entre los métodos instrumentales que más se han aplicado al estudio de la textura en los quesos se encuentra el Análisis del Perfil de Textura (TPA – Texture Profile Análisis) (Hennequin y Ardí, 1993; Raphaelides y col., 1995; Noel y col., 1996; Wium y Qvist, 1998; Innocente y col., 2000; Awad, 2006). El TPA utiliza un

instrumento denominado texturómetro que imita el proceso de masticación mediante la aplicación de grandes fuerzas destructivas obteniendo valores de dureza, elasticidad o cohesividad de la muestra (Van Hekken y col., 2004). El primer texturómetro fue descrito por Friedman, Whitney y Szczesniak (1963). Szczesniak (1963) definió una serie de términos de textura calculados con el texturómetro, llevando a cabo posteriormente con otros colaboradores diversos estudios encaminados al desarrollo de escalas para la medida de propiedades mecánicas de textura (Szczesniak y col., 1963), al establecimiento de correlaciones entre métodos de evaluación sensorial e instrumental de la textura y a la aplicación del texturómetro a diversos productos. Bourne (1968) sustituyó el texturómetro inicial por la máquina de ensayos Instron, la cual alcanzó gran popularidad en análisis del perfil de textura desde entonces hasta la actualidad, si bien durante este tiempo han aparecido nuevos texturómetros de más fácil manejo y que ocupan menos espacio en los laboratorios, entre los cuales cabe destacar el analizador de textura TA-XT2i de Stable Micro System.

El análisis del perfil de textura se lleva a cabo comprimiendo una muestra con una sonda cilíndrica sobre una base plana hasta un porcentaje de deformación previamente establecido, así como a una velocidad determinada. Este proceso se repite dos veces con un intervalo entre ambas con el fin de que la muestra se recupere en función de sus características. El hecho de repetir dos veces la compresión se debe a intentar imitar lo máximo posible el proceso de masticación de una muestra de queso en la boca. Este análisis permite obtener una curva en la que se representa en el eje de ordenadas la fuerza aplicada en la deformación y en el eje de abscisas, el tiempo de análisis. A partir de esta curva se obtienen diversos parámetros de textura como dureza, fragilidad o fracturabilidad, adhesividad, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad cuyas definiciones y cálculos han sido descritos por Szczesniak (1963), Bourne (1968) y Tunick (2000).

El análisis del perfil de textura es muy útil cuando se quiere hacer comparaciones entre muestras ya que pretende proporcionar valores estándar relativos de la textura, pero no es capaz de medir las propiedades reológicas verdaderas (Tunick y Van Hekken, 2002) debido a que no se tiene en cuenta las correcciones en los cambios de forma de cada muestra por lo que estos test también tienen un componente importante de empirismo. No obstante, debido a la facilidad de realización y a la obtención de diversos parámetros objetivos, el análisis del perfil

de textura es considerado por muchos investigadores como una ayuda indiscutible en la evaluación de la textura de los alimentos.

Excelentes revisiones sobre la textura, reología y propiedades de fractura del queso han sido llevadas a cabo por diversos autores (International Dairy Federation, 1991; Prentice y col., 1993; Fox y col., 2000; Tunick, 2000; Lucey y col., 2003; Foegeding y Drake, 2007; Park, 2007).

Cada variedad de queso presenta unas características de textura diferentes debido a que las interacciones moleculares responsables de las mismas varían en función de las condiciones de procesado utilizadas en la elaboración de cada tipo de queso. Entre los principales factores que influyen en la textura de un queso se incluyen: la composición del queso, pH, interacciones entre las caseínas y las proteínas del suero, contenido en calcio, fuerza iónica, contenido en sal, proteolisis y tecnología de elaboración sobre todo lo que se refiere a la velocidad y extensión de la acidificación y lavado de la cuajada (Visser, 1991; Lucey y col., 2003).

En resumen, las propiedades reológicas del queso son de gran importancia para los fabricantes, vendedores y consumidores ya que pueden afectar a la calidad del queso:

- Durante su consumo, es decir, la consistencia que se percibe en la boca al consumirlo.
- Uso: por ejemplo, la facilidad del queso para ser cortado, molido o untado, así como sus características fundentes.
- Manipulación y envasado: por ejemplo, que pueda mantener su forma.
- Formación de ojos, es decir, si se forman ojos o grietas.

### **I.2.2.6. Obtención de un cultivo iniciador**

El cultivo iniciador estará constituido por las especies microbianas más características de la variedad de queso estudiado y que además posean unas características concretas de interés tecnológico. En la mayoría de los quesos, las bacterias lácticas constituyen los microorganismos principales.

La identificación de las cepas a nivel de especie se confirma mediante técnicas genéticas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En los ensayos de la aptitud tecnológica de las cepas de bacterias lácticas se incluye el estudio de la actividad enzimática por la técnica rápida del *API ZYM*. La

capacidad acidificante de las cepas, al igual que su actividad proteolítica y lipolítica se determinan tanto por técnicas cualitativas como cuantitativas.

#### *1) Capacidad acidificante de las cepas*

Cualitativamente se comprueba mediante siembra de las cepas en leche en polvo reconstituida al 10% e incubando a 30°C durante 12 y 24 horas.

Para cuantificar la actividad acidificante de las cepas se determinan los cambios en el pH después de 6, 12 y 18 horas de incubación respecto al pH inicial, el tiempo necesario para obtener un pH de 5,5 y la velocidad máxima de acidificación, según describen Casalta y col. (1995).

La determinación de la acidez titulable se puede hacer siguiendo la Norma FIL 306:1995). El pH que se alcanza es constante para una determinada cepa, mientras que la velocidad y tiempo necesario para alcanzar ese pH depende de la concentración celular inicial.

#### *2) Detección de la actividad proteolítica*

Determinación cualitativa: se siembra en agar leche (leche al 10% y al 30%) según describen Harrigan y Mc Cance (1979).

Cuantitativa: espectrofotométricamente por el método de Church y col. (1983), utilizando o-phthaldialdehído, según describen Ledda y col. (1994) y Cogan y col. (1997).

#### *3) Detección de las diversas actividades peptidasa*

- Aminopeptidasa: basada en la medida espectrofotométrica a 30°C de los productos de la hidrólisis de los sustratos p-nitroanilida (Requena y col., 1993).
- Dipeptidasa, por el método del Cadmio-ninhidrina (Doi y col., 1981).
- Carboxipeptidasa, usando como sustrato bencil-oxi-carbonil-glicil-Leu (El Soda y Desmazeaud, 1982)

#### *4) Determinación de la actividad lipolítica*

Detección cualitativa: en el medio agar mantequilla y en los medios agar tributirina y agar Tween (Harrigan y Mc Cance, 1979).

La determinación cuantitativa se puede realizar espectrofotométricamente por el método que describen Castillo y col. (1999), que se basa en la detección de los compuestos derivados de la hidrólisis de los ésteres del  $\beta$ -naftol.

#### **I.2.2.7. Puesta a punto de un sistema de fabricación industrial**

Se realizan fabricaciones en planta piloto, según la tecnología de elaboración de la variedad de queso en cuestión, definida y regulada, ensayando los diferentes cultivos y estudiando luego las características microbiológicas, químicas y físico-químicas de los quesos a lo largo de la maduración. Se valora el rendimiento quesero (relacionando así la leche de que se parte con la producción final de queso), se analiza la composición del suero y finalmente se somete a un análisis organoléptico, comparando los resultados con los quesos de más alta calidad elaborados de modo artesanal.

### **I.3. CALIDAD DE LOS QUESOS TRADICIONALES DE ESPAÑA**

#### **I.3.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE LOS QUESOS**

Las características típicas de aroma y sabor de un queso dependen de varios factores: el tipo de leche, la calidad química y microbiológica de la misma, la tecnología de fabricación de los quesos, las condiciones de maduración, etc., si bien los fermentos lácticos son los principales responsables de la liberación de los compuestos específicos del aroma y sabor de los quesos.

La leche destinada a la fabricación de queso debe reunir los siguientes requisitos:

- Ausencia absoluta de sustancias perjudiciales para la salud del consumidor, tales como sustancias extrañas y residuos de productos nocivos (pesticidas, drogas, toxinas microbianas, etc.).
- Capacidad de acidificación normal, es decir, ausencia de sustancias capaces de inhibir la microbiota láctica.
- Baja carga microbiana, como requisito para obtener productos con capacidad de conservación prolongada.

- Características organolépticas (sensoriales) normales.
- Escaso contenido celular, indicativo de una leche normal producida por una mama sin infecciones ni trastornos secretorios.
- Escaso o nulo número de gérmenes tecnológicamente indeseables, especialmente coliformes y esporulados butíricos.
- Composición química normal, que indica una buena aptitud para la transformación.

Entre los factores tecnológicos y químicos que influyen en la calidad de la leche destinada a la elaboración de quesos podemos citar los siguientes:

- 1) La presencia o ausencia de sustancias extrañas e inhibidoras.
- 2) La aptitud de la leche para ser coagulada por el cuajo.
- 3) La composición química.
- 4) Condiciones de ordeño y almacenamiento de la leche.

1) Algunas sustancias extrañas que se pueden encontrar en la leche son los antibióticos, pesticidas, metales pesados y los residuos de sustancias empleadas en la limpieza y desinfección.

La presencia de antibióticos en la leche se debe al empleo de antibióticos para el tratamiento de infecciones, particularmente de las localizadas en la mama y para la reformulación de piensos.

Los residuos de antibióticos en la leche tienen repercusiones tecnológicas en la elaboración de queso. La más importante se refiere a defectos en la acidificación de la leche ya que los cultivos iniciadores responsables de la acidificación se ven inhibidos por los antibióticos.

Las bacterias lácticas que integran los cultivos iniciadores son, por lo general, resistentes a los principales tipos de antibióticos, tales como los  $\beta$  lactámicos, las cefalosporinas o los aminoglucósidos (Halami y col., 2000). No obstante, estos antibióticos ejercen una acción inhibitoria sobre la microbiota no integrante del cultivo iniciador que también tiene un papel importante en la maduración de los quesos elaborados con leche cruda y en el desarrollo de sus características organolépticas.

La leche también puede contaminarse con metales pesados que acceden a la leche después del ordeño a partir del utillaje o bien si el animal ha ingerido metales

con el agua o con el alimento y los elimina con la leche. Los elementos más importantes que pueden aparecer en la leche son el cobre, hierro, cinc, estaño, mercurio, aluminio, arsénico, molibdeno. Además de los problemas toxicológicos, el elevado contenido en la leche de ciertos metales (hierro o cobre) puede ser causa de enranciamiento oxidativo de la grasa que conlleva la aparición de sabores a rancio, indeseables.

La leche también puede tener restos de productos (detergentes o cloro activo) empleados en la limpieza de los locales y el utillaje, que podría repercutir en la actividad acidificante de las BAL.

2) El segundo de los factores que condiciona la calidad de la leche destinada a la fabricación de los quesos es su aptitud para ser coagulada por el cuajo.

Una leche presenta buena aptitud para la coagulación cuando coagula fácilmente en presencia de cuajo y forma un gel firme y que desuera fácilmente generando una cuajada de textura y composición convenientes y que tras la maduración va a dar lugar a un queso de calidad. No todas las leches coagulan bien, algunas lo hacen lentamente y dan lugar a geles blandos que desueran mal y que tras el desuerado retienen gran cantidad de agua, siendo su maduración difícil de controlar.

Los criterios de control de la coagulación son básicamente:

- El tiempo de coagulación, que se refiere al período transcurrido desde la adición de cuajo a la leche hasta la aparición de los primeros copos o flóculos que se sueldan produciendo la formación del gel.
- La velocidad de endurecimiento del gel y su dureza máxima.
- La velocidad y grado de sinéresis del coágulo. La evolución del gel se caracteriza por una retracción del retículo proteico con la consiguiente expulsión de suero, es lo que se conoce como el fenómeno de sinéresis.

Hay factores que influyen en la aptitud de la leche para la coagulación y que son inherentes a la misma y otros que son exógenos (posteriores al ordeño). Entre los factores propios de la leche podemos citar el contenido en caseínas, la concentración de calcio soluble y de fosfato cálcico, el tamaño de las micelas de caseína y el pH de la leche.

Entre los factores posteriores al ordeño que pueden condicionar la coagulación de la leche están los tratamientos tecnológicos posteriores al ordeño y previos a la coagulación en los que se incluyen los siguientes: el enfriamiento y almacenamiento de la leche a bajas temperaturas, el tratamiento térmico, la concentración de la leche, la homogeneización. De hecho, el enfriamiento de la leche provoca la solubilización parcial de las caseínas, ya que el descenso de la temperatura provoca una disminución de las interacciones hidrofóbicas. Además, induce la migración de la plasmina (proteasa alcalina de la leche que hidroliza las  $\beta$ -caseínas a  $\gamma$ -caseínas fracción proteosa-peptona) de la fase micelar a la fase soluble, lo que da lugar a su activación.

Las bajas temperaturas también afectan al equilibrio salino ya que el fosfato cálcico es tanto más soluble cuanto más baja es la temperatura. Estos efectos provocan una disminución de la dimensión de las micelas debido a la desmineralización, por lo que tras el enfriamiento de la leche la fase coloidal queda más finamente dispersada.

Otros tratamientos térmicos a los que se somete la leche como la pasteurización conllevan la disminución del calcio soluble que se desplaza hacia las micelas de caseína. Como consecuencia de ello en la leche tratada térmicamente se observa un aumento del tiempo de coagulación y del tiempo de endurecimiento, disminución de la rigidez final del coágulo y del desuerado espontáneo. El efecto negativo del calentamiento se puede revertir añadiendo a la leche cloruro cálcico, en proporciones variables (en torno a 0,2 g/l de leche) que restablece el calcio soluble.

3) La composición química de la leche influye en el rendimiento quesero. Cuanto mayor sea el contenido en grasa y proteína de una leche mayor será su rendimiento quesero.

La composición de la leche se ve sometida a factores de variación que se pueden dividir en genéticos (especie, raza e individuo) y en ambientales, que se refieren a la alimentación, la época del año, la etapa de lactación, la edad del animal y la presencia de infecciones de la mama.

4) Las condiciones de ordeño y almacenamiento de la leche influyen en la calidad bacteriológica de la misma y por tanto en su aptitud para la fabricación de quesos. El número de microorganismos presentes en la leche cruda dependerá de la



higiene mantenida en la producción de la leche, la estación del año, la manipulación y los métodos de transporte. Los métodos de producción de leche (ordeño), la maquinaria y los utensilios también son fuente de un gran número y variedad de microorganismos. Por lo general, la leche procesada por las queserías previamente, a su transformación, es almacenada en condiciones que pueden favorecer el crecimiento de microorganismos psicrotrofos, algunos de los cuales son altamente proteolíticos y lipolíticos. Altos recuentos de microorganismos psicrotrofos en la leche destinada a la fabricación de un queso puede repercutir negativamente en su calidad, debido a la escasa acidificación y al desuerado deficiente durante el prensado de la cuajada. Ante esta problemática, una práctica cada vez más extendida entre los queseros es la adición a la leche cruda de cultivos iniciadores que dirijan adecuadamente la coagulación. Por otro lado, si la leche es pasteurizada, el tratamiento térmico al que ésta se somete va a inhibir el crecimiento no sólo de los microorganismos indeseables sino también de la microbiota láctica, siendo imprescindible en este caso la adición de cultivos iniciadores que reemplacen a la microbiota láctica natural.

La pasteurización de la leche y el empleo de cultivos iniciadores comerciales han promovido la aparición en nuestros mercados de quesos tradicionales con características organolépticas que difieren en mayor o menor medida de la de los productos originales. Este hecho ha determinado que cada vez exista una mayor preocupación por parte de los fabricantes de queso sobre el tipo de cultivos iniciadores a emplear. Para solventar este problema se podría recurrir al empleo de fermentos lácticos autóctonos, obtenidos a partir de los microorganismos aislados de los quesos artesanales. Además, la importancia del empleo de estos fermentos viene determinada no solo por su contribución a la calidad final de los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada, si no también de los obtenidos a partir de leche cruda.

### ***1.4. LA INDUSTRIALIZACIÓN DE LOS QUESOS ARTESANALES***

El principal objetivo de la caracterización de quesos tradicionales es conocer en profundidad los aspectos tecnológicos, químicos y microbiológicos del producto

final y del queso a lo largo del proceso madurativo. La finalidad perseguida es aplicar tales conocimientos en posteriores elaboraciones a nivel industrial.

La posibilidad de pasteurizar la leche aporta, sin duda, grandes ventajas: la eliminación de riesgos higiénico-sanitarios por presencia de microorganismos patógenos y la homogeneidad de las partidas. Por el contrario, supone también la restricción de la originalidad y tipicidad de los quesos tradicionales, al eliminar un factor que contribuye a la maduración de los quesos y, por consiguiente, al desarrollo de la textura, aroma y sabor de los mismos.

La leche pasteurizada destinada a la fabricación de quesos que van a ser madurados es inoculada con fermentos lácticos comerciales que incorporan a la leche bacterias lácticas con capacidad acidificante y aromatizante (cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* o *Leuconostoc mesenteroides*). Como es de suponer esta medida no restablece la población microbiana de la leche que participa en la maduración de los quesos, ya que entre la microbiota no integrante del cultivo iniciador adquieren especial interés los lactobacilos, enterococos o micrococos. Desde este punto de vista, una de las principales desventajas que supone la industrialización de los quesos es la pérdida de la originalidad aportada por la diversidad microbiana responsable de la producción de compuestos de aroma durante la maduración de los quesos.

La industrialización de los quesos artesanales pasa también por la dificultad de asegurar la instalación de queserías en el ámbito de producción de dichos quesos artesanales. Al tratarse de zonas rurales, ocasionalmente con dificultades de acceso, la instalación de empresas resulta a veces difícil de llevar a cabo.

Tal iniciativa puede suponer para la zona de producción (comarca, localidad o lugar) una importante repercusión socioeconómica. De hecho, muchos de los quesos que actualmente tienen D.O.P. y un elevado prestigio internacional fueron en su inicio quesos que se elaboraban de modo tradicional en pequeñas localidades y con una producción muy limitada.

Recientemente se investiga en la posibilidad de emplear bacterias lácticas aisladas de quesos tradicionales como cultivos iniciadores autóctonos en la elaboración industrial de quesos tradicionales. Estos cultivos iniciadores autóctonos contarían con la ventaja respecto a los comerciales de contribuir a la maduración aportando diversidad a las variedades de quesos. La obtención de dichos cultivos iniciadores autóctonos exige el estudio de las aptitudes tecnológicas de un número

representativo de bacterias lácticas y la selección de éstas en función de su capacidad acidificante, proteolítica y lipolítica.

En los siguientes apartados se describen algunos aspectos básicos de los fermentos lácticos empleados en la elaboración de quesos y de la contribución que hacen a la maduración de los quesos.

#### **I.4.1. CULTIVOS INICIADORES: DEFINICIÓN, FUNCIÓN Y CLASIFICACIÓN**

##### ***I.4.1.1. Definición y función de los cultivos iniciadores***

Las bacterias lácticas y otros microorganismos están presentes como “contaminantes” en la leche cruda y posteriormente acceden también al queso a partir del ambiente. Si se emplea leche cruda es posible elaborar queso sin la adición de cultivos iniciadores adicionales pero esta práctica puede llevar en muchas ocasiones a la obtención de un producto final de características no uniformes o con defectos y alteraciones. Actualmente la práctica normal es añadir cultivos para la fabricación de queso, tanto a partir de leche cruda como pasteurizada, permitiendo restaurar o potenciar el desarrollo de la microbiota beneficiosa y proporcionando productos higiénicamente aceptables y de calidad uniforme.

El término “bacterias ácido lácticas” (BAL) engloba un grupo de diversas bacterias con las siguientes características: Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativas, aerotolerantes, ácido-tolerantes, con capacidad de fermentar carbohidratos con producción de ácido láctico como principal producto. Comprende una diversidad de géneros con aplicaciones en procesos de fermentación de alimentos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (*S. thermophilus*), *Tetragenococcus*, *Weisella* (Wessels y col., 2004). A veces, también se considera dentro de este grupo a *Bifidobacterium* ya que comparte con el resto de los integrantes el metabolismo fermentativo y la producción de ácido láctico, aunque filogenéticamente no están relacionadas (Stiles y Holzapfel, 1997).

Los enterococos son habitantes normales del tracto gastrointestinal del hombre y los animales y se encuentran comúnmente en varios alimentos, como contaminantes y parte de la microbiota fermentativa o como cultivos iniciadores. De todos los géneros de BAL en alimentos o de uso probiótico sólo los enterococos se

asocian con infecciones oportunistas y las cepas patógenas de este género poseen factores determinantes de virulencia (Giraffa y col., 1997; Franz y col., 1999; Giraffa, 2004; Martín-Platero y col., 2009). Además, los enterococos presentan, por lo general, multirresistencia a los antibióticos (Giraffa, 2004) y dicha resistencia es transmitida a otras cepas, géneros y especies. En particular, los enterococos resistentes a la vancomicina tienen especial interés ya que dicho antibiótico es muy utilizado en terapéutica clínica. Por el contrario, los lactobacilos y las bifidobacterias se encuentran entre las bacterias con menor riesgo para los humanos. De hecho, no hay casos conocidos de bacteriemias causadas por bacterias lácticas que integran los cultivos iniciadores (Gasser, 1994; Saxelin y col., 1996).

Un cultivo iniciador es un cultivo preparado con una o varias cepas pertenecientes a una o varias especies de bacterias, levaduras o mohos, que se añade o inocula en la leche cruda o pasteurizada destinada a la fabricación de queso, o al queso. Los fermentos lácticos desarrollan un papel principal en el inicio de la fermentación, desarrollando acidez, favoreciendo la coagulación y promoviendo la maduración de los quesos (Ross y col., 2000).

Aunque los cultivos pueden estar constituidos por diferentes tipos de microorganismos, el grupo más importante está constituido casi exclusivamente por las BAL, cuya principal, aunque no única función es, como ya se comentó, la producción de ácido láctico, en un proceso fermentativo a partir de la lactosa, azúcar mayoritario de la leche. Debido a ello a menudo se les denomina fermentos lácticos o cultivos lácticos iniciadores. Los microorganismos implicados son bacterias de los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*.

Las BAL llevan a cabo el transporte de la lactosa (sin fosforilar y fosforilada) hacia el interior de la célula a través de dos mecanismos: el sistema permeasa o el sistema fosfotransferasa, dependiente del fosfoenolpiruvato. El primero, el sistema permeasa, está presente en las bacterias termófilas (*S. thermophilus*, *Lb. helveticus* y *Lb. lactis*) y en los leuconostoc, mientras que el segundo, el sistema fosfotransferasa es propio de los lactococos. En todos los casos la lactosa es hidrolizada a glucosa, galactosa o galactosa 6 P, que siguen posteriormente rutas diferentes en función del tipo de microorganismo.

La producción de ácido por las BAL puede verse afectada por diferentes factores entre los que cabe señalar:

- Factores genéticos. Condicionan la expresión de determinadas propiedades como la capacidad acidificante y que pueden modificarse en la actualidad con técnicas moleculares.
- Sustancias inhibitoras o estimulantes presentes en la leche de forma natural o tras su adición. Como sustancias inhibitoras cabe destacar la presencia de inmunoglobulinas, el sistema lacto-peroxidasa tiocianato-peróxido de hidrógeno y los antibióticos. En la leche pueden encontrarse también sustancias estimulantes como el CO<sub>2</sub> o la β- galactosidasa.
- Infección por bacteriófagos. Constituye uno de los principales problemas que afectan a la producción de ácido por las bacterias del cultivo. Más adelante se aporta información sobre el interés que tienen los bacteriófagos en relación con la tecnología quesera.
- Tecnología de elaboración. La temperatura de coagulación y en su caso de calentamiento de la cuajada en la fabricación de quesos o el grado de concentración y calentamiento en la elaboración del yogur, son factores que influyen en la producción de ácido por las bacterias del fermento.
- Variabilidad de la leche. Las variaciones existentes en la producción de ácido durante la fermentación de la leche dependen no sólo de cambios en la actividad del fermento sino también de la variabilidad que presenta la propia leche que va a ser procesada.

Las BAL contribuyen también a la producción de aroma y CO<sub>2</sub>. El acetaldehído y la acetoína son los principales compuestos que se forman a partir del citrato. Es importante únicamente en los fermentos mesófilos constituidos por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp, y es un carácter codificado en plásmidos. Las bacterias termófilas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lb. helveticus*) no metabolizan citrato aunque pueden formar pequeñas cantidades de estos compuestos a partir del pirúvico, proveniente de la glucosa por la ruta glucolítica, siempre y cuando exista un exceso de éste en el medio o en condiciones de limitación de fuentes de carbono.

Las BAL componentes del fermento participan en la proteólisis que ocurre durante la maduración del queso a través de enzimas unidas a la pared celular que pueden ser liberadas al medio (enzimas extracelulares), enzimas unidas a la membrana celular y enzimas intracelulares. Además, la mayoría de las BAL poseen

lipasas intracelulares, más activas sobre mono y diglicéridos que sobre triglicéridos, liberando ácidos grasos de cadena corta y contribuyendo así al aroma de los quesos (Castillo y col., 2007; Delgado y col., 2010).

Los fermentos no entran en la categoría de aditivos o ingredientes. Por lo tanto, están exentos de los requerimientos que la U.E. exige a los aditivos. En cambio, si algún país considera un cultivo iniciador como aditivo (ej. Dinamarca), debe asegurarse su seguridad y eficacia antes de su utilización y ésta debe ser notificada a las autoridades pertinentes. Otros países como Estados Unidos, permiten que sea la industria la que catalogue una nueva cepa microbiana, con aplicación en alimentos, como un aditivo o sustancia GRAS (sustancia generalmente reconocida como segura). La UE no tiene legislación que regule el uso de BAL en los alimentos con finalidad de cultivo iniciador tradicional, suplemento o cultivo probiótico. Únicamente se contempla legislación específica para cultivos modificados genéticamente y para cultivos empleados para alimentación infantil. Para cultivos probióticos empleados para alimentación animal hay una detallada legislación europea desde 1994 (Algunos ejemplos: Reglamento (CE) 1288/2004 de la Comisión, Reglamento (CE) 2148/2004 de la Comisión, Reglamento (CE) 1200/2005 de la Comisión, Reglamento (CE) 1290/2008 de la Comisión, Reglamento (CE) 899/2009 de la Comisión, Reglamento (CE) 911/2009 de la Comisión).

La legislación emergente sobre alimentos en la U.E. refleja la conciencia que en la actualidad hay sobre seguridad alimentaria. Mientras se intentan reducir los riesgos microbiológicos de presencia de microorganismos patógenos en la cadena alimentaria, esta legislación puede también involuntariamente englobar las bacterias lácticas y otros microorganismos que desde milenios se han venido usando en el procesado de alimentos sin implicaciones sanitarias.

Las “bacterias lácticas no integrantes del cultivo iniciador” (NSLAB) también tienen una marcada influencia en el desarrollo del sabor, aroma y textura de los quesos y, por tanto, en su calidad (Sheehan y col., 2008). Sin embargo, constituyen un factor que se escapa del control de los industriales. Por otro lado, las NSLAB también están asociadas con algunos defectos de los quesos como es la formación de cristales de D-lactato de calcio como consecuencia de su capacidad para racemizar el L-lactato a D-lactato y también son responsables de la aparición de compuestos que producen sabores u olores desagradables. Esta población de NSLAB puede ser controlada empleando cepas en el cultivo iniciador que produzcan

bacteriocinas. La utilidad de estas cepas productoras de bacteriocinas puede extenderse para controlar la salubridad de los alimentos lácteos fermentados. De hecho, la lacticina 3147 producida por *Lactococcus lactis*, que posee la consideración de GRAS, inhibe al patógeno *Listeria monocytogenes*. La actividad bacteriocina puede mantenerse a medida que transcurre la maduración de los quesos si en vez de ser añadida como un concentrado se incorporan a la leche los microorganismos productores.

### **1.4.1.2. Clasificación de los fermentos lácticos**

Los fermentos lácticos se pueden clasificar atendiendo a varios criterios:

- 1) Producción de metabolitos
- 2) Temperaturas óptimas de crecimiento
- 3) Composición
- 4) Formas de inoculación

1) Atendiendo a la producción de metabolitos los fermentos se clasifican en homofermentadores y heterofermentadores. El principal metabolito de los homofermentadores es el ácido láctico, mientras que los heterofermentadores producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación pero con significativas cantidades de los compuestos siguientes: CO<sub>2</sub>, responsable de la aparición de pequeños agujeros en muchas variedades de quesos, ácidos grasos de cadena corta (ácido acético y propiónico), acetaldehído, diacetilo o alcohol etílico.

2) Atendiendo a las temperaturas óptimas de crecimiento los fermentos se pueden clasificar en mesófilos y termófilos.

Los mesófilos poseen un rango óptimo de crecimiento entre 22 y 34°C, siendo los más utilizados en la industria quesera, así como en la fabricación de nata acidificada, mantequilla, etc.

La producción de ácido por los fermentos mesófilos se ve inhibida o reducida a temperaturas inferiores a 20°C. Las temperaturas superiores a 39°C inhiben su crecimiento.

Los fermentos mesófilos comprenden cepas homo y heterofermentativas: *L. lactis* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *lactis* como ejemplo de bacterias acidificantes y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides*

subsp. *dextranicum* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* como ejemplo de aromatizantes.

Los cultivos termófilos están definidos por su habilidad para crecer a temperaturas superiores a 40°C, en el rango de 39 a 50°C, pudiendo sobrevivir a temperaturas iguales o superiores a 55°C. Estos cultivos se suelen emplear en la elaboración de quesos de pasta cocida como el Emmental y el Gruyère, en los que se alcanzan temperaturas de cocción muy altas.

Los cultivos termófilos suelen ser mezclas de cultivos de cocos y bacilos en una proporción 50:50. Crecen en una relación de mutualismo, siendo más rápido el crecimiento y la producción de acidez en el cultivo mixto que en cada cultivo por separado. Los bacilos producen aminoácidos y péptidos que estimulan el crecimiento de los cocos y éstos producen ácido fórmico que es requerido por los bacilos.

El balance entre los cocos y los bacilos está controlado por la temperatura y el pH. Los cocos prefieren temperaturas altas (aprox. 46°C), mientras que los bacilos tienen un óptimo de 39°C. Además, los bacilos son más acidotolerantes que los cocos. Los cocos desarrollan la acidez inicial y estimulan el crecimiento de los bacilos. Al aumentar la acidez, los bacilos crecen más rápidamente que los cocos.

En los cultivos termófilos, la microbiota está compuesta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y diferentes especies de lactobacilos, como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en el caso del yogur, y *Lb. helveticum*, *Lb. fermentum*, *Lb. bulgaricus* en el caso de las leches fermentadas y quesos de pasta prensada cocida.

3) Atendiendo a la composición se pueden distinguir: cultivos puros definidos, cultivos mixtos definidos y cultivos mixtos no específicos.

- Cultivos puros definidos: constituidos por cepas únicas seleccionadas a partir de poblaciones mixtas en base a criterios como su capacidad proteolítica, resistencia a los fagos, etc.

- Cultivos mixtos definidos: constituidos por la mezcla de cultivos de cepas individuales. Suelen estar formados por cepas acidificantes, frecuentemente *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y cepas aromáticas (*Leuconostoc cremoris* o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, o bien por ambas). La utilización de estos fermentos presenta el problema de la compatibilidad de las



cepas. En estos cultivos, algunas cepas pueden convertirse en dominantes, bien sea por la producción de bacteriocinas o por su capacidad de crecimiento (tiempo de latencia corto) y tiempo de generación. La rotación de estos cultivos disminuye los riesgos de contaminación por fagos.

- Cultivos mixtos no específicos: constituidos por mezclas no específicas de cepas indeterminadas, asemejando un ecosistema natural.

- Normalmente tienen sistemas complejos de resistencia a los fagos.
- Suelen constituirse con cepas mesófilas; las termófilas están normalmente en cultivos definidos.

4) Atendiendo a la forma de inoculación, los fermentos lácticos se pueden dividir en: cultivos líquidos refrigerados o congelados, cultivos liofilizados y cultivos concentrados (congelados o liofilizados), que pueden ser añadidos directamente a la cuba.

Los cultivos lácticos tradicionales necesitan ser revitalizados en leche realizando varios pases antes de su inoculación. Los directos a cuba no necesitan resiembra previa, mientras que, los cultivos concentrados están preparados para ser inoculados en la leche.

Los *cultivos líquidos refrigerados* están hoy en día prácticamente en desuso, pues requieren una cadena de frío y se contaminan fácilmente. A 2-5°C su vida puede ser de varios días si la acidez desarrollada no supera los 70°D.

Los *cultivos líquidos congelados* se emplean frecuentemente en queserías del Reino Unido y consisten en leche inoculada pero no incubada, cuya actividad se mantiene en un nivel aceptable durante 3-6 meses de conservación a -20°C.

Los *cultivos liofilizados* se obtienen a partir de cultivos líquidos deshidratados o congelados y sublimados bajo vacío. Se emplean en los laboratorios de las queserías para producir el depósito de cultivos e inocular el cultivo madre. Se pueden conservar refrigerados de 3 a 6 meses aproximadamente. A partir de estos cultivos, la preparación de un fermento precisa de 2 etapas:

- Preparación de un cultivo madre.
- Preparación del fermento propiamente dicho que representará aproximadamente el 1-2% del volumen de la leche empleada para la fabricación.

Estos cultivos se deben resembrar con un poco de leche antes de su utilización. Se obtiene un cultivo madre que se puede utilizar, a su vez, para sembrar directamente en la cuba. A partir de la cepa madre se hacen nuevas resiembras en leche para obtener nuevos cultivos.

Los *cultivos concentrados directos a cuba* sólo necesitan ser almacenados bajo las condiciones prescritas y abiertos y vertidos a la cuba bajo condiciones asépticas.

#### **I.4.2. BACTERIÓFAGOS: PRINCIPAL AMENAZA DE LOS FERMENTOS LÁCTICOS** (Forde y Fitzgerald, 1999; Moineau, 1999; Mc Grath y col., 2007)

Como se comentó anteriormente el buen desarrollo de los fermentos lácticos influye en el transcurso de la acidificación. Las irregularidades de acidificación son más fácilmente percibidas en fábricas que tratan varios centenares de miles de litros al día que en las fábricas artesanales y en aquellas fabricaciones en las que la obtención de un determinado pH de la cuajada determina el buen transcurso del desuerado y endurecimiento de la cuajada. Los bacteriófagos o fagos constituyen la principal causa de perturbación de la acidificación.

La inhibición debida a los fagos es diferente a la que se produce por antibióticos, en la cual se observa una ligera o nula capacidad de crecimiento inicial, y si la inhibición no es severa el crecimiento del cultivo y la producción de ácido por las cepas resistentes puede incrementarse con el tiempo. En cambio, la infección por fagos se caracteriza por una acidificación normal, seguida de un descenso o finalización del crecimiento del cultivo en una etapa posterior.

Los fagos como todos los virus son organismos rudimentarios que se ven obligados a parasitar células para su multiplicación. En este caso parasitan bacterias lácticas. Pueden encontrarse como fagos extracelulares, partículas de tamaño <1 micrómetro de longitud separadas de su hospedador bacteriano. Las partículas fágicas constan de ADN (material genético que contiene la información necesaria para la multiplicación) y proteínas, de tal modo que el núcleo de ADN se encuentra encerrado en una cápsida proteica. Están formados por una cabeza de forma geométrica, prolongada por una cola cuya extremidad puede llevar varios salientes fibrosos. Se reparten en dos tipos morfológicos, según su cabeza se inscriba en una esfera (isométricos) o bien sea alargada. Los fagos de cabeza isométrica son los

más frecuentes, pero los más peligrosos (capaces de atacar a un gran número de células) son los otros.

El fago ataca a la célula bacteriana adosándose por medio de sus fimbrias a estructuras complementarias (receptores), presentes en la pared celular de la bacteria. Cada fago se fija sobre un tipo específico de receptor, e inyecta su ADN a través de un hueco que las enzimas han abierto en la pared celular. El ADN va a dirigir a partir de este momento la fabricación de nuevos fagos, comenzando a reproducir ADN fágico y proteína.

El ácido nucleico y la proteína se ensamblan constituyendo nuevas partículas fágicas que eventualmente lisan la célula, liberándose al medio. Transcurren aproximadamente 30 min (fase de latencia) entre el momento en que el fago se fija sobre la pared celular y la célula se lisa liberando nuevos fagos.

A veces, la infección ocurre sin lisis, resultando un ciclo lisogénico donde las células infectadas sobreviven y se reproducen infectando células hijas. Son los denominados fagos temperados. El ADN del fago, inyectado en la bacteria, se mantiene en estado latente, sin multiplicarse. La bacteria se denomina entonces lisógena. La capacidad de multiplicación y acidificación permanece incambiable. Por el contrario, ésta se hace insensible a los fagos idénticos o muy parecidos a los que alberga, aunque permanece sensible a otros fagos. A lo largo de su multiplicación la bacteria lisógena transmite el ADN del fago a su descendencia. Esta relación entre el fago y la bacteria no es completamente estable, puede romperse y el fago reemprende entonces su ciclo normal de multiplicación que conduce a la formación de nuevos fagos y a la lisis bacteriana. Por ello en un cultivo de bacterias lisógenas siempre habrá fagos libres pero como otras bacterias aún permanecen en relación de lisogenia, son resistentes a la infección y el cultivo se desarrolla con relativa normalidad.

Actualmente se sabe que la mayor parte de las cepas de lactococos son lisógenas y pueden liberar espontáneamente un número elevado de fagos.

Los cultivos iniciadores pueden, por tanto, existir en uno de los estados siguientes:

- Insensibles a la infección, debido a una resistencia inherente o adquirida (Binetti y col., 2007; Suárez y col., 2008).
- Como bacterias lisogénicas, en este caso la bacteria es resistente a otra infección fágica.

- Sensibles a los fagos, en cuyo caso el fago crecerá rápidamente y puede terminar con el cultivo. Los fagos tienen un corto período de latencia, se reproducen cada 30-50 min y cada célula lisada liberará 50 a 100 nuevos fagos. El crecimiento del cultivo se detendrá cuando el nivel de fagos alcance  $10^3$ - $10^7$  /ml.

Para escoger las cepas puras que componen un fermento es primordial conocer los fagos que pueden liberar y asegurarse que no son activos sobre otras cepas de la mezcla.

La leche cruda introduce en el ambiente industrial nuevos tipos de fagos y constituye el origen de las cepas lisogénicas del fermento. De hecho, la mayor parte de las cepas de lactococos son lisogénicas y pueden liberar espontáneamente fagos.

Cada vez que se emplea una nueva cepa en la industria se puede introducir un nuevo fago. Si este fago encuentra una cepa sobre la cual pueda multiplicarse, puede alcanzar concentraciones elevadas. Es pues peligroso mezclar cepas puras o complejas de orígenes diferentes ya que hay riesgo que una cepa sea lisogénica y el resto de cepas sensibles a dicho fago.

Otras fuentes de contaminación se caracterizan por la cantidad masiva de fagos que aportan. Es el caso de las contaminaciones a partir del lactosuero. Los fagos aportados por la leche, las bacterias y el material insuficientemente limpiado y desinfectado se multiplican a lo largo de la fabricación y encuentran su máximo nivel en el lactosuero. El suero constituye pues una fuente de contaminación particularmente peligrosa para las cubas de fermento y las cubas de fabricación, dada su elevada concentración de fagos y su gran diseminación por la fábrica.

Teniendo en cuenta que los propios cultivos son una fuente de contaminación es imposible eliminar los fagos. Únicamente se puede limitar su desarrollo de modo que se mantengan a un nivel suficientemente bajo para no alterar las fabricaciones. Además, los bacteriófagos son más resistentes a las condiciones físico-químicas del medio que sus bacterias huéspedes. Por ejemplo, numerosos fagos de lactococos mesófilos resisten a la pasterización y es preciso aplicar tratamientos de al menos  $90^{\circ}\text{C}/20$  seg para destruirlos totalmente. También resisten al secado por atomización y subsisten en la leche en polvo incluso después de largos períodos de conservación. Por el contrario son eficazmente destruidos por numerosos desinfectantes tales como el hipoclorito, el formol y el ácido peracético.

Los fermentos complejos o naturales presentan raramente graves problemas de fagos. El ataque a algunas cepas se ve más o menos enmascarado por el desarrollo de las otras. No obstante, constituyen un factor de desequilibrio responsable de la mayor parte de irregularidades de acidificación frecuentemente observadas en este tipo de fermentos.

Los fermentos de cepas puras permiten un mejor dominio de las elaboraciones que los fermentos complejos. Pero al estar constituidos por un menor número de cepas quedan más expuestos al ataque de los fagos, por lo que se recomienda una rotación diaria de fermentos que estén constituidos por cepas que no comparten fagos. Sin embargo, cuando se trata de fábricas de gran tamaño es imposible llevar a cabo la rotación que se requeriría, la cual no puede ser realizada debido al número restringido de cepas diferentes desde el punto de vista de su sensibilidad a los fagos.

Es difícil encontrar cepas que presenten de modo natural las aptitudes tecnológicas deseadas y gran resistencia a los fagos. Otra solución es emplear fermentos denominados "resistentes a los fagos". Cuando hay una cepa sensible a un fago se selecciona la variante que sea resistente. Estas cepas podrían luego ser mejoradas mediante la incorporación de caracteres tecnológicos (velocidad de acidificación, producción de textura o aroma,...). Permitiendo conjugar en una misma cepa una resistencia elevada a los fagos y las aptitudes tecnológicas adecuadas.

La manipulación genética de las bacterias lácticas posee muy buenas perspectivas de futuro para la mejora o producción de nuevas cepas de fermentos lácticos. De hecho, las bacterias lácticas que integran los cultivos iniciadores pueden ser mejoradas genéticamente para incrementar sus aptitudes a nivel industrial, por ejemplo, por adquisición de la capacidad de resistencia a los fagos.

Los factores genéticos de resistencia a los fagos están generalmente codificados por plásmidos. Dichos mecanismos de resistencia pueden inhibir la adsorción del fago sobre la bacteria, bloquear la inyección del DNA fágico en la célula, degradar o modificar el DNA del fago o inhibir la maduración del fago dentro del hospedador. Estos plásmidos pueden transferirse entre las cepas por conjugación, lo que permite aplicar Técnicas de Ingeniería Genética con objeto de desarrollar cepas resistentes a los fagos mediante la expresión de múltiples mecanismos de resistencia. Si a la resistencia a los fagos se suma la capacidad de producir bacteriocinas y otras sustancias que ejerzan un efecto beneficioso sobre la

salud o bien mejoren la calidad de los productos podemos asegurar que la manipulación genética de las BAL proporcionará fermentos de excelente actividad que abaratarán costes de producción y mejorarán los aspectos nutricionales de los alimentos fermentados.

### **I.4.3. CONTRIBUCIÓN DE LOS FERMENTOS LÁCTICOS A LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS: POTENCIAL ENZIMÁTICO**

Como ya se comentó en un apartado anterior de la Tesis son varios los factores que condicionan el desarrollo de las características organolépticas de los quesos, entre ellos el tipo de leche, su calidad microbiológica, la tecnología de elaboración de los quesos, las condiciones de maduración y la microbiota láctica. Por consiguiente, la calidad, el aroma y la textura de los quesos se deben en buena medida a la población microbiana, y en particular, a las bacterias lácticas por constituir el grupo mayoritario. En la elaboración de la mayoría de quesos, la leche es pasteurizada previamente a la adición de fermentos, lo que permite controlar, la calidad de los quesos.

Menos control se puede tener sobre otros factores como la composición de la leche y la microbiota no integrante del cultivo iniciador, entre ella la población de NSLAB, que como ya se comentó desempeñan también un importante papel en el desarrollo del flavor del queso y, por tanto, en su calidad. Los lactobacilos contribuyen por medio de sus peptidasas a la liberación de aminoácidos, que pueden ser directa o indirectamente responsables del desarrollo del flavor y aroma (Williams y col., 1998). Diversos autores han caracterizado químicamente proteinasas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* y *Lb. plantarum* (El Soda y col., 1986a; Ezzat y col., 1985; 1987; Coolbear y col., 2008; Milesi y col., 2009).

Por otro lado, las NSLAB también están asociadas con defectos en los quesos que consisten en el desarrollo de cristales de D-lactato de calcio, la aparición de grietas en la masa y la presencia de aromas desagradables (Ross y col., 2000).

Las bacterias lácticas, principalmente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* son incluidas en los cultivos iniciadores destinados a la elaboración de quesos. Las

principales características de dichos cultivos se refieren a: resistencia a fagos, actividad acidificante, actividad proteolítica y contribución al flavor. Con respecto a este último atributo hay que destacar que el desarrollo del flavor del queso es un proceso muy complejo resultado de una combinación de aspectos microbiológicos, bioquímicos y tecnológicos.

Los cultivos iniciadores juegan un papel clave en el desarrollo del flavor durante la maduración de los quesos (Urbach, 1993, Broome y Limsowtin, 1998; Coolbear y col., 2008). Las cepas salvajes o autóctonas aisladas de leche, productos lácteos e incluso fuentes no lácteas tienen la capacidad de producir sabores diferentes a los producidos por los fermentos industriales y podrían contribuir adecuadamente a la obtención de quesos con características organolépticas similares a las de los quesos artesanales aunque sean elaborados industrialmente.

Previamente a la incorporación de las cepas a los cultivos iniciadores es necesario realizar una selección de las cepas en función de sus características tecnológicas y de la compatibilidad entre las mismas.

Ayad y col. (2000) señalan que la capacidad acidificante y proteolítica, es en general, más alta en las cepas lácticas “salvajes” que en las industriales. Una conveniente capacidad acidificante y proteolítica de las cepas de BAL es un requerimiento para la elaboración de quesos (Limsowtin y col., 1995). Ayad y col., (2000) señalan el interés de combinar las cepas salvajes con cepas industriales para preparar cultivos iniciadores definidos y adecuados con aplicación en la elaboración de quesos. También es importante asegurar la viabilidad de los fermentos durante la elaboración y maduración de los quesos. Posteriormente, la lisis celular es un aspecto fundamental para la liberación de enzimas que contribuirán a la maduración de los quesos y al desarrollo del flavor. Las cepas salvajes suelen mantenerse viables durante la maduración de los quesos.

Actualmente en la elaboración de queso a gran escala se emplean cultivos lácticos para asegurar la acidificación inicial de la leche, esencial para que la maduración transcurra convenientemente y para la conservación de los quesos. Los fermentos lácticos inoculados acidifican la leche y favorecen la coagulación por acción del cuajo. Además, por medio de su sistema proteolítico (proteinasas y principalmente peptidasas que hidrolizan péptidos provenientes de la caseína a péptidos más pequeños y aminoácidos) contribuyen al desarrollo de la textura y las

características organolépticas de los quesos madurados. Aunque, por lo general, las BAL no son muy lipolíticas algunas especies pueden hidrolizar los triglicéridos de la leche, contribuyendo también de este modo a la maduración (Gobbetti y col., 1996).

A continuación, se da una información más profunda acerca de la actividad proteolítica y lipolítica de las BAL y su contribución a la maduración de los quesos.

#### **I.4.3.1. Actividad proteolítica de las bacterias lácticas**

El sistema proteolítico de las BAL está constituido por:

- Proteinasas que degradan las proteínas de la leche a péptidos.
- Peptidasas, que degradan los péptidos de alto peso molecular a oligopéptidos y aminoácidos.
- Sistemas de transporte, que intervienen en la captación celular de pequeños péptidos y aminoácidos (Law y Haandrikman, 1997).

##### **I.4.3.1.1. Proteinasas de las BAL**

Las proteinasas de las BAL constituyen el primer eslabón en la degradación de las caseínas.

Con excepción de algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, que secretan proteinasas (Hugenholtz y col., 1984), en general, las proteinasas de los lactococos están localizadas en la pared celular (Law y Kolstad, 1983). No obstante, la proteinasa P (Prt P) parece ser la única enzima proteolítica cuya localización extracelular es cierta. Además de la proteinasa extracelular Prt P, se ha descrito una metal-proteinasa intracelular purificada a partir de una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que hidroliza en bajo grado la  $\beta$  caseína (Law y Haandrikman, 1997).

Las proteinasas de los lactococos pueden clasificarse en función de la especificidad del sustrato (Visser y col., 1986). En base a su actividad se diferencian dos tipos principales de proteinasas: PI y PIII. Otras proteinasas pueden degradar las  $\alpha$ s1,  $\beta$  y  $\kappa$  caseínas con especificidades distintas a las que muestran las PI y PIII (Exterkate y col., 1992).



Las PI fueron detectadas en la pared celular de cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *lactis*. Degradan la  $\beta$  caseína y sólo llevan a cabo un bajo grado de hidrólisis de la  $\alpha$ s1 caseína.

Las PIII fueron detectadas en cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* y son codificadas por genes localizados en plásmidos. Degradan la  $\beta$  caseína de forma diferente a como lo hacen las PI y además degradan las  $\alpha$ s1 y  $\kappa$  caseínas (Tan y col., 1993).

En algunas cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* se ha comprobado que la proteinasa tipo P III hidroliza preferentemente ciertos enlaces de la  $\beta$  caseína (Tyr<sub>193</sub>-Gln<sub>194</sub>, Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub>, Asp<sub>43</sub>-Glu<sub>44</sub>, Gln<sub>46</sub>-Asp<sub>47</sub> y Phe<sub>52</sub>-Ala<sub>53</sub>). En cambio, la proteinasa PI sólo hidroliza el enlace Tyr<sub>193</sub>-Gln<sub>194</sub>. En otras cepas, en cambio, no hay secuencias tan obvias de aminoácidos susceptibles a la hidrólisis, aunque sí algunos sitios preferentes de hidrólisis.

En general, la proteinasa PIII tiene una especificidad más amplia en su acción sobre la  $\beta$  caseína que la proteinasa tipo PI. En la hidrólisis de los péptidos responsables del amargor también está implicada una proteinasa PIII.

Los péptidos que se generan como consecuencia de la hidrólisis de la caseína por las proteinasas son posteriormente degradados por peptidasas a péptidos más pequeños y aminoácidos. Actualmente hay un amplio rango de peptidasas que han sido aisladas, purificadas y caracterizadas con respecto a su estructura, punto isoeléctrico, pH y temperatura óptima, especificidad de sustrato, etc.

### ***1.4.3.1.2. Peptidasas de las BAL***

En el queso los péptidos grandes y de tamaño intermedio son producidos en primer término por el cuajo residual y en menor medida por la plasmina nativa como resultado de la degradación de la caseína (Fox y McSweeney, 1996). Las BAL han desarrollado complejos sistemas enzimáticos que intervienen en la producción de péptidos pequeños y en la liberación de aminoácidos (Christensen y col., 1999). Los pequeños péptidos son transportados al citoplasma de la célula donde son degradados a aminoácidos libres por peptidasas endocelulares (tales como

aminopeptidasas, dipeptidasas y carboxipeptidasas). Los aminoácidos libres tienen una directa, aunque limitada, contribución al desarrollo del sabor del queso y contribuyen también indirectamente a la formación de aminas, tioles, tioésteres, aldehídos y cetonas (Cogan y Hill, 1995).

Si tenemos en cuenta que muchos péptidos liberados por las proteinasas son demasiado grandes para ser captados por la célula bacteriana, la actividad peptidasa extracelular es necesaria para obtener péptidos que puedan ser transportados a través de la membrana. Del mismo modo hay peptidasas endocelulares. Según Exterkate y col. (1992) y Tan y col. (1992) todas las peptidasas (Pep C, Pep N, Pep X, TRP, Pep O y GAP) están presentes intracelularmente, aunque algunas (Pep X, TRP y Pep O) están asociadas a la pared celular.

La localización intracelular de las peptidasas aparentemente no excluye la localización extracelular ya que la liberación de peptidasas se produce por lisis celular. No obstante, algunas peptidasas como la dipeptidasa no se encuentran en el exterior. La utilización de los di y tripéptidos por *Lactococcus lactis* se presenta como un proceso en dos etapas. La primera etapa consiste en la translocación del péptido a través de la membrana citoplásmica por medio de un sistema de transporte específico. La segunda etapa consiste en la hidrólisis intracelular del péptido en aminoácidos, que enseguida son utilizados para la síntesis proteica (Konings y col., 1994).

Las **endopeptidasas** son, probablemente las enzimas que juegan el principal papel en la degradación de péptidos que se generan a partir de las caseínas por las proteinasas. Hidrolizan péptidos largos de más de 25 residuos aminoacídicos y no exhiben actividad similar a las exopeptidasas. Su especificidad de sustrato puede ser mayor.

Las **exopeptidasas** de las BAL comprenden las aminopeptidasas generales que tienen una amplia especificidad de sustrato, realizan la hidrólisis de péptidos de longitud de cadena variable y escinden residuos aminoacídicos N-terminal (Tan y col., 1993). La glutamil-aminopeptidasa separa los residuos Glu N-terminal o Asp N-terminal; las X-Prolil-dipeptidil aminopeptidasas separan residuos X-Pro de sustratos conteniendo un grupo X-prolil N-terminal; las prolidasas hidrolizan sólo dipéptidos

conteniendo un residuo Pro C-terminal; la prolina iminopeptidasa escinde residuos Pro N-terminal de dipéptidos o tripéptidos.

Las **aminopeptidasas** pueden contribuir al desarrollo del flavor en los productos lácteos fermentados ya que son capaces de liberar aminoácidos a partir de oligopéptidos formados como consecuencia de la actividad proteínica extracelular. Por ello se han caracterizado diversas aminopeptidasas en las BAL (Thomas y Pritchard, 1987; Kok, 1990). Las cuales tienen una amplia especificidad de sustrato e hidrolizan varios dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos.

Las aminopeptidasas de lactococos (Pep N) pueden contribuir a reducir los péptidos hidrófobos que se derivan de la degradación de la  $\beta$  caseína (Tan y col., 1993). Por lo general, Pep N hidroliza péptidos que contienen prolina en la segunda posición del péptido. Según Exterkate y col. (1992), las aminopeptidasas generales de *L. lactis* no pueden liberar residuos Pro amino terminal de péptidos, si bien la Pep N puede hidrolizar la Pro-pNA. Además, se han descrito aminopeptidasas de lactococos específicas para residuos glutamato o aspartato amino-terminal (Exterkate y de Veer, 1987), así como con otras especificidades. Las aminopeptidasas generales, la glutamil-aminopeptidasa y la X-prolildipeptidil amino-peptidasa pueden ser consideradas las principales aminopeptidasas de los lactococos (Tan y col., 1993).

A continuación se citan algunas aminopeptidasas específicas:

- Glutamil-aminopeptidasas. Se trata de enzimas con especificidad para péptidos con residuos de glutámico y aspártico en la posición amino (ej. Glu-Glu, Glu-pNA). Se han purificado a partir de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*.

- X-Prolil-dipeptidil amino-peptidasas. Estas enzimas degradan los oligopéptidos ricos en Pro. Hidrolizan de modo específico péptidos con secuencia X-Pro-Y (ej. Gly-Pro-pNA) por rotura del enlace N-terminal X-Pro.

La X-prolil dipeptidil amino-peptidasa (Pep X) de los lactococos es capaz de liberar dipéptidos de oligopéptidos, incluso cuando el penúltimo residuo es Pro. También dipéptidos prolil-prolina N-terminal pueden ser liberados de los oligopéptidos por acción de la Pep X (Booth y col., 1990a y b). Macedo y col. (2000)

han hallado actividad X-Prolil dipeptidil aminopeptidasa en extractos libres de células de lactobacilos.

Algunas cepas de BAL son auxotróficas para la prolina (Pro), por tanto, dependen de la caseína como única fuente de Pro. Si tenemos en cuenta que la caseína contiene un elevado número de residuos Pro (8,5% en la  $\alpha$  caseína y 16,7% en la  $\beta$  caseína), las enzimas más importantes para la degradación de la caseína por las BAL son quizás las prolildipeptidasas, capaces de degradar péptidos que contienen prolina.

- Dipeptidasas. Hidrolizan sólo dipéptidos pero no tripéptidos y tetrapéptidos o dipéptidos con un residuo Gly o Pro N-terminal.

La hidrólisis de dipéptidos puede ser llevada a cabo por un variado número de enzimas de lactococos. Entre ellos se encuentran las aminopeptidasas generales y las Prolina iminopeptidasas. No obstante, hay verdaderas dipeptidasas que hidrolizan específicamente dipéptidos y han sido purificadas a partir de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Law y Haandrikman, 1997).

- Tripeptidasas. Hidrolizan una variedad de tripéptidos (ej. Leu-Gly-Gly) por escisión del residuo aminoacídico N-terminal, dando lugar a dipéptidos. En principio la enzima puede considerarse una aminopeptidasa. La enzima tiene una amplia especificidad de sustrato pero los tripéptidos con Pro- como segundo aminoácido no son hidrolizados. Esta enzima está presente en diversas cepas de *Lactococcus* pero no de *Lactobacillus bulgaricus*.

En cepas de *Lactococcus lactis* se han identificado tripeptidasas y aminopeptidasas, que pueden eliminar los residuos N-terminales de tripéptidos, mientras que los di-, tetra- o los oligopéptidos no son hidrolizados.

- Prolidasas. Las aminopeptidasas generales hidrolizan la caseína y aparecen varios péptidos X-Pro. Las prolidasas hidrolizan dipéptidos X-Pro (conteniendo residuos Pro C-terminales), tales como Leu-Pro, Phe-Pro, Ala-Pro y Val-Pro. En cambio, no hidrolizan Gly-Pro.

La **prolina-iminopeptidasa** de *L. lactis* es muy específica para di- y tripéptidos con un residuo de Pro N-terminal (Pro-X-(Y)). En cambio, no libera Pro a partir de tetrapéptidos o Pro pNA (Law y Haandrikman, 1997). Las tripeptidasas de

algunas cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* hidrolizan Pro-Gly-Gly pero no degradan péptidos con Pro- cuando se trata del penúltimo residuo (Tan y Konings, 1990).

Los péptidos derivados de la caseína serían degradados únicamente por endopeptidasas y aminopeptidasas. Sin embargo, sí se ha detectado actividad carboxipeptidasa en cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lb. casei*.

### **I.4.3.2. Actividades esterasa y lipasa de las bacterias lácticas**

Las esterasas hidrolizan los ésteres de alcoholes, de fenoles y de ácidos grasos, mientras que las lipasas están especializadas en el ataque de los triglicéridos en emulsión, es decir, de los triglicéridos insolubles (Huang y Dooley, 1976). Las lipasas de las bacterias lácticas hidrolizan preferentemente los triglicéridos esterificados con sustratos de cadena corta.

Las actividades lipolítica y esterolítica de las bacterias lácticas son, por lo general, bajas. Sin embargo, los bajos niveles de actividad lipolítica de las cepas que integran un cultivo iniciador pueden ser relevantes en el desarrollo del aroma de los quesos debido al bajo umbral de detección para los compuestos generados y a la extensa maduración experimentada por algunas variedades de quesos (Talon y Montel, 1994).

La mayor parte de las lipasas de las bacterias lácticas degradan los sustratos a temperaturas comprendidas entre 30°C y 40°C, si bien *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus* presentan un óptimo de actividad a 45°C y en *Lactobacillus plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dicha actividad se sitúa en torno a 50°C (El Soda y col., 1986c).

El pH óptimo para la actividad de las lipasas varía en función de la especie.

Las lipasas de los lactobacilos tienen actividad óptima a un pH próximo a la neutralidad. Los lactococos hidrolizan la tributirina en un rango de pH de 7,0 a 8,5. El pH óptimo para que *Streptococcus thermophilus* desarrolle su actividad lipolítica es aún más alcalino, en torno a 9,0. Por el contrario, la lipasa de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* es activa a pH 6,0-7,0 como la de los lactobacilos.

En general, la actividad esterasa es específica para especie e incluso puede ser específica para cepa. Las variaciones encontradas entre las actividades de las diferentes cepas explican los resultados derivados de los diferentes estudios realizados sobre esterasas y lipasas de bacterias lácticas y justifican la necesidad de seleccionar cultivos iniciadores destinados a la elaboración de quesos o para acelerar la maduración (Katz y col., 2003).

Los lactococos y lactobacilos muestran prioridad en la liberación de ácidos grasos de cadena corta (Delgado y col., 2009). En ambos grupos se han detectado lipasas intra y extracelulares. Si bien la acción intracelular requiere la autólisis de la bacteria.

Las esterasas de las bacterias lácticas hidrolizan preferentemente los sustratos esterificados con ácidos grasos de cadena corta, siendo específicas de diferentes sustratos según la especie y/o cepa de que se trate.

Diversos autores señalan que la actividad esterasa es principalmente intracelular pero se han encontrado esterasas ligadas a la pared celular en cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lb. helveticus* y en cepas de *Lactococcus* y de *Streptococcus thermophilus* (Gobbetti y col., 1996).

Por lo general, las bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*, aisladas de leche de oveja y de quesos muestran actividad esterasa intracelular preferentemente dirigida hacia los  $\alpha$  y  $\beta$  naftil derivados de 2 a 6 átomos de carbono.

Las esterasas de los lactococos hidrolizan rápidamente el naftil acetato y el naftil butirato.

Los lactobacilos presentan una actividad esterasa y lipasa más elevada que los lactococos (Gobbetti y col., 1996). Las cepas de lactobacilos heterofermentativos facultativos: *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* poseen un sistema esterasa más activo que los heterofermentadores *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum* (El Soda y col., 1986b). Dentro del grupo de las bacterias lácticas mesófilas la actividad esterasa citoplasmática es más elevada para cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lb. curvatus* y *Lb. brevis*. La hidrólisis se lleva a cabo preferentemente sobre los ésteres conteniendo ácidos grasos C4-C6 (El Soda y Ezzat, 1993; Collins y col., 2003).

Los lactobacilos termófilos tienen mayor actividad esterasa y lipasa que las especies mesófilas y la hidrólisis es mayor cuando los ácidos grasos son de cadena corta. Gobbetti y col. (1996) observaron que todas las cepas termófilas estudiadas hidrolizaban fuertemente el  $\beta$  naftil butirato. La hidrólisis preferente de los lactobacilos termófilos hacia los p nitrofenil derivados con ácidos grasos C2-C6 fue también descrita por El Soda y col. (1986a) y Khalid y Marth (1990). Estos autores también observaron que las cepas de *Lactobacillus fermentum*, *Lb. reuteri* y *Lb. acidophilus* mostraban elevada actividad sobre los sustratos  $\beta$  naftil ésteres con ácidos grasos C6-C8 y que sólo las cepas de *Lb. fermentum* eran muy activas sobre los ésteres con ácidos grasos C10-C14.

## **II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**





Este trabajo de investigación se planteó con el ánimo de complementar otro trabajo anteriormente realizado en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León acerca de la caracterización del queso de Armada, variedad sobado, un queso elaborado artesanalmente en el Norte de la provincia de León, a partir de leche de cabra o bien en ocasiones con mezcla de leche de vaca y cabra.

La finalidad de este trabajo de investigación es doble, por una parte, la obtención de un cultivo iniciador autóctono, constituido por la combinación de microorganismos aislados de esta variedad artesanal y seleccionados por su aptitud tecnológica. Por otra, impulsar la fabricación industrial de ésta y otras variedades artesanales de queso que se están elaborando actualmente con cultivos iniciadores comerciales de ámbito general para preservar sus características tradicionales.

La caracterización del queso de Armada incluyó por una parte, el estudio de la materia prima, tecnología de fabricación y del proceso bioquímico durante su maduración, y por otra, el estudio de la evolución de la microbiota presente a lo largo de su maduración, así como el aislamiento e identificación de cepas de los grupos microbianos más representativos. Concluidos estos primeros estudios restaba comprobar si las cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Armada, variedad sobado, podían jugar un papel diferencial respecto a los cultivos iniciadores comerciales en el desarrollo de las características típicas del queso de Armada y diseñar un cultivo iniciador constituido por aquellas cepas con un papel tecnológico más destacado que se podría emplear en la fabricación industrial de este queso y de otras variedades artesanales.

Los estudios acerca de la microbiota del queso de Armada han puesto de manifiesto que la microbiota láctica constituyó el grupo mayoritario durante la elaboración y maduración de este queso, siendo las especies dominantes *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lb. casei* subsp. *casei*. El predominio de *Geotrichum candidum* al inicio de la maduración puede tener también una importante repercusión en el transcurso de la maduración de este queso y en el desarrollo de sus características organolépticas.

Por consiguiente, el objetivo general que persigue el desarrollo de esta Tesis Doctoral es obtener un cultivo iniciador autóctono, constituido por "cepas autóctonas" del queso de Armada seleccionadas por su aptitud tecnológica.

La obtención de cepas autóctonas aisladas de la microbiota de la leche y los quesos artesanales y su posterior utilización como fermentos en la industrialización de estos quesos puede jugar un importante papel en la recuperación de la identidad de los productos artesanales. Además, la adición de cultivos iniciadores a la leche cruda puede actuar controlando la fermentación para que transcurra de modo adecuado y acelerar la desaparición de microorganismos patógenos como enterobacteriáceas y *Staphylococcus aureus* durante el transcurso de la maduración.

Las cepas "salvajes" obtenidas de los quesos artesanales y seleccionadas en base a sus características tecnológicas integrarán un cepario que ampliará la colección de bacterias lácticas disponibles para cultivos iniciadores. Estas cepas podrían tener también aplicación en la elaboración de productos lácteos probióticos y aquellas cepas con capacidad de producir bacteriocinas podrían emplearse incluso en el control de defectos y alteraciones de los quesos.

A continuación se indican los objetivos concretos que persigue esta Tesis Doctoral:

1. Caracterizar mediante técnicas genéticas las cepas de bacterias lácticas que van a constituir el material de estudio de este trabajo. Las cepas objeto de estudio fueron aisladas del queso de Armada, variedad sobado y están identificadas a nivel de especie según la metodología clásica.
2. Evaluar las características tecnológicas y las actividades enzimáticas de dichas cepas.
3. Seleccionar las cepas con mejores aptitudes tecnológicas para la elaboración de ésta y otras variedades de queso artesanales.

4. Establecer y mantener un cepario de bacterias lácticas de interés en la fabricación de quesos artesanales.
  
5. Fabricar en planta piloto varios lotes de queso de Armada, variedad sobado: uno de ellos con leche cruda, sin la adición de cultivos, otro con leche pasteurizada empleando un cultivo iniciador comercial de ámbito general y otros lotes con leche pasteurizada empleando diferentes combinaciones de las cepas seleccionadas.
  
6. Comparar desde el punto de vista microbiológico, químico y bioquímico, así como organoléptico las características de los diferentes quesos elaborados.
  
7. Seleccionar el cultivo iniciador que mejor haya reproducido las características típicas del queso de Armada artesanal.
  
8. Transferir los resultados de la investigación al sector industrial con vistas a la aplicación del cultivo iniciador obtenido en la industrialización de quesos artesanales.

### **III. PUBLICACIONES**



## **ARTÍCULO I**

**Estudio de las características tecnológicas de cepas de bacterias lácticas aisladas de un queso artesanal de cabra, el queso de Armada, variedad sobado**





# Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese)

M.A. Herreros, J.M. Fresno, M.J. González Prieto, M.E. Tornadijo\*

*Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, 24071 León, Spain*

Received 13 May 2002; accepted 22 February 2003

## Abstract

Thirty-one strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Armada cheese, Sobado variety, (eight strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, four strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, two strains of *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, two strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, two strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, five strains of *Lactobacillus plantarum*, six strains of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and two strains of *Lactobacillus brevis*) were screened for their acidifying capacity and enzymatic activity, that included the rapid API-ZYM system, the proteolytic activity, the amino-, di-, and carboxypeptidase activity and the caseinolytic activity. The strains of *L. lactis* subsp. *lactis* exhibited the highest acidifying and proteolytic activity. Lipase and esterase activity was practically non-existent for lactococci and lactobacilli; a certain esterase activity was observed among leuconostoc. The highest aminopeptidase activity was demonstrated by the cell-free extract (CFE) of some strains of *L. plantarum*, *L. casei* subsp. *casei* and *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. The CFEs of *L. lactis* subsp. *cremoris* and *L. lactis* subsp. *lactis* possessed carboxypeptidase and dipeptidase activities, at levels depending on the strain. Appreciable caseinolytic activity was detected for the CFE of *L. plantarum* and those some lactococci.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Technological characterization; Enzymatic activity; Lactic acid bacteria (LAB); Cheese

## 1. Introduction

There are several factors which influence the development of the organoleptic characteristics of cheese, including the type of milk, its microbiological quality, the technology used in making the cheese, the conditions of ripening, and others. However, the lactic acid bacteria (LAB) play a principal role in releasing specific compounds responsible for cheese flavour development.

The LAB carry out the initial acidification of the milk which assists in gelation. In fact, its ability to produce acid rapidly is probably the most important property of starter bacteria (Cogan et al., 1997). They also contribute indirectly, via acid production, to syneresis of the curd, the expulsion of the whey, the solubilization of the micellar calcium and, thus, to the texture of the cheese.

The LAB also contribute to the proteolysis of cheese, as they can degrade the products derived from the rennet action on the casein (peptides of high and low molecular mass). In fact, some strains have proteinases associated with the cell wall which preferably hydrolyse the casein, similar to endo- and exopeptidases. The free peptides of the casein are hydrolysed to smaller peptides and free amino acids by the peptidases from the interior of the cells.

Information on the contribution of LAB to the lipolysis during the ripening of the cheese is rather scarce. However, some species of LAB are able to hydrolyse milk fat or at least some triglycerids (Gobbetti, Fox, & Stepaniak, 1996). So lipases and esterases of starters and non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) (homo- and heterofermentative species of lactobacilli) can influence, to a greater or lesser extent, the development of cheese flavour.

Armada cheese is a Spanish variety manufactured from raw goats' milk, without addition of starter cultures, according to the traditional method as reported by Tornadijo, Fresno, Bernardo, Martín Sarmiento, and

\*Corresponding author. Tel.: +34-987-291850; fax: +34-987-291284.

E-mail address: [dhtmet@unileon.es](mailto:dhtmet@unileon.es) (M.E. Tornadijo).

Carballo (1995). The coagulation occurs by adding 15 mL of commercial calf rennet (strength 1 in 10,000) for each 100 L of milk; the curd is cut and then transferred to cheesecloths where the draining of whey takes place. After 48 h, the curd is submitted to a rigorous kneading operation, designated “sobado”, and hung in the cheesecloth for a further 72 h, after which it is kneaded again and hand-moulded to produce its characteristic square shape. Salting is carried out by adding dry salt during the kneading operations. The ripening process takes place in natural conditions (at a temperature of 10–15°C and a relative humidity of 70–80%, depending of the time of year).

The aim of this study is to evaluate the enzymatic activity of the LAB isolated from Armada cheese, and select the strains with interesting characteristics from a technological point of view, so that they can constitute a commercially viable culture for the manufacture of artisanal cheeses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains

The strains for the present work were selected from the LAB isolated throughout the manufacture and ripening process in four batches of Armada cheese (two ripened in Summer and two in Autumn). Milk, curd (6 h after being placed in the cheesecloth) and 1-, 2-, 4-, 8- and 16-week-old cheese samples were taken from each batch. From the M17 agar (Biokar Diagnostics, Beavais, France), MSE agar (Biokar) and Rogosa agar plates (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK), 10 colonies were isolated from each sampling point and from each medium, giving a total of 840 strains, which were identified at species level by means of physiological and biochemical tests (Tornadijo et al., 1995). One hundred and seventy-one strains were chosen from the 840 strains, so that each of the species present at most sampling times would be represented. The strains were tested for their acidifying capacity, proteolytic activity (hydrolysis of the casein in agar milk) and lipolytic activity (hydrolysis of Tween compounds), following the criteria reported by Núñez, Martínez Moreno, and Medina (1981), Requena, Peláez, and Desmazeaud (1991) and Menéndez, Centeno, Godínez, and Rodríguez Otero (1998), with the aim of further reducing the number of selected strains.

Thirty-one strains of LAB were finally selected and identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (eight strains), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (four strains), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (two strains), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (two strains), *Lactobacillus plantarum* (five strains), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (six strains) and *Lacto-*

*bacillus brevis* (two strains). These strains were screened for their acidifying, proteolytic and other enzymatic activities.

These strains, frozen at –30° in De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Oxoid) with glycerol at a level of 20 g 100 mL<sup>-1</sup>, were cultured in MRS broth at 30°C for 12–24 h before carrying out the different assays.

### 2.2. Acidifying activity

Acidifying activity of these strains was measured according to the International Dairy Federation (IDF) standard 306 (IDF, 1995).

The strains were subcultured in MRS broth at 30°C for 24 h. The microbial culture was inoculated at a level of 1 mL 100 mL<sup>-1</sup> in sterile skim power milk (reconstituted at 100 g L<sup>-1</sup>). Titratable acidity and pH were determined after 6, 12 and 24 h of incubation at 30°C.

### 2.3. Proteolytic activity

Proteolytic activity of whole cells in milk was determined by using the *O*-phthalaldehyde (OPA) spectrophotometric assay (Church, Swaisgood, Porter, & Catignani, 1983). This test is based on the reaction of the free  $\alpha$ -amino groups released by hydrolysis of the casein (after a 24 h period of incubation of the strains in the milk) with *O*-phthalaldehyde, in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol, to form a complex which strongly absorbs at 340 nm. The results were calculated from a calibration curve obtained from dilution of glycine in distilled water and were expressed in mM Gly L<sup>-1</sup> of milk.

### 2.4. Screening of enzymatic activities of whole cells by the API-ZYM assay

The enzymatic activity of the strains was evaluated using the API-ZYM system (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France).

*Leuconostoc* and lactobacilli were incubated in MRS broth and lactococci in Elliker broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 16 h at 30°C. The cultures were centrifuged at 7000g for 15 min at 4°C, and the sediment (whole cells) was resuspended in 2 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) until it reached an optical density of between a McFarland 5 and 6 standard, and inoculated in the microtubes of the API-ZYM strip at a level of 65  $\mu$ L for each cupule. The enzymatic activities tested for included: alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase and *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. The API-ZYM

strips were incubated at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  for 4 h and the enzyme activity was graded from 0 to 5 by comparing the colour developed within 5 min with the API-ZYM colour reaction chart (Durlu-Ozkaya, Xanthopoulos, Tunail, & Litopoulou-Tzanetaki, 2001). The results were expressed in nmol of hydrolysed substrate, from the intensity of the reactions obtained, in the range 0 (no activity) to 5 (40 or more nanomoles liberated), following to the manufacturer's instructions.

### 2.5. Preparation of cell fractions

Endocellular enzymatic activity was tested in a cell-free extract (CFE), which was obtained by disruption of the cells using ultrasonic treatment.

To obtain a preculture of microorganisms, each of the 31 selected strains were cultured in 5 mL of Elliker broth (lactococci) or 5 mL of MRS broth (lactobacilli and leuconostoc) and incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 18–24 h.

The technique described by Casla, Fontecha, Gómez, and Peláez (1995) was used to obtain a culture of microorganisms. The preculture in Elliker broth or in MRS broth was inoculated at a level  $1\text{ g } 100\text{ mL}^{-1}$  of fresh medium and incubated at  $30^\circ\text{C}$  until the cells reached the stationary phase (10–14 h for most of the strains). The cells were then centrifuged at  $8160g$  for 10 min at a temperature  $<4^\circ\text{C}$ .

The sediment, once dissolved in 2 mL of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.5), was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 1 h, in order to liberate the proteinases bound to the cell wall, and afterwards centrifuged at  $5000g$  for 20 min, according to the method of Requena, Peláez, and Fox (1993). The supernatant (with the spontaneously released wall-associated proteinases) was frozen, while the sediment was redissolved in 2 mL of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.5) and centrifuged again. Finally, the sediment was dissolved in 10 mL of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.0). The cells were disrupted by ultrasonic treatment (sonicator Labsonic 1510, Braun) at 100 W at intervals of 5 min over a 30 min period (time enough to break 90% of the cells). The temperature was maintained at  $<0^\circ\text{C}$  during the sonication treatment, using a mixture of ice, NaCl and ethanol. Then, following the recommendations of Casla et al. (1995), the cells were centrifuged at  $4000g$  for 14 min to obtain two fractions, one corresponding to the supernatant or endocellular fraction, and the other to the sediment, constituted by the cellular membrane and the cellular wall. In spite of we have to proceed with care, the possibility of contamination between the fractions should not be excluded. The supernatant was filtered using Millipore filters ( $0.22\text{ }\mu\text{m}$  aperture; Millipore Corporation, Bedford, USA) to obtain the CFE which was stored frozen until determining its enzymatic activity.

### 2.6. Determination of protein concentration

The protein concentration in the CFE was determined according to the method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall (1951).

### 2.7. Aminopeptidase activity

The aminopeptidase activity of the CFE was determined by the method of Requena et al. (1993), based on spectrophotometric measurement at  $30^\circ\text{C}$  of hydrolysis rates of *p*-nitroanilide substrates (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA): L-alanine *p*-nitroanilide (Ala-pNA), L-lysine *p*-nitroanilide (Lys-pNA), L-leucine *p*-nitroanilide (Leu-pNA) and L-proline *p*-nitroanilide (Pro-pNA). In the current study, the hydrolysis was carried out at pH 7.0 because the aminopeptidase activity observed by Laan, Eng Tan, Bruinenberg, Limsowtiin, and Broome (1998) was highest at pH 7.0 and decreased below 6.5. The reaction mixture contained 3.8 mL of 1 mmol of substrate in 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.0) and 0.2 mL of enzyme solution. Absorbance at 410 nm was measured in a spectrophotometer (Kontron mod. Uvicon 810) at  $30^\circ\text{C}$  at intervals of 1 min over a 15 min period.

One unit of aminopeptidase activity was defined as the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.001 units at 410 nm after incubation for 1 min. Aminopeptidase specific activity was expressed as the number of activity units per mg of protein in the CFE.

### 2.8. Carboxypeptidase and dipeptidase activities

Carboxypeptidase activity was determined by the method of El Soda and Desmazeaud (1982), using as substrate *N*-carbobenzoxy (CBZ)-Leu (Benzoyloxycarbonyl-glycyl-Leu) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). One unit of activity was defined as the amount of enzyme that produced an increase in absorbance at 570 nm of 0.01 units in 15 min.

The specific carboxy and dipeptidase activity was expressed as number of enzymatic activity units  $\text{mg}^{-1}$  protein in the CFE.

Dipeptidase activity was determined by the Cadmium-ninhydrine method (Doi, Shibata, & Matoba, 1981), using the following dipeptides as substrates (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA): Leu-Leu, Tur-Leu, Ala-Ala, Leu-Gly, Ala-Phe, Lys-Leu and Phe-Ala. The amino acids released by hydrolysis were estimated by measuring absorbance at 507 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that produced an increase in absorbance at 507 nm of 0.01 units in 15 min.

## 2.9. Caseinolytic activity

The caseinolytic activity of the CFE was determined by measuring absorbance of light at 280 nm at zero time and after 1 h incubation at 30°C while continuously shaking (Gómez, Peláez, & Martín-Hernández, 1988). The reaction mixture consisted of 150 µL of enzymatic extract and 1350 µL of substrate solution (Hammersten casein at a level of 2 g mL<sup>-1</sup>; Merck, Merck KgaA, Darmstadt, Germany) in 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0), sterilized at 90°C for 20 min.

One unit of caseinolytic activity was defined as the amount of enzyme required to give an increase in absorbance of 0.01 units at 280 nm after a hydrolysis period of 1 h. Specific activity was expressed as the number of caseinolytic activity units mg<sup>-1</sup> protein in the CFE.

## 2.10. Statistical analysis

ANOVA analysis (Statistic 5.1 computer program; Statsoft, Tulsa, OK, USA) was carried out to determine statistical differences ( $p < 0.05$ ) between the strains of a single bacterial species with respect to the values of acidification and enzyme activity. The strains were tested twice for acidifying activity and three times for each enzymatic activity.

The data relating to other enzyme activities, as monitored using the API-ZYM assay, were not statistically analysed, but are included in the results as observations.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Acidifying activity

The strains of *L. lactis* subsp. *lactis* were those which showed the highest acidifying capacity, developing an acidity of 0.40 g 100 mL<sup>-1</sup> lactic acid after 6 h and 0.65–0.70 g 100 mL<sup>-1</sup> after 12 h (Table 1). After 24 h, the pH of the culture medium decreased to values lower than 4.2 and the acidity reached values around 0.75–0.80 g 100 mL<sup>-1</sup>. Basically, most the significant differences ( $p < 0.05$ ) with respect to acidifying capacity were observed after 6 h. All the strains had a similar behaviour after 24 h, although the TAUL 95, TAUL 119 and TAUL 1292 strains showed the numerically highest acidifying capacity. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* showed an acidifying capacity similar to that of *L. lactis* subsp. *lactis* strains throughout the incubation time. *L. lactis* subsp. *cremoris* showed a relatively low acidifying capacity, with average values of acidity of 0.20–0.30 g 100 mL<sup>-1</sup> after 6 h. The strains of this species showed significant differences ( $p < 0.05$ ) after

12 and 24 h, and TAUL 283 was the strain with the highest acidifying capacity after 24 h (0.80 g 100 mL<sup>-1</sup>).

*Leuconostoc* had a significantly lower ( $p < 0.05$ ) acidifying capacity than *L. lactis* subsp. *lactis* and developed an acidity of 0.40–0.65 g 100 mL<sup>-1</sup> lactic acid after 24 h incubation. In fact, the capacity of *leuconostoc* to metabolize lactose is much lower than those of lactococci (Garvie, 1984). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed only among the strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, after 12 h.

The acidification developed by strains of *L. plantarum* and *L. brevis* was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than that produced by most of the strains of *L. casei* subsp. *casei* after 24 h. Some strains of *L. casei* subsp. *casei* (TAUL 1522 and TAUL 1580), after 24 h of incubation, were developing acidity as rapidly as some lactococci (see Table 1). Lactobacilli metabolize lactose more slowly than lactococci but the final acid production can be similar to, or even higher than, that of the lactococci.

The strains of *L. lactis* subsp. *lactis* isolated from Armada cheese showed an acidifying activity after 6 h of incubation similar to that detected for lactococci isolated from Arzúa-Ulloa cheese and goats' milk cheeses by Menéndez et al. (1998) and Requena et al. (1991), respectively.

Núñez et al. (1981) and Requena et al. (1991) suggested that strains of *L. lactis* subsp. *lactis* whose acidifying capacity gave an acidity  $> 0.25$  g 100 mL<sup>-1</sup> of lactic acid after 6 h of incubation could be used as starter culture in cheese manufacture.

### 3.2. Proteolytic activity

Strains of *L. lactis* subsp. *lactis* showed significant differences ( $p < 0.05$ ) with respect to proteolytic activity (Table 2). TAUL 95 and TAUL 1292 were the strains that showed the highest release of amino groups (expressed as mM Gly L<sup>-1</sup> of milk), giving values of 2.8 mM Gly L<sup>-1</sup> at 24 h, which were higher than those reported for lactococci strains by Mayo, Hardisson, and Braña (1990) and by Centeno, Cepeda, and Rodríguez Otero (1996). All strains of *L. lactis* subsp. *cremoris* showed significant differences ( $p < 0.05$ ) with respect to proteolytic activity, and TAUL 283 was the most proteolytic strain (2.069 mM Gly L<sup>-1</sup>). The strains of *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* showed a proteolytic activity inferior to that of most of the strains of *L. lactis* subsp. *lactis*, but similar to that of *L. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 283).

The highest proteolytic activities detected in *L. plantarum*, *L. brevis* and *L. casei* subsp. *casei* were 0.78, 0.91 and 0.61 mM Gly L<sup>-1</sup>, respectively.

The results shown in Table 2 indicate that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) among the values of proteolytic activity for *leuconostoc* strains. The

Table 1  
Acidifying activity of 31 strains of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese<sup>a</sup>

Strain	Incubation time (h)					
	6		12		24	
TAUL <sup>b</sup>	pH	Titrateable acidity <sup>c</sup>	pH	Titrateable acidity <sup>c</sup>	pH	Titrateable acidity <sup>c</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>						
TAUL 71	5.50 <sup>f</sup>	0.34 <sup>fg</sup>	5.02 <sup>d</sup>	0.43 <sup>g</sup>	4.14	0.74
TAUL 78	5.37 <sup>fg</sup>	0.40 <sup>ef</sup>	4.41 <sup>f</sup>	0.71 <sup>d</sup>	4.13	0.78
TAUL 95	5.27 <sup>g</sup>	0.42 <sup>de</sup>	4.39 <sup>f</sup>	0.67 <sup>de</sup>	4.18	0.82
TAUL 101	5.35 <sup>fg</sup>	0.42 <sup>de</sup>	4.45 <sup>f</sup>	0.61 <sup>ef</sup>	4.16	0.72
TAUL 119	5.31 <sup>g</sup>	0.48 <sup>d</sup>	4.44 <sup>f</sup>	0.69 <sup>de</sup>	4.14	0.80
TAUL 221	6.56 <sup>d</sup>	0.16 <sup>g</sup>	5.13 <sup>d</sup>	0.54 <sup>f</sup>	4.20	0.76
TAUL 238	5.51 <sup>f</sup>	0.41 <sup>def</sup>	4.45 <sup>f</sup>	0.63 <sup>def</sup>	4.13	0.76
TAUL 1292	5.93 <sup>e</sup>	0.30 <sup>g</sup>	4.73 <sup>e</sup>	0.56 <sup>f</sup>	4.18	0.82
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>						
TAUL 216	5.90 <sup>e</sup>	0.30	5.21 <sup>f</sup>	0.41 <sup>e</sup>	4.74 <sup>f</sup>	0.55 <sup>e</sup>
TAUL 283	5.94 <sup>e</sup>	0.29	4.86 <sup>g</sup>	0.54 <sup>d</sup>	4.22 <sup>g</sup>	0.81 <sup>d</sup>
TAUL 1239	6.46 <sup>d</sup>	0.21	5.8 <sup>d</sup>	0.39 <sup>e</sup>	5.81 <sup>d</sup>	0.38 <sup>f</sup>
TAUL 1351	6.46 <sup>d</sup>	0.21	5.58 <sup>e</sup>	0.36 <sup>e</sup>	5.64 <sup>e</sup>	0.34 <sup>f</sup>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>						
TAUL 12	5.78	0.33	4.54	0.61	4.17	0.79
TAUL 13	5.70	0.32	4.64	0.62	4.19	0.78
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>						
TAUL 1368	6.20	0.26	5.53 <sup>e</sup>	0.45 <sup>d</sup>	4.96	0.65
TAUL 1795	6.30	0.22	5.91 <sup>d</sup>	0.29 <sup>e</sup>	5.13	0.61
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>						
TAUL 34	6.25	0.24	5.80	0.34	5.26	0.51
TAUL 1798	6.12	0.26	5.71	0.40	5.02	0.41
<i>Lactobacillus plantarum</i>						
TAUL 1521	6.26 <sup>f</sup>	0.21	5.83 <sup>e</sup>	0.29 <sup>de</sup>	5.32 <sup>f</sup>	0.42 <sup>d</sup>
TAUL 1539	6.34 <sup>ef</sup>	0.20	5.89 <sup>de</sup>	0.29 <sup>de</sup>	5.37 <sup>ef</sup>	0.40 <sup>de</sup>
TAUL 1588	6.40 <sup>de</sup>	0.20	5.70 <sup>f</sup>	0.31 <sup>d</sup>	5.30 <sup>f</sup>	0.45 <sup>d</sup>
TAUL 1736	6.47 <sup>d</sup>	0.20	5.92 <sup>d</sup>	0.27 <sup>de</sup>	5.44 <sup>e</sup>	0.39 <sup>de</sup>
TAUL 1765	6.37 <sup>e</sup>	0.19	5.94 <sup>d</sup>	0.26 <sup>e</sup>	5.68 <sup>d</sup>	0.33 <sup>e</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>						
TAUL 68	6.34 <sup>e</sup>	0.23	5.89 <sup>e</sup>	0.29 <sup>d</sup>	5.41 <sup>e</sup>	0.39 <sup>d</sup>
TAUL 1267	6.51 <sup>d</sup>	0.19	6.47 <sup>d</sup>	0.20 <sup>e</sup>	6.52 <sup>d</sup>	0.19 <sup>e</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>						
TAUL 1506	6.41	0.19	6.00	0.26	4.69 <sup>e</sup>	0.55 <sup>f</sup>
TAUL 1508	6.44	0.18	6.02	0.26	4.51 <sup>f</sup>	0.64 <sup>e</sup>
TAUL 1522	6.40	0.19	5.97	0.27	4.23 <sup>g</sup>	0.76 <sup>d</sup>
TAUL 1580	6.40	0.18	5.97	0.27	4.20 <sup>g</sup>	0.72 <sup>de</sup>
TAUL 1694	6.32	0.21	6.00	0.25	5.20 <sup>d</sup>	0.40 <sup>g</sup>
TAUL 1699	6.30	0.22	5.96	0.27	5.11 <sup>d</sup>	0.45 <sup>g</sup>

Superscripts are not present for some values because there are no significant differences ( $p < 0.05$ ) between bacterial strains of the same species in relation to the activity tested.

ND = not detected.

<sup>a</sup> Values presented are means of two replicate evaluations for each bacterial strain.

<sup>b</sup> TAUL: Tecnología de los Alimentos, Universidad de León.

<sup>c</sup> Titrateable acidity expressed as g 100 mL<sup>-1</sup> lactic acid.

<sup>d-h</sup> Values corresponding to different bacterial strains of the same species not showing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

proteolytic activity of this species was inferior to that of the majority of lactococci, but higher than that of the lactobacilli. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

(TAUL 34) showed the highest proteolytic activity (1.394 mm Gly L<sup>-1</sup>), and *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (TAUL 1795), the lowest (0.649 mm Gly L<sup>-1</sup>).



Table 2  
Proteolytic activity<sup>a</sup> (average ± standard error) of whole cells of 31 strains of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese<sup>b</sup>

Strain	Proteolytic activity (at 24 h) mM Gly L <sup>-1</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
TAUL 71	0.255 ± 0.114 <sup>e</sup>
TAUL 78	2.501 ± 0.078 <sup>def</sup>
TAUL 95	2.811 ± 0.223 <sup>cd</sup>
TAUL 101	2.389 ± 0.307 <sup>ef</sup>
TAUL 119	2.660 ± 0.173 <sup>cde</sup>
TAUL 221	2.262 ± 0.199 <sup>f</sup>
TAUL 238	2.306 ± 0.257 <sup>f</sup>
TAUL 1292	2.847 ± 0.138 <sup>c</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
TAUL 216	ND <sup>f</sup>
TAUL 283	2.079 ± 0.018 <sup>c</sup>
TAUL 1239	0.298 ± 0.068 <sup>d</sup>
TAUL 1351	0.219 ± 0.012 <sup>e</sup>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>	
TAUL 12	1.907 ± 0.149
TAUL 13	2.142 ± 0.115
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	
TAUL 1368	1.083 ± 0.136 <sup>c</sup>
TAUL 1795	0.649 ± 0.060 <sup>d</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	
TAUL 34	1.394 ± 0.069 <sup>c</sup>
TAUL 1798	0.780 ± 0.138 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
TAUL 1521	0.764 ± 0.107 <sup>c</sup>
TAUL 1539	0.780 ± 0.021 <sup>c</sup>
TAUL 1588	0.756 ± 0.178 <sup>c</sup>
TAUL 1736	0.426 ± 0.042 <sup>d</sup>
TAUL 1765	0.474 ± 0.045 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	
TAUL 68	0.908 ± 0.102 <sup>c</sup>
TAUL 1267	0.462 ± 0.061 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	
TAUL 1506	0.607 ± 0.059 <sup>c</sup>
TAUL 1508	0.171 ± 0.000 <sup>def</sup>
TAUL 1522	0.189 ± 0.008 <sup>de</sup>
TAUL 1580	0.231 ± 0.118 <sup>d</sup>
TAUL 1694	0.081 ± 0.008 <sup>ef</sup>
TAUL 1699	0.039 ± 0.000 <sup>f</sup>

Superscripts are not present for some values because there are no significant differences ( $p < 0.05$ ) between bacterial strains of the same species in relation to the activity tested.

ND = not detected.

<sup>a</sup>Proteolytic activity measured using the *O*-phthalaldehyde (OPA) spectrophotometric assay and expressed as mM Gly L<sup>-1</sup> of milk.

<sup>b</sup>Values presented are means of three replicate evaluations for each bacterial strain.

<sup>c–f</sup>Values corresponding to different bacterial strains of the same species not showing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. API ZYM

The enzymatic activities of the 31 strains of LAB isolated from Armada cheese, as evaluated by the semiquantitative API-ZYM system, are shown in Table 3. The high leucine arylamidase activity of some strains of *L. lactis* subsp. *lactis* was similar to that reported by Requena et al. (1991) and by Menéndez, Hermida, Godínez, Centeno, and Rodríguez Otero (2001). However, valine and cystine arylamidase activities were very low or absent in some strains of *Lactococcus*. These results concur with those of several authors (Tzanetakis & Litopoulou-Tzanetaki, 1989; Requena et al., 1991; Menéndez et al., 2001). Only one strain of *L. Lactis* subsp. *cremoris* showed definite valine arylamidase activity (around 20 nmol hydrolysed substrate). Leucine arylamidase activity was high in some strains of *L. plantarum* and *L. casei* subsp. *casei* (approximate values of 20–30 nmol of hydrolysed substrate). Requena et al. (1991) and Menéndez et al. (2001) obtained similar results. Moreover, considerable valine arylamidase activity (approximate values of 25 to ≥40 nmol of hydrolysed substrate) was exhibited by some strains of *L. casei* subsp. *casei*. Aminopeptidases could be an important tool in favouring the liberation of amino acids that would then favour the development of desirable flavours in cheese. These enzymes can also have a debittering effect during cheese ripening (El Soda, Macedo, & Olson, 1991).

The esterase, esterase–lipase and lipase activities were very low, or not detected, for most strains of lactococci, a trend similar to that reported by Menéndez et al. (2001) and Requena et al. (1991). Lipase and esterase–lipase activities were not detected, or were very low, in leuconostoc strains. On the other hand, definite esterase activity was observed (around 10 nmol of hydrolysed substrate) for strains of *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. No lipase, esterase–lipase or esterase activities were detected for the strains of *L. plantarum*. Some strains of *L. casei* subsp. *casei* exhibited a definite esterase and esterase–lipase activities (around 10–20 nmol of hydrolysed substrate); however, the lipase activity was very low.

Requena et al. (1991) did not detect lipase or esterase activities in *L. plantarum* strains. However, Menéndez et al. (2001) detected weak lipase and esterase activities (around 10 nmol) in most strains of lactobacilli tested. It is noteworthy that certain strains of lactobacilli can contribute to cheese lipolysis when releasing intracellular lipolytic enzymes upon autolysis (Khalid & Marth, 1990). These enzymes contribute to an increase in the concentrations of free fatty acids in cheese. Low concentrations of free fatty acids contribute to the flavour of cheese, particularly when they are correctly balanced with the products of proteolysis or other reactions (McSweeney & Sousa, 2000).

Table 3

Enzymatic activity<sup>a</sup> (approximate values), detected using API-ZYM system, of whole cells of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese

Strain	Enzymes tested <sup>b</sup>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>																	
TAUL 71	5	0	5	0	10	0	5	0	<5	10	0	0	0	0	0	0	0
TAUL 78	0	0	5	0	10	0	5	0	0	30	5	0	0	0	0	0	0
TAUL 95	0	0	5	0	30	<5	5	0	<5	30	5	0	0	0	0	0	0
TAUL 101	5	<5	5	0	≥40	5	10	0	5	30	5	0	0	0	0	0	0
TAUL 119	<5	<5	5	0	20	<5	5	0	<5	20	5	0	0	0	0	0	0
TAUL 221	5	5–10	5	0	5	0	0	0	0	20	5	5	30	0	0	0	0
TAUL 238	5	5	5	0	30	0	5	0	5	≥40	5	0	0	0	0	0	0
TAUL 1292	<5	<5	<5	0	≥40	5	10	0	5	30	5–10	0	0	0	0	0	5
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>																	
TAUL 216	5	10	5	0	20	5	5–10	0	10	20	5	0	0	0	<5	5	0
TAUL 283	0	0	0	0	20	0	<5	0	<5	30	5	0	0	0	<5	<5	0
TAUL 1239	0	5	5	0	5	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0
TAUL 1351	0	0	10	10	0	20	0	0	0	0	10	20	0	0	0	0	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>																	
TAUL 12	<5	<5	5	0	10	0	5	0	0	20	5	0	0	0	0	0	0
TAUL 13	0	0	<5	0	10	0	5	0	0	30	5	0	0	0	0	0	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>																	
TAUL 1368	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5–10	0–5	0	10	0	0	0	0
TAUL 1795	0	5	<5	0	0	0	0	0	5	<5	0	5	20	0	0	0	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>																	
TAUL 34	0	10	5	0	5	0	0	0	0	5–10	5	5	30–40	0	5	0	0
TAUL 1798	0	10	<5	0	<5	0	0	0	5	<5	0	20	20–30	0	5	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>																	
TAUL 1521	0	0	0	0	20–30	10	0	0	0	5	5–10	0	20	0	0	20–30	10
TAUL 1539	0	0	0	0	20–30	5–10	0	0	0	5	5	0	30–40	0	10	20	10
TAUL 1588	0	0	0	0	20–30	5–10	0	0	0	5	5	0	≥40	0	10	20	10
TAUL 1736	0	0	0	0	20–30	5–10	5	0	0	20	5	0	30	0	0	20	10
TAUL 1765	0	0	0	0	10–20	5	10	0	0	10	5	0	≥40	0	0	30–40	5
<i>Lactobacillus brevis</i>																	
TAUL 68	0	0	0	0	20–30	5–10	0	0	0	10	5	0	30	0	20	20	20
TAUL 1267	0	5	5	0	≥40	20	10	0	0	30	30	10	≥40	20	≥40	20	0
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>																	
TAUL 1506	5	10–20	10	<5	≥40	20–30	5–10	<5	5	20	<5	<5	≥40	0	20	<5	0
TAUL 1508	5	20	20	<5	≥40	20–30	5–10	<5	5	20	20	<5	≥40	<5	20	<5	0
TAUL 1522	5	10–20	10	<5	≥40	20–30	5–10	<5	5	20	0	<5	≥40	0	30	<5	0
TAUL 1580	5	10	5	<5	30–40	≥40	5	<5	<5	10	20–30	<5	≥40	<5	20	<5	0
TAUL 1694	0	<5	0	0	20	10	<5	0	0	<5	0	0	30	0	20	20	10–20
TAUL 1699	0	<5	<5	<5	20–30	10–20	<5	0	0	<5	0	<5	30	<5	20	10–20	20

<sup>a</sup>Enzymatic activity (approximate values) expressed as nmol of substrate hydrolysed.<sup>b</sup>Enzymes tested: 1—Alkaline phosphatase; 2—Esterase (C4); 3—Esterase lipase (C8); 4—Lipase (C14); 5—Leucine arylamidase; 6—Valine arylamidase; 7—Cystine arylamidase; 8—Trypsin; 9— $\alpha$ -Chymotrypsin; 10—Acid phosphatase; 11—Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; 12— $\alpha$ -galactosidase; 13— $\beta$ -galactosidase; 14— $\beta$ -glucuronidase; 15— $\alpha$ -glucosidase; 16— $\beta$ -glucosidase; 17—N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase.

In agreement with the results of authors (Menéndez et al., 2001; Tzanetakis & Litopoulou-Tzanetaki, 1989), alkaline phosphate activity was weak or not detected among lactococci. In contrast, acid phosphatase activity was generally high in lactococci strains (reaching approximate values of 30 to ≥40 nmol of hydrolysed substrate), with the exception of two strains of *L. lactis*

subsp. *cremoris*. Acid phosphatase is an essential enzyme for the hydrolysis of phosphopeptides (Fox & McSweeney, 1996).

From the results in Table 3 we can see that most of the species tested, apart from *Lactococcus*, showed a high  $\beta$ -galactosidase. Only one strain of *L. lactis* subsp. *lactis* showed activity. The absence of such enzymatic

activity in lactococci is in agreement with the results obtained by Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki (1989), Requena et al. (1991) and Menéndez et al. (2001) and may be due to the fact that phospho- $\beta$ -galactosidase-galactohydrolase is the predominant carbohydrate in *Lactococcus* (Marshall & Law, 1984). However,  $\beta$ -galactosidase is the main enzyme by which homofermentative lactobacilli transform lactose into lactic acid (Menéndez, Centeno, Godínez, & Rodríguez Otero, 1999). In the fact, most of the strains of *L. plantarum* showed a high  $\beta$ -galactosidase activity (39 to  $\geq 40$  nmol hydrolysed substrate). Williams and Banks (1997) also detected  $\beta$ -galactosidase activity in strains of NSLAB. The interest in  $\beta$ -galactosidase activity lies in the fact that  $\kappa$ -casein is glycosylated and the release of these sugars may provide a potential energy source to the microorganisms. The presence of sugars may also impede proteolytic enzyme activity and their removal would also facilitate more effective proteolysis (Williams & Banks, 1997).

### 3.4. Aminopeptidase activity

Table 4 shows the results obtained for the aminopeptidase activity of CFEs of the 31 strains tested using *p*-nitroanilide substrates (Ala-pNA, Lys-pNA, Leu-pNA and Pro-pNA). The amino acids released from peptides derived from hydrolysis of casein can contribute directly or indirectly to the development of flavour during ripening of cheeses (Williams & Banks, 1997; Williams, Felipe, & Banks, 1998).

The proteolytic system of LAB comprises a cell-wall-associated proteinase, several intracellular peptidases, aminopeptidases with different specificities, and they also possess peptide and amino acid transport system (Kunji, Mierau, Hagting, Poolman, & Konings, 1996). However, no aminopeptidase activity could be detected in 15 min at 30°C for any of the CFEs of *L. lactis* subsp. *lactis* using the substrates Ala-, Lys-, Leu- and Pro-pNA. Macedo, Vieira, Poças, and Malcata (2000) reported that Ala-, Leu- and Lys-aminopeptidase activities of CFE of strains of *L. lactis* subsp. *lactis* were low and that the Pro-aminopeptidase activity was absent. Requena et al. (1991, 1993) detected low Ala- and Leu-aminopeptidase activities for strains of *L. lactis* subsp. *lactis*; lys-aminopeptidase activity was higher.

In the CFE of *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, definite Lys-, Leu- and Pro-aminopeptidase activities could be detected. Pro- and Leu-aminopeptidase activities was also detected among the CFEs of *L. lactis* subsp. *cremoris*. Pro-aminopeptidase activity in CFE of *L. lactis* subsp. *cremoris* was also observed by Lee, Lo, and Warthesen (1996).

The CFE of *L. plantarum* (TAUL 1539) and *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (TAUL 1795) exhibited the highest aminopeptidase activity towards

Table 4

Aminopeptidase specific activity<sup>a</sup> of crude cell-free extract of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese<sup>b</sup>

Strain	Substrate p-NA			
	Ala p-NA	Lys p-NA	Pro p-NA	Leu p-NA
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>				
TAUL 71	ND	ND	ND	ND
TAUL 78	ND	ND	ND	ND
TAUL 95	ND	ND	ND	ND
TAUL 101	ND	ND	ND	ND
TAUL 119	ND	ND	ND	ND
TAUL 221	ND	ND	ND	ND
TAUL 238	ND	ND	ND	ND
TAUL 1292	ND	ND	ND	ND
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>				
TAUL 216	ND	ND	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
TAUL 283	ND	ND	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
TAUL 1239	ND	ND	161.05 <sup>c</sup>	48.32 <sup>c</sup>
TAUL 1351	ND	ND	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>				
TAUL 12	ND	ND <sup>d</sup>	146.23 <sup>c</sup>	21.93 <sup>c</sup>
TAUL 13	ND	15.80 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>				
TAUL 1368	ND <sup>d</sup>	21.77 <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>	10.16 <sup>d</sup>
TAUL 1795	177.34 <sup>c</sup>	614.77 <sup>c</sup>	10.64 <sup>c</sup>	248.27 <sup>c</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>				
TAUL 34	26.15 <sup>c</sup>	139.48 <sup>c</sup>	ND	34.87 <sup>c</sup>
TAUL 1798	ND <sup>d</sup>	61.17 <sup>d</sup>	ND	20.39 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
TAUL 1521	27.15 <sup>g</sup>	6.79 <sup>g</sup>	ND <sup>d</sup>	81.45 <sup>g</sup>
TAUL 1539	186.66 <sup>c</sup>	601.47 <sup>c</sup>	10.37 <sup>c</sup>	269.63 <sup>c</sup>
TAUL 1588	87.87 <sup>c</sup>	329.50 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	164.75 <sup>c</sup>
TAUL 1736	119.90 <sup>d</sup>	423.18 <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>	190.43 <sup>d</sup>
TAUL 1765	49.92 <sup>f</sup>	137.29 <sup>f</sup>	ND <sup>d</sup>	112.33 <sup>f</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>				
TAUL 68	81.70 <sup>c</sup>	310.46 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	147.06 <sup>c</sup>
TAUL 1267	31.82 <sup>d</sup>	42.43 <sup>d</sup>	6.36 <sup>c</sup>	116.68 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>				
TAUL 1506	38.18 <sup>d</sup>	64.79 <sup>d</sup>	4.63 <sup>ef</sup>	134.21 <sup>c</sup>
TAUL 1508	39.47 <sup>d</sup>	65.44 <sup>cd</sup>	5.19 <sup>de</sup>	130.35 <sup>c</sup>
TAUL 1522	43.87 <sup>c</sup>	72.14 <sup>c</sup>	5.85 <sup>c</sup>	127.70 <sup>cd</sup>
TAUL 1580	39.91 <sup>d</sup>	76.89 <sup>c</sup>	4.87 <sup>c</sup>	122.64 <sup>d</sup>
TAUL 1694	15.91 <sup>c</sup>	47.73 <sup>g</sup>	ND <sup>g</sup>	19.09 <sup>e</sup>
TAUL 1699	17.29 <sup>c</sup>	53.03 <sup>g</sup>	ND <sup>g</sup>	20.75 <sup>e</sup>

Superscripts are not present for some values because there are no significant differences ( $p < 0.05$ ) between bacterial strains of the same species in relation to the aminopeptidase activity tested.

ND = not detected in 15 min at 30°C by using a cell-free extract which contained a certain amount of protein.

<sup>a</sup> Aminopeptidase specific activity expressed as number of activity units mg<sup>-1</sup> protein of cell-free extract. One unit of aminopeptidase activity was the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.001 units at 410 nm in 1 min.

<sup>b</sup> Values presented are means of three replicate evaluations for each bacterial strain.

<sup>c-g</sup> Values corresponding to different bacterial strains of the same species not showing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).



Table 5

Dipeptidase, carboxypeptidase and caseinolytic specific activities of crude cell-free extract of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese<sup>a</sup>

Strain	Dipeptidase activity <sup>b</sup>							Carboxypeptidase activity <sup>c</sup>	Caseinolytic activity <sup>d</sup>
	Leu-Leu	Tyr-Leu	Ala-Ala	Leu-Gly	Ala-Phe	Lys-Leu	Phe-Ala		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>									
TAUL 71	411.22 <sup>g</sup>	653.12 <sup>g</sup>	328.29 <sup>i</sup>	442.32 <sup>f</sup>	732.60 <sup>fg</sup>	487.25 <sup>g</sup>	359.39 <sup>fg</sup>	168.46 <sup>f</sup>	181.42 <sup>f</sup>
TAUL 78	573.25 <sup>f</sup>	709.02 <sup>f</sup>	429.94 <sup>h</sup>	758.05 <sup>e</sup>	524.22 <sup>i</sup>	603.42 <sup>f</sup>	331.88 <sup>gh</sup>	ND <sup>i</sup>	243.25 <sup>e</sup>
TAUL 95	456.29 <sup>g</sup>	438.16 <sup>h</sup>	637.60 <sup>f</sup>	450.25 <sup>f</sup>	695.01 <sup>g</sup>	864.23 <sup>c</sup>	338.44 <sup>g</sup>	4.53 <sup>i</sup>	169.22 <sup>f</sup>
TAUL 101	433.66 <sup>g</sup>	298.53 <sup>i</sup>	493.36 <sup>g</sup>	295.39 <sup>h</sup>	578.21 <sup>h</sup>	248.25 <sup>i</sup>	314.24 <sup>h</sup>	33.00 <sup>h</sup>	252.97 <sup>c</sup>
TAUL 119	440.87 <sup>g</sup>	704.81 <sup>f</sup>	446.67 <sup>gh</sup>	333.55 <sup>g</sup>	524.98 <sup>i</sup>	330.65 <sup>h</sup>	98.62 <sup>j</sup>	30.45 <sup>h</sup>	175.48 <sup>f</sup>
TAUL 221	187.09 <sup>h</sup>	ND <sup>j</sup>	124.73 <sup>j</sup>	31.18 <sup>i</sup>	ND <sup>j</sup>	187.09 <sup>j</sup>	155.91 <sup>i</sup>	467.73 <sup>c</sup>	ND <sup>g</sup>
TAUL 238	847.90 <sup>e</sup>	436.89 <sup>h</sup>	760.52 <sup>e</sup>	430.42 <sup>f</sup>	770.23 <sup>f</sup>	592.23 <sup>f</sup>	440.13 <sup>c</sup>	38.83 <sup>h</sup>	236.25 <sup>e</sup>
TAUL 1292	450.25 <sup>g</sup>	818.90 <sup>e</sup>	601.34 <sup>f</sup>	435.14 <sup>f</sup>	867.25 <sup>e</sup>	803.80 <sup>e</sup>	377.72 <sup>f</sup>	72.52 <sup>g</sup>	164.69 <sup>f</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>									
TAUL 216	362.34 <sup>f</sup>	355.02 <sup>f</sup>	812.52 <sup>e</sup>	409.92 <sup>f</sup>	838.14 <sup>e</sup>	797.88 <sup>e</sup>	270.84 <sup>f</sup>	74.11 <sup>f</sup>	164.70 <sup>e</sup>
TAUL 283	340.33 <sup>f</sup>	ND <sup>h</sup>	594.38 <sup>f</sup>	560.83 <sup>f</sup>	819.67 <sup>e</sup>	603.97 <sup>f</sup>	220.50 <sup>f</sup>	ND <sup>g</sup>	172.56 <sup>e</sup>
TAUL 1239	4414.95 <sup>e</sup>	446.65 <sup>e</sup>	316.90 <sup>g</sup>	3736.39 <sup>e</sup>	777.34 <sup>e</sup>	107.37 <sup>g</sup>	2147.35 <sup>e</sup>	ND <sup>g</sup>	167.49 <sup>e</sup>
TAUL 1351	ND <sup>g</sup>	310.08 <sup>g</sup>	ND <sup>h</sup>	155.04 <sup>g</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>h</sup>	ND <sup>g</sup>	1395.35 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>									
TAUL 12	4284.57 <sup>e</sup>	316.83	3265.82 <sup>e</sup>	3938.49 <sup>e</sup>	2368.94 <sup>e</sup>	92.61 <sup>f</sup>	2929.49 <sup>e</sup>	ND	272.96 <sup>f</sup>
TAUL 13	625.05 <sup>f</sup>	298.48	632.08 <sup>f</sup>	495.13 <sup>f</sup>	474.06 <sup>f</sup>	793.61 <sup>e</sup>	291.46 <sup>f</sup>	ND	377.49 <sup>e</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>									
TAUL 1368	150.96 <sup>f</sup>	56.13 <sup>f</sup>	201.28 <sup>e</sup>	98.71 <sup>e</sup>	174.19 <sup>f</sup>	247.73 <sup>c</sup>	241.92 <sup>f</sup>	71.13 <sup>c</sup>	127.74 <sup>f</sup>
TAUL 1795	203.35 <sup>e</sup>	165.52 <sup>e</sup>	97.73 <sup>f</sup>	156.06 <sup>f</sup>	220.69 <sup>e</sup>	37.83 <sup>f</sup>	550.14 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>	320.79 <sup>e</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>									
TAUL 34	48.82 <sup>f</sup>	58.12 <sup>f</sup>	176.68 <sup>f</sup>	39.52 <sup>f</sup>	55.79 <sup>f</sup>	41.85 <sup>f</sup>	72.07 <sup>f</sup>	31.38 <sup>e</sup>	256.88
TAUL 1798	135.93 <sup>e</sup>	135.93 <sup>e</sup>	301.76 <sup>e</sup>	231.08 <sup>e</sup>	394.19 <sup>e</sup>	320.79 <sup>e</sup>	119.62 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>	274.57
<i>Lactobacillus plantarum</i>									
TAUL 1521	56.11 <sup>h</sup>	72.40 <sup>h</sup>	104.98 <sup>fg</sup>	148.43 <sup>fg</sup>	95.93 <sup>h</sup>	16.29 <sup>i</sup>	365.63 <sup>f</sup>	ND <sup>g</sup>	282.37 <sup>g</sup>
TAUL 1539	34.57 <sup>h</sup>	161.78 <sup>f</sup>	114.76 <sup>f</sup>	117.53 <sup>h</sup>	134.12 <sup>g</sup>	73.28 <sup>f</sup>	351.20 <sup>f</sup>	ND <sup>g</sup>	362.96 <sup>f</sup>
TAUL 1588	228.46 <sup>g</sup>	124.48 <sup>g</sup>	93.73 <sup>gh</sup>	155.23 <sup>f</sup>	371.97 <sup>e</sup>	43.93 <sup>h</sup>	371.97 <sup>f</sup>	24.16 <sup>f</sup>	392.48 <sup>e</sup>
TAUL 1736	404.37 <sup>e</sup>	306.57 <sup>e</sup>	302.81 <sup>e</sup>	400.61 <sup>e</sup>	242.62 <sup>f</sup>	56.42 <sup>g</sup>	466.44 <sup>e</sup>	22.57 <sup>f</sup>	345.13 <sup>f</sup>
TAUL 1765	264.59 <sup>f</sup>	311.18 <sup>e</sup>	76.55 <sup>h</sup>	131.46 <sup>gh</sup>	151.43 <sup>g</sup>	103.17 <sup>e</sup>	174.73 <sup>g</sup>	28.71 <sup>e</sup>	313.68 <sup>g</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>									
TAUL 68	318.08 <sup>e</sup>	209.15	141.61 <sup>f</sup>	87.15	244.01 <sup>e</sup>	52.29	457.52 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>	247.28 <sup>e</sup>
TAUL 1267	155.57 <sup>f</sup>	224.87	288.51 <sup>e</sup>	100.41	181.03 <sup>f</sup>	63.64	263.06 <sup>f</sup>	89.10 <sup>e</sup>	174.66 <sup>f</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>									
TAUL 1506	9.10 <sup>h</sup>	7.71 <sup>i</sup>	43.35 <sup>g</sup>	13.88 <sup>gh</sup>	31.93 <sup>f</sup>	7.40 <sup>g</sup>	41.65 <sup>g</sup>	ND <sup>h</sup>	22.60 <sup>i</sup>
TAUL 1508	27.97 <sup>g</sup>	22.44 <sup>g</sup>	34.90 <sup>h</sup>	16.34 <sup>g</sup>	44.32 <sup>e</sup>	9.14 <sup>f</sup>	32.27 <sup>h</sup>	10.28 <sup>e</sup>	37.67 <sup>g</sup>
TAUL 1522	7.93 <sup>h</sup>	32.62 <sup>f</sup>	52.77 <sup>f</sup>	16.38 <sup>g</sup>	43.02 <sup>e</sup>	6.37 <sup>gh</sup>	19.37 <sup>i</sup>	ND <sup>h</sup>	41.53 <sup>f</sup>
TAUL 1580	8.57 <sup>h</sup>	18.17 <sup>h</sup>	65.93 <sup>e</sup>	12.59 <sup>h</sup>	23.36 <sup>g</sup>	4.93 <sup>i</sup>	20.63 <sup>i</sup>	7.88 <sup>f</sup>	47.24 <sup>e</sup>
TAUL 1694	46.39 <sup>f</sup>	43.84 <sup>e</sup>	50.63 <sup>f</sup>	55.44 <sup>e</sup>	31.68 <sup>f</sup>	6.22 <sup>h</sup>	50.07 <sup>f</sup>	1.70 <sup>g</sup>	27.79 <sup>h</sup>
TAUL 1699	51.50 <sup>e</sup>	29.67 <sup>f</sup>	32.90 <sup>h</sup>	48.58 <sup>f</sup>	21.21 <sup>g</sup>	16.14 <sup>e</sup>	97.15 <sup>e</sup>	ND <sup>h</sup>	24.75 <sup>hi</sup>

Superscripts are not present for some values because there are no significant differences ( $p < 0.05$ ) between bacterial strains of the same species in relation to the activity tested.

ND = not detected in 15 min (dipeptidase and carboxypeptidase activities) and in 1 h (caseinolytic activity) at 30°C by using a cell-free extract which contained a certain amount of protein.

<sup>a</sup> Values presented are means of three replicate evaluations for each bacterial strain.

<sup>b</sup> Dipeptidase specific activity expressed as units of enzymatic activity  $\text{mg}^{-1}$  protein. One unit of dipeptidase activity was the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.01 units at 505 nm in 15 min.

<sup>c</sup> Carboxypeptidase specific activity expressed as units of enzymatic activity  $\text{mg}^{-1}$  protein. One unit of carboxypeptidase activity was the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.01 units at 570 nm in 15 min.

<sup>d</sup> Caseinolytic activity expressed as units of enzymatic activity  $\text{mg}^{-1}$  protein. One unit of caseinolytic activity was defined as the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.01 units at 280 nm in 1 h.

<sup>e-j</sup> Values corresponding to different bacterial strains of the same species not showing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Ala-, Lys- and Leu-*p*-nitroanilide derivatives, with the Lys- and Leu-aminopeptidase activities being especially high (see Table 4). All strains showed significant differences with respect to aminopeptidase activity. The highest aminopeptidase activity of CFEs from *L. casei* subsp. *casei* was observed with the substrates Lys- and Leu-*p*-nitroanilide, except in TAUL 1694 and TAUL 1699, which showed significant differences ( $p < 0.05$ ) with the other strains. Macedo et al. (2000) also detected high Leu- and Lys-aminopeptidase activities for strains of *Lactobacillus* and *Leuconostoc*.

The proteolytic system of NSLAB is not completely known yet. However, recent studies proved the presence of more than one type of aminopeptidase with different specificities (Williams et al., 1998). Williams and Banks (1997) observed that the highest aminopeptidase activity in most NSLAB strains was towards substrates containing a basic amino acid (i.e. lysine or arginine).

### 3.5. Dipeptidase and carboxypeptidase activity

The results for the specific dipeptidase and carboxypeptidase activities of CFEs of 31 strains are shown in Table 5. The CFE of *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (TAUL 12) and *L. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) showed high dipeptidase activity towards the dipeptides Leu-Leu, Leu-Gly and Phe-Ala. Moreover, strain TAUL 12 was able to hydrolyse the dipeptide Ala-Phe.

Carboxypeptidase activity of CFEs of the LAB tested was generally lower than the corresponding dipeptidase activity, except for the CFE of *Lactococcus* strains TAUL 221 and TAUL 1351. Macedo et al. (2000) also detected carboxypeptidase activity in *L. lactis* subsp. *lactis*. Carboxypeptidase activity seems to be extremely rare in LAB (Tan, Poolman, & Komings, 1993). In fact, Baankreis and Exterkate (1991) and Fox and McSweeney (1996) suggest that carboxypeptidase activity is an atypical property of *Lactococcus* spp. in commercial starter cultures.

Each CFE of *Leuconostoc* exhibited different dipeptidase activity and the carboxypeptidase activity was either very low or absent. Macedo et al. (2000) observed carboxypeptidase activity in the CFE of *Leuconostoc mesenteroides*, while such activity was not observed by El-Shafei, El Soda and Ezzat (1990) and El-Soda et al. (1991).

The dipeptidase activity of the CFE of *L. casei* subsp. *casei* was less than that observed in CFE of *L. plantarum* and *L. brevis*. Carboxypeptidase activity was either absent or very low among lactobacilli. Williams and Banks (1997) did not detect carboxypeptidase activity in any of the lysates of NSLAB isolated from Cheddar cheese.

### 3.6. Caseinolytic activity

The CFEs of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* showed high or moderate caseinolytic activities; however, higher values were obtained for the CFE of *L. plantarum* (see Table 5). Caseinolytic activity was also high in the CFE of *L. brevis*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* and *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Broome, Hickey, Briggs, and Jones (1991) reported that proteolytic activity of certain species and strains of *Lactobacillus* is very high. Some strains of NSLAB could therefore play an important role in the ripening of cheese.

The lowest caseinolytic activities were obtained for the CFEs of *L. casei* subsp. *casei* strains. Requena et al. (1993) also reported low values of caseinolytic activity for the CFE of *L. casei* subsp. *casei*. Perhaps a higher activity could be detected in the cell-wall membrane fraction (Casla et al., 1995; Requena et al., 1993).

## 4. Conclusion

Some strains of LAB, as used in this work, could constitute a mixed culture whose cheese-making characteristics could later be evaluated in the making of several batches of cheese at pilot scale under controlled conditions. At first we would select *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TAUL 95 and TAUL 1292, because of their desirable acidifying capacity and proteolytic activities. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* TAUL 12 would also be included for its high dipeptidase activity and its capacity to produce aroma compounds. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (i.e. TAUL 1351 and TAUL 1239) would be included for their high carboxypeptidase and dipeptidase activities, respectively. As suggested by Williams et al. (1998), some strains of *Lactobacillus plantarum* with high aminopeptidase and  $\beta$ -galactosidase activity could be used as an adjunct to complement the activities present in the starter and influence flavour development during cheese ripening.

## Acknowledgements

The authors acknowledge financial support for this work from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (Project AGL2001-0092-CO2-01).

## References

- Baankreis, R., & Exterkate, F. A. (1991). Characterisation of a peptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP that hydrolyses dipeptides and tripeptides containing proline or hydrophobic

- residues as the amino-terminal amino acid. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(4), 317–323.
- Broome, M. C., Hickey, M. W., Briggs, D. R., & Jones, G. P. (1991). Peptidase activity of non-starter lactobacilli. *Australian Journal of Dairy Technology*, 46(1), 19–23.
- Casla, D., Fontecha, J., Gómez, R., & Peláez, C. (1995). The effects of freezing and frozen storage of ewe's milk cheese on the viability and proteolytic activity of lactococci used as starter. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 200(1), 59–63.
- Centeno, J. A., Cepeda, A., & Rodríguez Otero, J. L. (1996). Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cow's milk cheese. *International Dairy Journal*, 6(1), 65–78.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using *O*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandez, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M. C., & Rodríguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64(3), 409–421.
- Doi, E., Shibata, D., & Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, 118(1), 173–184.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 861–870.
- El Shafei, H., El Soda, M., & Ezzat, N. (1990). The peptide hydrolase system of the *Leuconostoc*. *Journal of Food Protection*, 53(2), 165–169.
- El Soda, M., & Desmazeaud, M. J. (1982). Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*: I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(10), 1181–1188.
- El Soda, M., Macedo, A., & Olson, N. (1991). Aminopeptidase and dipeptidyl aminopeptidase activities of several cheese related microorganisms. *Milchwissenschaft*, 46(4), 223–226.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12(4), 457–509.
- Garvie, E. I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. In T. Bergan (Ed.), *Methods in microbiology*, Vol. 16 (pp. 147–178). London, UK: Academic Press.
- Gobbetti, M., Fox, P. F., & Stepaniak, L. (1996). Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, 8(2), 127–135.
- Gómez, R., Peláez, C., & Martín-Hernández, M. C. (1988). Enzyme activity in Spanish goat's cheeses. *Food Chemistry*, 28(2), 159–165.
- IDF. (1995). *IDF guideline-determination of acidifying activity of dairy cultures*. Bulletin IDF 306 (pp. 34–36). Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Khalid, N. M., & Marth, E. H. (1990). Lactobacilli. Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A review. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2669–2684.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. In G. Verema, J. H. J. & Huits in't Veld, & J. Jugenholz (Eds.), *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications* (pp. 91–125). Dordrecht, Holland: Kluwer Academic Publishers.
- Laan, H., Eng Tan, S., Bruinenberg, P., Limsowitii, G., & Broome, M. (1998). Aminopeptidase activities of starter and non-starter lactic acid bacteria under simulated Cheddar cheese ripening conditions. *International Dairy Journal*, 8(4), 267–274.
- Lee, K. D., Lo, C. G., & Warthesen, J. J. (1996). Removal of bitterness from the bitter peptides extracted from Cheddar cheese with peptidases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK 11. *Journal of Dairy Science*, 79(9), 1521–1528.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Macedo, A. C., Vieira, M., Poças, R., & Malcata, F. X. (2000). Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 10(11), 769–774.
- McSweeney, P. L. H., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80(3), 293–324.
- Marshall, V. M. E., & Law, B. A. (1984). The physiology and growth of dairy lactic acid. In F. L. Davies, & B. A. Law (Eds.), *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* (pp. 67–98). London, UK: Elsevier Applied Science Publishers.
- Mayo, B., Hardisson, C., & Braña, A. F. (1990). Characterization of wild strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Cabrales cheese. *Journal of Dairy Research*, 57(1), 125–134.
- Menéndez, S., Centeno, J. A., Godínez, R., & Rodríguez Otero, J. L. (1998). Propiedades tecnológicas y actividades enzimáticas de cepas de *Lactococcus lactis* aisladas del queso Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, 296, 71–76.
- Menéndez, S., Centeno, J. A., Godínez, R., & Rodríguez Otero, J. L. (1999). Caracterización de cepas de lactobacilos aisladas del queso Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, 299, 51–56.
- Menéndez, S., Hermida, M., Godínez, R., Centeno, J. A., & Rodríguez Otero, J. L. (2001). Actividades enzimáticas de algunas cepas con interés tecnológico aisladas del queso Tetilla elaborado con leche cruda. *Alimentaria*, 326, 49–55.
- Núñez, M., Martínez Moreno, J. L., & Medina, M. (1981). Testing of *Streptococcus lactis* as starter for manufacture of Manchego-type cheese. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie ganadera*, 12, 65–72.
- Requena, T., Peláez, C., & Desmazeaud, M. J. (1991). Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semi-hard goats' cheese. *Journal of Dairy Research*, 58(1), 137–145.
- Requena, T., Peláez, C., & Fox, P. F. (1993). Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196(4), 351–355.
- Tan, P. S. T., Poolman, B., & Komings, W. N. (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 269–286.
- Tornadizo, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Martín Sarmiento, R., & Carballo, J. (1995). Armada Sobado goat's raw milk cheese: Microbiological changes throughout ripening. *Lait*, 75(6), 551–570.
- Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (1989). Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. *Microbiology, Aliments and Nutrition*, 7(1), 73–80.
- Williams, A. G., & Banks, J. M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International of Dairy Journal*, 7(12), 763–774.
- Williams, A. G., Felipe, X., & Banks, J. M. (1998). Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobacillus* spp and non starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *International of Dairy Journal*, 8(4), 255–266.

## **ARTÍCULO II**

**Estudio de la actividad esterolítica de las bacterias ácido lácticas aisladas del queso de Armada, variedad sobado**



# Esterolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat milk cheese)

By M.A. HERREROS<sup>1</sup>, J.M. FRESNO<sup>1</sup>, H. SANDOVAL<sup>2</sup>, J.M. CASTRO<sup>2</sup> and M.E. TORNADIJO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, 24071 León, Spain. E-mail : dhtmet@unileon.es

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, 24007 León, Spain

---

Esterase activity of the cell-free extract (CFE) of 31 strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Armada cheese, Sobado variety (8 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 4 strains of *L. lactis* subsp. *cremoris*, 2 *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, 2 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, 2 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, 5 *Lactobacillus plantarum*, 2 *Lb. brevis*, and 6 *Lb. casei* subsp. *casei*) was evaluated using  $\beta$ -naphthyl-substrates ( $\beta$ -naphthyl-butyrate,  $\beta$ -naphthyl-caprylate,  $\beta$ -naphthyl-myristate and  $\beta$ -naphthyl-esterate). In general, LAB preferentially hydrolyzed esters of short-chain fatty acids, although considerable inter-species and inter-strains variations were observed. The majority of the *Lactococcus* and *Leuconostoc* strains showed the highest esterase activity on  $\beta$ -naphthyl substrates of C4 and C8 fatty acids and not hydrolyzed ester derivatives; *L. lactis* subsp. *cremoris* 1351 was the most esterolytic strain. The strains of *Lb. plantarum* preferentially hydrolyzed  $\beta$ -naphthyl derivatives of C8 and C14 fatty acids. The strains of *Lb. brevis* exhibited greater esterase activity on C4 and C8 fatty acids than those of *Lb. plantarum*, the level of esterase activity of *Lb. casei* subsp. *casei* was the lowest.

## Esterolytische Aktivität von aus Armada-Käse, einem spanischen Ziegenkäse, isolierten Milchsäurebakterien

Die Esteraseaktivität der zellfreien Extrakte von 31 Milchsäurebakterienstämmen (LAB) aus Armada-Käse, Sobado-Art (8 Stämme von *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 4 von *L. lactis* subsp. *cremoris*, 2 von *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, 2 von *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, 2 von *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, 5 von *Lactobacillus plantarum*, 2 von *Lb. brevis*, and 6 von *Lb. casei* subsp. *casei*) wurden mit  $\beta$ -Naphthyl-Substraten ( $\beta$ -Naphthylbutyrat,  $\beta$ -Naphthylcaprylat,  $\beta$ -Naphthylmyristat und  $\beta$ -Naphthylesterat) untersucht. Im allgemeinen hydrolysierte LAB Ester von kurzkettigen Fettsäuren, obwohl beträchtliche Interspecies- und Interstamm-Variationen beobachtet wurden. Die Mehrzahl der *Lactococcus*- und *Leuconostoc*-Stämme zeigten die höchste Esteraseaktivität bei  $\beta$ -Naphthyl-Substraten der C4- und C8-Fettsäuren, und kein Stamm hydrolysierte Esteratderivate. Dabei war *L. lactis* subsp. *cremoris* 1351 der am stärksten esterolytische Stamm. Die *Lb. plantarum*-Stämme hydrolysierten vor allem  $\beta$ -Naphthyl-Derivate von C8- und C14-Fettsäuren. Die *Lb. brevis*-Stämme wiesen eine höhere Esteraseaktivität bei C4- und C8-Fettsäuren als *Lb. plantarum*, und die Aktivität von *Lb. casei* subsp. *casei* war am niedrigsten unter allen geprüften Stämmen.

**56 Lactic acid bacteria** (esterolytic activity)  
**Goat milk cheese** (lactic acid bacteria)

**56 Milchsäurebakterien** (esterolytische Aktivität)  
**Ziegenmilchkäse** (Milchsäurebakterien)

---

## 1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) play a central role in the cheese ripening. They transform the lactose present in the milk into lactic acid and into small amounts of carbon dioxide, acetic acid, acetaldehyde, acetoin and diacetyl. Microbial enzymes also have a part in the breaking down, and subsequent transformation of the degradation products, of the protein, fat and carbohydrate components present in the curd (20).

Craft or artisanal cheeses may constitute a source of strains with physiological or biochemical properties of technological interest. In fact, their acidifying capacity and proteolytic or lipolytic activities may contribute to the development of the aroma and texture of the cheeses (3). The use of starter cultures, made up of strains of LAB coming from such cheeses and selected on the basis of their enzyme activity profile might be applicable to the large-scale or industrial manufacture of traditional-style cheeses by contributing towards guaranteeing their hygienic and technological quality.

This paper is the second in a series of two, the first being HERREROS *et al.* (8) relating to the technological characterization of LAB isolated from Armada cheese, Sobado variety, a Spanish craft-made goat cheese.

Acidifying, proteolytic and other enzymatic activities, evaluated using the API-ZYM system, were determined from whole cells of the strains. Aminopeptidase, dipeptidase, carboxypeptidase and caseinolytic activities were tested in a cell-free extract (CFE) obtained by cell disruption (8).

Lipolytic and esterolytic activities are also important technological properties of LAB because they may improve the quality and/or accelerate the maturing of cheeses and hence influence the development of their flavour (7). Furthermore, the final content of free fatty acids in Armada cheese is greater than that described for the majority of the goat, sheep or cow cheeses studied by other authors (6).

Lipolysis is caused by the action of microbial lipases and esterases (12). Esterases hydrolyse carboxylic ester bonds, while lipases hydrolyse triglycerides of fatty acids (9). Lipolytic and esterolytic activities of LAB are generally low. However, the low levels of lipolytic activity of the strains in a starter may be of importance in the development of the aroma of these cheeses, thanks to the low detection thresholds for lipolytic compounds and to the lengthy ripening undergone by some cheeses (2).

The aim of this work was to evaluate the esterolytic activity of the cell-free extract (CFE) of 31 LAB strains isolated from Armada cheese, Sobado variety, with a view to evaluating the impact on the ripening of the cheeses that would arise from incorporating esterolytic strains in starter cultures for cheesemaking.

## 2. Materials and methods

### 2.1 *Bacterial strains and preparation of cell fractions*

The technology for the craft production of the Sobado variety of Armada cheese, together with the procedure for isolating, identifying and selecting the strains of lactic bacteria screened for their technological characteristics were previously described by TORNADIJO *et al.* (19) and HERREROS *et al.* (8).

The following 31 strains were tested: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (8 strains), *L. lactis* subsp. *cremoris* (4 strains), *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* (2 strains), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (2 strains), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (2 strains), *Lactobacillus plantarum* (5 strains), *Lb. brevis* (2 strains), *Lb. casei* subsp. *casei* (6 strains). The storage and culturing conditions for these LAB strains, as also the procedure for obtaining a cell-free extract (CFE) by cell disruption using ultrasound treatment were previously described by HERREROS *et al.* (8).

### 2.2 *Esterase activity*

The esterase activity of the cell-free extracts (CFE) was determined by the method described by CASTILLO *et al.* (1) using the following  $\beta$ -naphthyl substrates (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA):  $\beta$ -naphthyl butyrate (C4),  $\beta$ -naphthyl caprylate (C8),  $\beta$ -naphthyl myristate (C14) and  $\beta$ -naphthyl esterate (C18). This method is based on the spectrophotometric measurement at room temperature of hydrolysis rates of  $\beta$ -naphthyl derivatives. The  $\beta$ -naphthol released by hy-

drolysis was estimated by measuring absorbance at 560 nm.

The reaction mixture, containing 400  $\mu$ l of 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 40  $\mu$ l of  $\beta$ -naphthyl substrate (5 mM in methanol for C4-C12 derivatives and 15 mM in acetone for C14-C18 substrates), and 200  $\mu$ l of enzyme solution was incubated at 37 °C for 4 h. Its colour was enhanced by the addition of 720  $\mu$ l of Fast Garnet GBC (Sigma) preparation (0.05 mg/ml in 10% sodium dodecyl sulphate). After mixing and centrifuging at 11,000 g for 5 min, the absorbance of the supernatant was measured at 560 nm in a spectrophotometer (Kontron mod. Uvicon 810) at room temperature.

The results were calculated from two calibration curves, obtained from dilution of  $\beta$ -naphthol in both of the solvents used (methanol and acetone). Finally, esterase activity was expressed as  $\mu$ moles of  $\beta$ -naphthol released per minute and per mg of protein.

### 2.3 Determination of protein concentration

The protein concentration in the CFE was determined according to the method described by LOWRY *et al.* (15).

### 2.4 Statistical analysis

ANOVA analysis (Statistic 5.1 computer program; Statsoft, Tulsa, Oklahoma) was carried out to determine statistical differences ( $p < 0.01$ ) between the strains of a single bacterial species with respect to the values of esterolytic activity. The strains were tested twice for this enzymatic activity.

## 3. Results and discussion

Table 1 shows the average values obtained for the esterase activity of CFE of the 31 strains of LAB tested using  $\beta$ -naphthyl substrates:  $\beta$ -naphthyl butyrate,  $\beta$ -naphthyl caprylate,  $\beta$ -naphthyl myristate and  $\beta$ -naphthyl esterate.

Among the lactococci, *L. lactis* subsp. *lactis* strain 221, *L. lactis* subsp. *cremoris* strain 1239 and *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* strain 12 showed the highest hydrolytic activity on  $\beta$ -naphthyl butyrate and  $\beta$ -naphthyl caprylate. These strains did not exhibit hydrolytic activity on  $\beta$ -naphthyl esterate (Table 1). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain 1351 also showed high esterase activity on  $\beta$ -naphthyl myristate and  $\beta$ -naphthyl esterate. In accordance with several authors (1, 11, 16, 20) the hydrolysis of shorter chain fatty acid naphthyl derivatives (C4 and C8) was detected in more strains than with esterified long-chain fatty acids (C14 and C18). This preference seems to be similar to the highly esterospesific activity of pregastric esterases by the sn-3 position of milk-fat triglycerides (13).

HERREROS *et al.* (8) reported that the esterase activity determined by API-ZYM system was very low, or not detected for the majority of the strains of LAB tested. However, the esterolytic activity of the CFE of the lactococci and leuconostoc strains isolated from Armada cheese was considerable, in particular for strain 1351 which showed very high enzyme activity for all the substrates tested. Hence, it is possible to surmise that there is significant intracellular esterase activity. In fact, several authors (4, 12, 14) reported that the esterase activity of LAB is mainly intracellular. Other authors found



cell-wall-bound esterases in lactobacilli strains (5, 17) and lactococci strains (2). On the basis of research carried out by other authors (12), it may be supposed that intracellular lipases and esterases released upon autolysis of cells will contribute more to the development of flavour in the cheeses than viable cells.

It was also possible to detect esterolytic activity in *Leuconostoc* strains, principally directed towards the  $\beta$ -naphthyl derivatives C4 and C8 (Table 1). In fact, some studies show esterolytic activity by leuconostoc greater than that of the other strains of LAB isolated (18). Moreover, 2 strains of this genus also demonstrated some hydrolytic activity on  $\beta$ -naphthyl derivatives C18.

The most lipolytic strains of *Lb. plantarum* presented values for  $\beta$ -naphthol liberated of around 90  $\mu$ moles per minute per milligram of protein when butyrate was the substrate esterified and between 122 and 140  $\mu$ moles/min/mg protein when this was caprylate and myristate, respectively (Table 1). In accordance with these results, MACEDO *et al.* (16) reported that the esterolytic activity of *Lb. plantarum* strains on  $\beta$ -naphthyl caprylate was higher than on the other substrates tested.

*Lactobacillus brevis* showed greater hydrolytic activity on C4 and C8 substrates than homofermentative lactobacilli. In contrast, on C14 the esterase activity of *Lb. brevis* was similar to that of some strains of *L. plantarum*.

Esterase activity of *Lb. casei* subsp. *casei* strains was low on the  $\beta$ -naphthyl substrates used. The strains of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* preferentially hydrolyzed the  $\beta$ -naphthyl derivatives with shorter carbon-chain lengths (C4 and C8). CASTILLO *et al.* (1) reported the preference of this species for  $\beta$ -naphthyl esters of short-chain fatty acids (C4-C8).

No esterase activity was detected on  $\beta$ -naphthyl ester for the strains of lactobacilli tested, except *Lactobacillus plantarum* 1521 strain and *Lb. casei* subsp. *casei* 1699 strain (Table 1).

In general, the esterolytic activity of lactococci strains isolated from Armada cheese was higher than that of the lactobacilli strains. These results are in accordance with those reported by other authors (16).

The statistical analysis allowed inter-species and inter-strain variations in esterolytic activity for the strains tested to be highlighted (Table 1), these being like those observed by other authors (20).

#### 4. Conclusions

The microbial esterases released principally short-chain fatty acids which, even at low concentrations, could contribute to development of the cheese flavor. On the basis of the results obtained in the present work and those reported by HERREROS *et al.* (8) it would be possible to pick out, as well as *L. lactis* subsp. *lactis* TAUL 95 and TAUL 1292, the strain TAUL 221, on the grounds of its high esterolytic activity. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* TAUL 12, selected for its high dipeptidase activity and its capacity to produce aromatic compounds also exhibited considerable esterolytic activity. *L. lactis* subsp. *cremoris* TAUL 1351 and TAUL 1239, selected by HERREROS *et al.* (8) for their carboxypeptidase and dipeptidase activities, respectively, also showed high esterolytic activity, especially the TAUL 1351 strain.

The esterolytic activity noted for several strains of lactobacilli (non-starter LAB) and the results obtained by HERREROS *et al.* (8) in respect of their acidifying, proteolytic and other enzymatic activities, suggest that lactobacilli isolated from Armada cheese could well play an important role in developing of the flavour of this variety. In fact, KHALID and MARTH (12) reported that the homofermentative *Lb. casei* and *Lb. plantarum* generally improved the flavour of cheeses.

#### Acknowledgements

The financial support for this work was provided by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (Project AGL2001-0092-CO2-01).

#### 5. References

- (1) CASTILLO, I., REQUENA, T., FERNÁNDEZ DE PALENCIA, P., FONTECHA, J., GOBBETTI, M. J. Appl. Microbiol. **86** (4) 653–659 (1999)
- (2) CROW, V.L., HOLLAND, R., PRITCHARD, G.G., COOL-BEAR, T.: Int. Dairy J. **4** (8) 723–742 (1994)
- (3) DURLU-OZKAYA, F., XANTHOPOULOS, V., TUNAIL, N., LITOPOULOU TZANETAKI, E.: J. Appl. Microbiol. **91** (5) 861–870 (2001)
- (4) EL SODA, M., KORAYEM, M., EZZAT, N.: Milchwissenschaft **41** (6) 353–355 (1986)
- (5) EZZAT, N., EL SODA, M., EL SHAFEI, H., OLSON, N.F.: Food Chem. **48** (1) 19–23 (1993)
- (6) FRESNO, J.M., TORNADIJO, M.E., CARBALLO, J., BERNARDO, A., GONZÁLEZ-PRIETO, J.: J. Sci. Food Agr. **75** (2) 148–154 (1997)
- (7) GOBBETTI, M., FOX, P.F., STEPANIAK, L.: Ital. J. Food Sci. **8** (2) 127–135 (1996)
- (8) HERREROS, M.A., FRESNO, J.M., GONZÁLEZ PRIETO, M.J., TORNADIJO, M.E.: Int. Dairy J. **13** (6) 469–479 (2003)
- (9) HUANG, H.T., DOOLEY, J.G.: Biotechnol. Bioeng. **18** 909 (1976)
- (10) KAMALY, K.M., MARTH, E.H.: J. Dairy Sci. **72** (8) 1945–1966 (1989)
- (11) KATZ, M., MEDINA, R., GONZÁLEZ, S., OLIVER, G.: J. Food Protect. **65** (12) 1997–2001 (2002)
- (12) KHALID, N.M., MARTH, E.H.: J. Dairy Sci. **73** (10) 2669–2684 (1990)
- (13) KWAK, H.S., JEON, I.J., PERNG, S.K.: J. Food Sci. **54** (6) 1559–1564 (1989)
- (14) LEE, S.Y., LEE, B.H.: J. Food Sci. **55** (1) 119–122, 126 (1990)
- (15) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: J. Biol. Chem. **193** 265–275 (1951)
- (16) MACEDO, A.C., TAVARES, T.G., MALCATA, F.X. Food Chem. **81** (3) 379–381 (2003)
- (17) MORICHI, T., SHARPE, M.E., REITER, D.: J. Gen. Microbiol. **53** 405 (1968)
- (18) PÉREZ, G., CARDELL, E., ZÁRATE, V.: Int. J. Food Sci. Tech. **38** (5) 537–546 (2003)
- (19) TORNADIJO, M.E., FRESNO, J.M., BERNARDO, A., MARTÍN SARMIENTO, R., CARBALLO, J.: Lait **75** (6) 551–570 (1995)
- (20) WILLIAMS, A.G., BANKS, J.M.: Int. Dairy J. **7** (12) 763–774 (1997)

**Table 1: Esterolytic activity<sup>a</sup> of crude cell-free extract of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese<sup>b</sup>**

Strain	TAUL <sup>c</sup>	β-Naphthyl substrate			β-Naphthyl esterate
		β-Naphthyl butyrate	β-Naphthyl caprylate	β-Naphthyl myristate	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	TAUL 71	175.858 <sup>f</sup>	170.081 <sup>e</sup>	141.950 <sup>g</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 78	195.465 <sup>e</sup>	166.354 <sup>f</sup>	187.040 <sup>d</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 95	198.970 <sup>e</sup>	152.887 <sup>g</sup>	138.340 <sup>h</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 101	156.677 <sup>g</sup>	148.772 <sup>h</sup>	146.220 <sup>f</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 119	152.321 <sup>g</sup>	141.264 <sup>i</sup>	124.400 <sup>i</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 221	980.536 <sup>d</sup>	973.229 <sup>d</sup>	ND <sup>j</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 238	192.557 <sup>e</sup>	126.871 <sup>j</sup>	155.390 <sup>e</sup>	120.905 <sup>d</sup>
	TAUL 1292	172.057 <sup>f</sup>	154.776 <sup>g</sup>	148.305 <sup>f</sup>	ND <sup>e</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	TAUL 216	242.393 <sup>f</sup>	276.552 <sup>f</sup>	153.210 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 283	216.532 <sup>f</sup>	188.745 <sup>g</sup>	200.430 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 1239	624.674 <sup>e</sup>	654.132 <sup>e</sup>	258.620 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 1351	9575.209 <sup>d</sup>	9560.701 <sup>d</sup>	10566.580 <sup>d</sup>	9754.140 <sup>d</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>	TAUL 12	480.814 <sup>d</sup>	263.447 <sup>d</sup>	204.495 <sup>d</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 13	245.045 <sup>e</sup>	156.706 <sup>e</sup>	186.440 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	TAUL 1368	296.358 <sup>d</sup>	68.041 <sup>e</sup>	92.025 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 1795	96.280 <sup>e</sup>	73.447 <sup>d</sup>	109.650 <sup>d</sup>	53.103 <sup>d</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	TAUL 34	363.788 <sup>d</sup>	268.146 <sup>d</sup>	101.815 <sup>d</sup>	75.991 <sup>d</sup>
	TAUL 1798	279.032 <sup>e</sup>	92.303 <sup>e</sup>	97.865 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TAUL 1521	81.680 <sup>e</sup>	83.999 <sup>h</sup>	93.280 <sup>h</sup>	70.310 <sup>d</sup>
	TAUL 1539	65.245 <sup>g</sup>	99.186 <sup>f</sup>	95.540 <sup>f</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 1588	67.022 <sup>f</sup>	96.449 <sup>g</sup>	89.605 <sup>g</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 1736	91.218 <sup>d</sup>	122.016 <sup>d</sup>	139.795 <sup>d</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 1765	90.140 <sup>d</sup>	108.245 <sup>e</sup>	110.895 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	TAUL 68	114.584 <sup>e</sup>	137.423 <sup>e</sup>	131.605 <sup>d</sup>	ND <sup>e</sup>
	TAUL 1267	150.239 <sup>d</sup>	177.116 <sup>d</sup>	93.650 <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	TAUL 1506	22.622 <sup>d</sup>	23.577 <sup>d</sup>	7.805 <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>
	TAUL 1508	18.519 <sup>e</sup>	20.237 <sup>e</sup>	9.980 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>
	TAUL 1522	15.148 <sup>g</sup>	16.789 <sup>g</sup>	9.545 <sup>e</sup>	4.200 <sup>e</sup>
	TAUL 1580	16.259 <sup>f</sup>	17.914 <sup>f</sup>	10.230 <sup>e</sup>	ND <sup>f</sup>
	TAUL 1694	11.069 <sup>h</sup>	11.242 <sup>h</sup>	10.755 <sup>de</sup>	ND <sup>f</sup>
	TAUL 1699	6.807 <sup>i</sup>	10.287 <sup>i</sup>	11.540 <sup>d</sup>	5.570 <sup>d</sup>

ND = not detected in 10 min at room temperature using a cell-free extract which contained a certain amount of protein. <sup>a</sup>Esterase specific activity expressed as μmoles of β-naphthol released per 10 min/mg protein of cell-free extract. <sup>b</sup> Values presented are means of 2 replicate evaluations for each bacterial strain. <sup>c</sup>TAUL: Tecnología de los Alimentos, Universidad de León. <sup>d-j</sup>Values corresponding to different bacterial strains of the same species not showing a common superscript differ significantly (p<0.01).

### **ARTÍCULO III**

**Estudio de la actividad antimicrobiana y de la resistencia a antibióticos de las cepas de bacterias lácticas aisladas de un queso artesanal de cabra, el queso de Armada, variedad sobado**



Short communication

# Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese)

M.A. Herreros<sup>a</sup>, H. Sandoval<sup>b</sup>, L. González<sup>a</sup>, J.M. Castro<sup>b</sup>,  
J.M. Fresno<sup>a</sup>, M.E. Tornadizo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, 24071 León, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, 24007 León, Spain

Received 21 July 2004; received in revised form 2 November 2004; accepted 2 November 2004

## Abstract

Thirty-one lactic acid bacteria isolated from Armada cheese and previously selected in accordance with their technological properties, were screened for antimicrobial activity one against another. Four strains showed inhibitory activity against 14 strains when tested by well diffusion assay after the effects of organic acid and hydrogen peroxide were eliminated. Extracts of the strains did not show inhibitory activity after treatment with proteinase K, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin or pepsin. None of the strains showed antimicrobial activity against several pathogenic and spoilage reference strains. Eighteen representative strains were tested for their antibiotic resistance. None of the strains were totally susceptible to all antibiotics tested and multiple resistance was observed. Most of the tested strains were resistant to cefotaxim, oxacillin, vancomycin, teicoplanin, nitrofurantoin and trimethoprim.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Goat milk cheese; Lactic acid bacteria; Antimicrobial activity; Antibiotic resistance

## 1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) can produce antimicrobial substances with the capacity to inhibit the growth of pathogenic and spoilage micro-organisms. Organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins are included among these compounds (Daeschel, 1989). Interest in naturally produced antimicrobial agents, such as bacteriocins, is on the rise, since nowadays consumers demand “natural” and “minimally processed” food (Cleveland et al., 2001). The production of fermented foods such as cheese, yoghurts, fermented milk or preserved meats in which LAB are involved is a technological process that has been in use for centuries and is aimed at diversifying and preserving foodstuffs by means of acidification. Starter cultures made up

of LAB that produce bacteriocins and other antimicrobials might be able to contribute to guaranteeing the safety and technological quality of these fermented products.

On the other hand, LAB contaminate milk and meat obtained from animals that have been treated with antibiotics and so carry populations of resistant bacteria (Teuber et al., 1999). It is possible for this resistance to be transmitted to the human population through the food chain. Although many strains are not pathogenic, they could constitute a reservoir of genes conferring resistance to antibiotics which might be transferred to pathogenic strains (Lukášová and Šustáčková, 2003).

The aim of this work was, firstly, to determine compatibility among selected strains of LAB isolated from Armada cheese and to find strains producing bacteriocins or bacteriocin-like substances. Secondly, it was to evaluate the resistance of the strains to a range of antibiotics.

\*Corresponding author. Tel.: +34 987291850; fax: +34 987291284.  
E-mail address: dhtmet@unileon.es (M.E. Tornadizo).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

The following 31 strains of LAB tested for their antagonistic activity were isolated from the Sobado variety of Armada cheese over the course of ripening: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (eight strains), *L. lactis* subsp. *cremoris* (four strains), *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetyllactis* (two strains), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (two strains), *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (two strains), *Lactobacillus plantarum* (five strains), *Lactobacillus brevis* (two strains), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (six strains). The procedures for isolating, identifying, technologically characterizing and selecting these strains were those described in earlier work by Tornadijo et al. (1995) and Herreros et al. (2003, 2004).

Each strain (out of 31 isolates) was considered as a potential inhibitory activity producer and as an indicator, and additional reference strains of Gram-positive bacteria belonging to different species have been also used as indicators. The reference strains of pathogenic or spoilage micro-organisms chosen to test antimicrobial activity of the strains presumed to produce bacteriocin or bacteriocin-like substances were *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Clostridium tyrobutyricum*. All of these were obtained from the Spanish Standard Cultures Collection (Colección Española de Cultivos Tipo or CECT) (University of Valencia). *L. monocytogenes* CECT 4031, *S. aureus* CECT 240 and *E. faecalis* CECT 481 were chosen because of their prominent status in relation to the safety of dairy products. *C. tyrobutyricum* CECT 4011 is associated with a technological problem in cheesemaking, i.e. late blowing by butyric acid fermentation. In addition, inhibitory capacity against a reference strain of *L. plantarum* from the same source was determined.

LAB strains isolated from Armada cheese and the reference strains *L. plantarum* (CECT 748) and *E. faecalis* (CECT 481) were grown in MRS broth (Oxoid, Basingstoke, UK) at 30 °C for 24 h. *L. monocytogenes* (CECT 4031) was cultured in Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) with 0.6% Yeast Extract supplement (TSBYE, Oxoid) at 30 °C for 24 h. *S. aureus* (CECT 240) was grown in TSB and *C. tyrobutyricum* (CECT 4011) in Tyrobutyricum Broth Base (Merck, Darmstadt, Germany), both at 37 °C for 24 h.

### 2.2. Detection of antimicrobial activity

The agar well diffusion assay was used to study antibacterial activity among the 31 strains of LAB and against the reference strains, as described by Casla et al. (1996).

One milliliter of the indicator strain (with approximately  $5 \times 10^5$  cfu mL<sup>-1</sup>), cultured in MRS broth for 24 h at 30 °C, was inoculated into 15 mL of semisolid MRS agar (MRS broth plus 0.7% bacteriological agar) maintained at 45 °C and the resultant mixture was poured into a Petri dish. After solidification of the agar, wells 5 mm in diameter were cut into it, and 50 µL of supernatant fluid from a culture of the strain under test, obtained as indicated below, was added to each well. The plates were examined for inhibition after incubation at either 30 or 37 °C for 24 h.

Strains for testing were cultured overnight in MRS broth. Cells were then removed by centrifuging at 14,000g for 5 min. The supernatant fluid was filtered through a syringe filter with a pore size of 0.22 µm (Millipore Corporation, Bedford, USA) and adjusted to pH 6.0 with sterilized 2.5 M NaOH, so as to rule out inhibition through the production of organic acids. This extract was placed into the wells. If antagonism was present, the possible inhibitory action of hydrogen peroxide was eliminated by the addition of a sterile solution of catalase (1 mg mL<sup>-1</sup>) at 25 °C for 30 min. If inhibition continued to be present when the extract added to the wells had been neutralized and treated with catalase, this was taken to be due to the production of bacteriocins or bacteriocin-like compounds. The proteaceous nature of the active extract was evaluated by treating this extract with a 1 mg mL<sup>-1</sup> final concentration of the proteolytic enzymes (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). These were: proteinase K (33 U mg<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -chymotrypsin (66 U mg<sup>-1</sup>), trypsin (105 U mg<sup>-1</sup>) and pepsin (1,730 U mg<sup>-1</sup>), in accordance with Bonadè et al. (2001). Any residual antimicrobial activity of treated extracts was determined by the agar well diffusion method.

### 2.3. Testing for resistance to antibiotics

Eighteen strains identified as *L. lactis* subsp. *lactis* (four strains), *L. lactis* subsp. *cremoris* (three strains), *L. Lactis* subsp. *lactis* var. *diacetyllactis* (two strains), *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (one strain), *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (one strain), *L. plantarum* (two strains), *L. brevis* (two strains), and *L. casei* subsp. *casei* (three strains), were selected on the basis of their desirable technological characteristics (Herreros et al., 2003, 2004). They were tested for resistance to 15 antibiotics produced by Biodiscs Mast Group Ltd., Merseyside UK. These were: ampicillin (10 µg), augmentin (30 µg), cefoxitin (30 µg), cephalotoxin (30 µg) and oxacillin (1 µg), belonging to Group I ( $\beta$ -lactam); vancomycin (30 µg) and teicoplanin (30 µg), from Group II (Non- $\beta$ -lactam cell wall); cloramphenicol (30 µg), clindamycin (2 µg), rifampicin (5 µg), tetracycline (30 µg) and kanamycin (30 µg), from Group III (Inhibit protein or mRNA synthesis); and ciprofloxacin

(5 µg), nitrofurantoin (300 µg) and trimethoprim (5 µg), belonging to Group IV. This testing was performed using the standard disc diffusion method (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993).

### 3. Results and discussion

The results obtained from the agar well diffusion assay are shown in Table 1.

The strains of lactococci showed no antimicrobial activity except those of *L. lactis* subsp. *lactis* TAUL 71 and TAUL 78 and *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* TAUL 13. The two strains of *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* and one of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* inhibited 1–4 indicator strains. The two strains of *Lb. brevis* inhibited three of the tested strains and only one strain of *Lb. plantarum* (TAUL 1539) showed antibacterial activity inhibiting 12 strains. None of the strains of *Lb. casei* subsp. *casei* showed any inhibitory activity.

Table 1

Antimicrobial activity<sup>a</sup> among the 31 selected strains of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese tested by the agar well diffusion assay (30 cases per strain)

	No. of strains inhibited before excluding the action of hydrogen peroxide	No. of strains inhibited after excluding the action of hydrogen peroxide
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
TAUL <sup>b</sup> 71	2	2
TAUL 78	2	2
TAUL 95	0	n.d. <sup>c</sup>
TAUL 101	0	n.d.
TAUL 119	0	n.d.
TAUL 221	0	n.d.
TAUL 238	0	n.d.
TAUL 1292	0	n.d.
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
TAUL 216	0	n.d.
TAUL 283	0	n.d.
TAUL 1239	0	n.d.
TAUL 1351	0	n.d.
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>		
TAUL 12	0	n.d.
TAUL 13	3	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>		
TAUL 1368	2	0
TAUL 1795	1	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>		
TAUL 34	4	0
TAUL 1798	0	n.d.
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
TAUL 1521	0	n.d.
TAUL 1539	12	9
TAUL 1588	0	n.d.
TAUL 1736	0	n.d.
TAUL 1765	0	n.d.
<i>Lactobacillus brevis</i>		
TAUL 68	3	0
TAUL 1267	3	0
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>		
TAUL 1506	0	n.d.
TAUL 1508	0	n.d.
TAUL 1522	0	n.d.
TAUL 1580	0	n.d.
TAUL 1694	0	n.d.
TAUL 1699	0	n.d.

<sup>a</sup>Antimicrobial activities with clear zones of inhibition  $\geq 2$  mm were considered positive results.

<sup>b</sup>TAUL: Tecnología de los Alimentos, Universidad de León (Food Technology, University of León).

<sup>c</sup>n.d.: not determined.



Table 2  
Resistance to antibiotics of the 18 representative strains of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese

	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	Total
Number of strains tested	9	2	2	2	3	18
						Resistant strains
<i>Resistance to antimicrobials of Group I</i>						
Ampicillin (10 µg)	3	1	2	1	3	10
Augmentin (30 µg)	4	1	2	0	2	9
Cefoxitin (30 µg)	5	2	2	2	3	14
Cephalotoxin (30 µg)	4	1	1	2	3	11
Oxacillin (1 µg)	8	2	2	2	3	17
<i>Resistance to antimicrobials of Group II</i>						
Vancomycin (30 µg)	5	2	2	2	3	14
Teicoplanin (30 µg)	6	2	2	2	3	15
<i>Resistance to antimicrobials of Group III</i>						
Cloranphenicol (30 µg)	6	2	0	1	3	12
Clindamycin (2 µg)	5	1	1	1	1	9
Rifampicin (5 µg)	7	1	1	2	1	12
Tetracycline (30 µg)	3	2	2	0	2	9
Kanamycin (30 µg)	6	2	2	2	1	13
<i>Resistance to antimicrobials of Group IV</i>						
Ciprofloxacin (5 µg)	6	2	2	2	2	14
Nitrofurantoin (300 µg)	8	2	2	2	3	17
Trimethoprim (5 µg)	9	2	2	2	3	18

After exclusion of inhibition due to the action of hydrogen peroxide, the two strains of *L. lactis* subsp. *lactis* TAUL 71 and 78 once again showed antimicrobial activity against the two susceptible strains. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* (TAUL 13) acted against one of the three susceptible strains, while *Lb. plantarum* (TAUL 1539) showed activity against nine of the 12 susceptible strains (Table 1) and against the reference strain *Lb. plantarum* CECT 748. Consequently, *Lb. plantarum* TAUL 1539 showed the greatest range of inhibition of indicator strains. Indeed, it inhibited strains of *L. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* and *Ln. mesenteroides*. Nevertheless, none of the strains tested was active against *L. monocytogenes* (CECT 4031), *S. aureus* (CECT 240), *E. faecalis* (CECT 481) or *C. tyrobutyricum* (CECT 4011), in an agar well diffusion assay after prior treatment of the extracts with catalase.

The antimicrobial activity of the strains of *Lactococcus* and *Lactobacillus* was eliminated after treatment of the active extracts with various proteolytic enzymes. Consequently, the inhibiting effect shown by these strains could be due to the presence of bacteriocins or bacteriocin-like metabolites. Production of bacteriocins by lactobacilli is frequent and this fact may contribute to their colonizing and competitive ability (Garriga et al., 1993).

The results obtained for antibiotic resistance of the 18 representative strains of LAB isolated from Armada

cheese and tested using the disk diffusion method are shown in Table 2. No strain was totally susceptible to all antibiotics and multiple resistance to most antibiotics was observed. This is in accordance with various reports indicating that LAB are normally resistant to the principal types of antibiotics, such as  $\beta$ -lactam, cephalosporins, aminoglycosides, quinolone, imidazole, nitrofurantoin and fluoroquinolones (Halami et al., 2000).

Transfer of resistance to antimicrobial substances is an essential mechanism in LAB if they are to adapt and survive in specific environments. Among the resistance mechanisms in use, enzymic inactivation of the antibiotics, restricted import of antibiotics, active export of antibiotics or target modification may be highlighted (Davies, 1997).

When resistance of the strains to antimicrobials in Group I ( $\beta$ -lactam) was tested for, regardless of the species strains showed more susceptibility to ampicillin and augmentin and more resistance to cefotoxin, cephalotoxin and oxacillin, especially the latter, to which only one of the 18 strains was sensitive.  $\beta$ -lactamases, a family of resistance enzymes which includes the penicillinases and cephalosporinases, are involved in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics (Bush et al., 1995).

With regard to antimicrobials in Group II (non- $\beta$ -lactam), 14 strains were resistant to vancomycin and 15

strains were resistant to teicoplanin. All the leuconostocs and lactobacilli tested showed resistance to vancomycin and teicoplanin. In contrast, some strains of *Lactococcus* proved sensitive to these antibiotics, in agreement with the results reported by De Fabrizio et al. (1994).

Strains were most susceptible to clindamycin and tetracycline, with a similar grade of resistance to the rest of the antibiotics in Group III being presented.

The highest prevalence of resistance among the isolates was shown in relation to certain antimicrobial agents in Group IV. In general, strains showed significant resistance to ciprofloxacin. Only one strain was susceptible to nitrofurantoin and all the strains were resistant to trimethoprim. Twenty-six strains of *L. lactis* isolated from food by Teuber et al. (1999) were also resistant to trimethoprim.

An overuse of antibiotics in the treatment and prophylaxis of bacterial infections might be the principal factor with regard to bacterial resistance to such medicines and explain the high levels shown by the strains examined with respect to many of the antimicrobials investigated. In addition, other practices aimed at increasing production on farms may also favor the development of resistance to antibiotics among bacteria that infect animals (Lukášová and Šustáčková). From raw milk, bacteria may be transferred into raw milk cheeses. Indeed, resistance to various antibiotics has been detected in strains of different species of LAB isolated from craft-made Spanish cheeses (Herrero et al., 1996). Thus, cheeses produced from raw milk or with a starter including LAB resistant to antimicrobials may act as vectors in generating resistance to certain antibiotics in bacteria infecting humans.

The use of suitable starter cultures and appropriate substrates, like pasteurized milk, for food fermentation together with prudent employment of antibiotics are among the measures that can avoid the distribution of bacteria spreading resistance to antibiotics (Teuber et al., 1999).

### Acknowledgements

The financial support for this work was provided by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (Project AGL2001-0092-CO2-01).

### References

- Bonadè, A., Murelli, F., Vescovo, M., Scolari, G., 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. Lett. Appl. Microbiol. 33, 153–158.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995. Minireview. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1211–1233.
- Casla, D., Requena, T., Gómez, R., 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105. J. Appl. Bacteriol. 81, 35–41.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71, 1–20.
- Daeschel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43, 164–166.
- Davies, J.E., 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds.), Antibiotic Resistance. Origins, Evolution, Selection and Spread. Wiley, Chichester, pp. 15–27.
- De Fabrizio, S.V., Parada, J.L., Ledford, R.A., 1994. Antibiotic resistance of *Lactococcus lactis*, an approach of genetic determinants location through a model system. Microbiol.-Aliments-Nutr. 12, 307–315.
- Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., Monfort, J.M., 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. J. Appl. Bacteriol. 75, 142–148.
- Halami, P.M., Chandrashekar, A., Nand, K., 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. Lett. Appl. Microbiol. 30, 197–202.
- Herrero, M., Mayo, B., Gonzales, B., Suárez, J.E., 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. J. Appl. Bacteriol. 81, 565–570.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González Prieto, J., Tornadizo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Int. Dairy J. 13, 469–479.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., Sandoval, H., Castro, J.M., Tornadizo, M.E., 2004. Esterolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Milchwissenschaft 59, 9–19.
- Lukášová, J., Šustáčková, A., 2003. Review article. Enterococci and antibiotic resistance. Acta Vet. Brno. 72, 315–323.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test: Tentative Standards, 13, 24 NCCLS Documents M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vallinova, PA.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F., 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek 76, 115–137.
- Tornadizo, M.E., Fresno, J.M., Bernardo, A., Martín Sarmiento, R., Carballo, J., 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). Lait 75, 551–570.

## **ARTÍCULO IV**

**Estudio preliminar a cerca de la influencia de la adición de cultivos iniciadores autóctonos sobre las características organolépticas del queso de Armada, variedad sobado, elaborado con leche pasterizada**



# Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study

M.A. Herreros<sup>a</sup>, R. Arenas<sup>a</sup>, M.H. Sandoval<sup>b</sup>, J.M. Castro<sup>b</sup>, J.M. Fresno<sup>a</sup>, M.E. Tornadizo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, 24071 León, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, 24071 León, Spain

Received 6 October 2005; accepted 20 April 2006

## Abstract

Six batches of Armada cheese were produced, one from raw milk with no added starter, another from pasteurized milk with a commercial mesophilic starter and four from pasteurized milk with experimental starters. These starters included: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*; or the same strains plus either *Enterococcus raffinosus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* or *Lactobacillus plantarum*, all isolated from Armada cheese made from raw milk. The highest counts of aerobic mesophilic bacteria and populations of lactic acid bacteria for all batches were reached in the first week of ripening. These counts declined later throughout the ripening, although not at identical rates in every batch. Counts of lactobacilli were significantly higher in cheeses made from raw milk and those inoculated with the lactobacilli strain than in the other batches, over the whole ripening period. Added native starters minimized growth of *Enterobacteriaceae*. Cheeses made with the starter containing the *Enterococcus* strain had the most favourable sensory attributes throughout ripening.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Goat milk cheese; Armada cheese; Native starter; Lactic acid bacteria

## 1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are ubiquitous micro-organisms present as contaminants in raw milk; they constitute part of the normal microflora of cheeses. The LAB are one of the multiple factors that affect the texture, taste and aroma of cheeses. Starters consisting of LAB have to be added in making cheese from pasteurized milk, and may be usefully employed even in those produced from raw milk to obtain a high degree of control over the fermentation process (Leroy & De Vuyst, 2004).

The starters that are usually employed in making the majority of cheese types include micro-organisms that produce acid, generally *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, together with certain species of *Lactococcus* and *Leuconostoc* which can produce substances responsible for the aroma of cheese. The lactobacilli constituting non-starter LAB (NSLAB) do not

contribute to the production of acids, but generally play a significant role in the cheese-ripening process. Indeed, many studies have reported on the inclusion of various strains of lactobacilli as adjuncts to improve flavour development and to accelerate cheese ripening (Hannon et al., 2003). On the other hand, enterococci could play an important role in the development of the typical flavour of the cheese and may make good components of cheese starter cultures (Giraffa, 2002).

Native flora of milk seems to be the main factor in producing the specific sensory properties of raw milk cheeses (Grappin & Beuvier, 1997). Therefore, the addition of native cultures to pasteurized milk could contribute to preserving the typical characteristics of traditional cheese.

Armada cheese, a hard variety made in the north of Spain, is a ripened cheese, manufactured from raw goats' milk, without addition of starter cultures, according to the traditional method as reported by Tornadizo, Fresno, Bernardo, Martin-Sarmiento, and Carballo (1995). The lack of uniformity in the majority of artisanal raw milk cheeses manufactured without a standardized technological

\*Corresponding author. Tel.: +34 987291184; fax: +34 987291284.

E-mail address: [dhtmet@unileon.es](mailto:dhtmet@unileon.es) (M.E. Tornadizo).

procedure, such as Armada cheese, limits its acceptance and its distribution on the home and foreign markets. Pasteurization of milk and addition of a native starter culture would permit the manufacture on an industrial scale of a uniform and safe product of constant quality, and preserve the quality characteristics of the original product.

The objective of this work was to investigate the effects of adding various different starter cultures, composed of selected LAB strains isolated from Armada cheese made from raw milk, on the physico-chemical, microbiological and sensory characteristics of Armada cheese made from pasteurized milk.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains of bacteria and conditions for culturing

The five strains tested in this study as native starter cultures for producing Armada cheese were *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* (TAUL 12), *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (TAUL 1795) and *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736). These strains were selected for their technological characteristics (acidifying, proteolytic, aminopeptidase, carboxypeptidase, dipeptidase and esterolytic activities), from 31 strains of LAB isolated from the Sobado variety of Armada cheese (Herreros, Fresno, González Prieto, & Tornadijo, 2003). Of the three varieties of Armada cheese (Sobado, Mortera and Quemón) the most widely consumed and liked variety is Sobado, a craft or artisanal product traditionally made from raw goats' milk without the addition of any starter cultures.

*Lc. lactis* subsp. *lactis* TAUL 1292 was selected because of its desirable acidifying capability and proteolytic activities; *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* TAUL 12 was also included for its high level of dipeptidase activity and its capacity to produce aroma compounds. *E. raffinosus* TAUL 1351 was included for its high carboxypeptidase and esterolytic activities. Finally, a strain of *Lb. plantarum* (TAUL 1736) was also considered because of its aminopeptidase and  $\beta$ -galactosidase activity (Herreros et al., 2003; Herreros et al., 2004). A commercial mesophilic LAB starter culture (Ezal MA 011, Rhodia Food, Sassenage, France) containing acidifying strains (*Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) was used in making a batch.

### 2.2. Cheese manufacture and sampling

Six batches of Armada cheese were manufactured with milk from goats in the same herd, each batch comprising six cheeses. Therefore, 36 cheeses were made in total. Six used raw goats' milk (batch A), another six pasteurized milk with a commercial mesophilic LAB starter at a level of 1% (batch B) and the remaining 24 cheeses using selected

LAB strains isolated from raw-milk Armada cheeses. Batches C–F were manufactured with starter C (*Lc. lactis* subsp. *lactis* TAUL 1292 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* TAUL 12) (Batch C), starter C plus *E. TAUL 1351* (batch D), starter C plus *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* TAUL 1795 (batch E) and starter C plus *Lb. plantarum* TAUL 1736 (batch F). All batches were produced in accordance with traditional methods (Tornadijo et al., 1995), slightly modified in that there was only a single kneading of the curds, not two. This was because, otherwise, a long drainage time was involved and the individual grains of curd did not cohere adequately. The raw or pasteurized goats' milk was coagulated at 30 °C by adding 15 mL of commercial calf rennet, strength 1/10,000 (Productos Nievi, Bilbao, Spain) for each 100 L of milk. The operations of cutting, draining whey and kneading and pressing the curds were performed as described by Tornadijo et al. (1995). Salting was carried out by adding 1.7% dry salt during the kneading operations. The process of ripening took place over a period of 120 days at 11 °C and 86% relative humidity.

Raw milk or pasteurized milk inoculated with each of the various starters, curd (2 days after coagulation and before salting) and 7, 15, 30, 60 and 120 day-old cheese samples were analysed (only one trial was undertaken for each treatment).

### 2.3. Microbial analysis

Fifty-gram milk and cheese samples taken over the course of ripening were homogenized with 200 mL of a sterile 2% (w/v) solution of sodium citrate (Panreac, Barcelona, Spain) at 40–45 °C for 3 min in a Stomacher 400 Lab Blender (Seward Medical, London, UK), to achieve a 1:5 dilution. Decimal dilutions were then prepared by mixing 10 mL of this with 90 mL of 0.1% (w/v) sterile peptone water (Oxoid, Unipath, Ltd. Basingstoke, UK) according to IDF standard 122 B (IDF, 1992).

Samples of the raw or pasteurized milk inoculated with the commercial lactic starter or with selected LAB strains, and cheeses made from these starters, were analysed for aerobic mesophilic bacteria, LAB and *Enterobacteriaceae*.

Aerobic mesophilic bacteria were enumerated on standard plate count agar (PCA) (Oxoid, Unipath, Ltd. Basingstoke, UK) after incubation at 30 °C for 48 h. LAB were determined on De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar (Oxoid) after incubation at 30 °C for 72 h. Lactococci were enumerated on M17 agar (Biokar), after incubation at 30 °C for 18–24 h and lactobacilli on Rogosa agar (Oxoid) incubated at 30 °C for 5 d. *Enterobacteriaceae* were enumerated on violet red bile glucose agar (VRBGA) (Oxoid), after incubation at 37 °C for 18–24 h.

On standard PCA, Rogosa agar, MRS agar, and VRBGA, 1 mL volumes of each dilution were inoculated in duplicate, and mixed before solidification. Plates of Rogosa agar and VRBGA were covered with a layer of the



same medium before incubation. On M17 agar, 0.1 mL volumes of each dilution were surface plated in duplicate.

#### 2.4. Physico-chemical analysis

The chemical composition of milk was determined by the following methods: total solids by IDF standard 21 B (IDF, 1987) and lactose by IDF standard 28 A (IDF, 1974). The pH was measured with a CRISON 2001 micro-pHmeter (Barcelona, Spain) and the titratable acidity was determined according to the AOAC standard method 947.05 (AOAC, 1990).

The total solids content of cheese (samples taken from curd and after 7, 15, 30, 60 and 120 days of ripening) were determined by IDF standard 4 A (IDF, 1982), lactose by IDF standard 43 (IDF, 1967), and salt by IDF standard 17A (IDF, 1972). The pH and titratable acidity were measured from samples homogenized with distilled water (45–50 °C), as described by the AOAC methods 140.22 and 162.47 (AOAC, 1980a, b). Water activity ( $a_w$ ) was determined instrumentally using an Aqua Lab CX-2 water activity system (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). All analysis were carried out in duplicate.

#### 2.5. Sensory evaluation

Cheeses were analysed at 30, 60 and 120 days of ripening by a panel of 8 tasters following standard recommendations (ISO, 1993). The appearance, odour, texture, flavour and residual intensity flavour of cheeses were evaluated on an arbitrary scale from 1 (bad) to 7 (excellent), with 4 being an acceptable value.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Changes in chemical and physico-chemical parameters during ripening

The changes in the physico-chemical parameters occurring during the manufacture and ripening of the batches of Armada cheese are shown in Fig. 1. The drop in pH during the making and first stages of ripening of the Armada cheese was greater in the batches produced from pasteurized milk inoculated with starter cultures than in the batch made from raw milk (batch A). Batches produced from pasteurized milk had pH values < 5.0 in curd and cheese up to 7 days of ripening, while such levels were not reached at any point throughout the ripening of batch A.

Batch B (made with pasteurized milk and an acidifying commercial starter) underwent the highest drop in pH during coagulation and the first stages of ripening of the cheeses. As the pH of cheese curd decreases there is a concomitant loss of colloidal calcium phosphate from the casein micelles and, below about pH 5.5, a progressive dissociation of the micelles into smaller casein aggregates (Lawrence, Creamer, & Gilles, 1987). The demineralization of the casein micelles determines a non-cohesive paste,

which could contribute to internal drying of the cheese. Moreover, the loss of internal moisture by the cheeses leads to an increase in salt concentration, evident in batch B, up to the 60th day of ripening (Fig. 1).

Batch F (produced with pasteurized milk and starter C plus a strain of *Lactobacillus*, TAUL 1736) also underwent a sharp drop in pH, reaching values of 4.26 at 60 days of ripening. Other authors have also observed a more significant decrease in the pH of cheeses made with strains of *Lb. casei* and *Lb. plantarum* compared with those manufactured without added lactobacilli (Gómez, Gaya, Núñez, & Medina, 1996; Menéndez, Centeno, Godínez, & Rodríguez-Otero, 2000; Menéndez, Godínez, Hermida, Centeno, & Rodríguez-Otero, 2004; Trepanier, Simard, & Lee, 1991).

In the batch made from raw milk (batch A), titratable acidity increased during coagulation and ripening at a different rate from the other batches. The increase in titratable acidity occurring in the curd was more pronounced in batches produced from pasteurized milk. However, from that point on, acidification proceeded more slowly and less intensely in the cheeses produced from pasteurized milk than in those of batch A. The increase in titratable acidity of cheeses made from raw milk without a simultaneous decrease in pH values could be related to a high buffering capacity of this curd.

The values obtained for the salt/moisture ratio in cheeses were similar in all batches up to 15 days into ripening. The salt/moisture ratio increased up to 120 days, reaching values of around 15% in all batches, except C, in which final levels were lower than those for the other batches.

The initial content of lactose in curds ranged from 5.65 g 100 g<sup>-1</sup> total solids in the batch made with raw milk to 3.75 g 100 g<sup>-1</sup> for batch B. The curd produced from raw milk showed higher levels of lactose than those reported by Fresno, Tornadizo, Carballo, González-Prieto, and Bernardo (1996) in their earlier study of samples of Armada cheese made from raw milk. A variety of parameters (pH, temperature, breakage of the curd, size of the final grain, etc.) that affect whey drainage might be responsible for the differences in lactose content showed in the present study. Moreover, the milk of batch A showed counts for LAB 3 log units lower than those present in the other batches.

In batch A, made from raw milk, the lactose content decreased during the first 7 days of ripening, corresponding with an increase in titratable acidity, and was undetectable from the first week of ripening onwards. These results are consistent with those obtained by Fresno et al. (1996). In the method of production of this cheese, salting is not carried out until 2 days after curd-forming, and it is thus logical to assume that the low salt/moisture ratio at this point will permit rapid development of LAB, which are responsible for the breakdown of lactose, contributing to decrease the lactose content in such a short period of time. Moreover, the first pressing, 2 days into ripening,

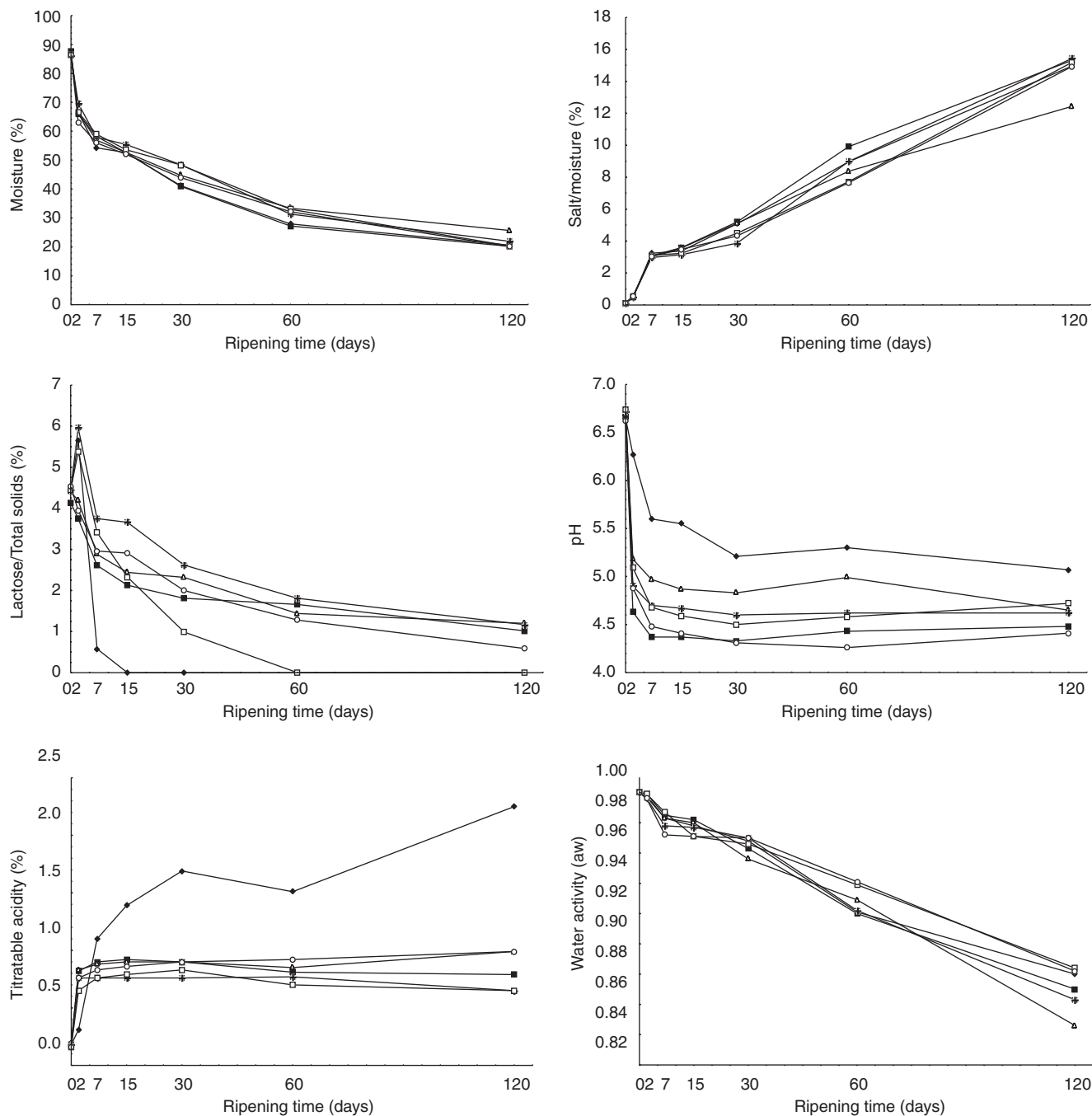


Fig. 1. Changes in moisture, salt/moisture and lactose/total solids contents and in pH, titratable acidity and water activity values throughout the manufacture and ripening of Armada cheese made with raw (batch A) or pasteurized (batches B–E) milk. Time point zero refers to milk, and point 2 to fresh curd. Batches of cheese were made with: A (-◆-), no starter culture; B (-■-), commercial culture; C (-△-), starter C, including *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAUL 1292 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* TAUL 12; D (-×-), starter C plus *E. raffinosus* TAUL 1351; E (-□-), starter C plus *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* TAUL 1795; F (-○-), starter C plus *Lb. plantarum* TAUL 1736.

accentuates whey drainage, reducing in considerable losses of lactose. In contrast, in the batches made from pasteurized milk, the pH values of which were < 5.0 in the first week of ripening, the lactose content decreased progressively up to the end of ripening without disappearing completely. Only in batch E, produced with starter C and strain TAUL 1795, was lactose practically undetectable after 30 days of ripening. Consequently, the differ-

ences observed in the lactose content may be related to the changes in pH; in fact, differences in pH values among different curds could produce differences in whey drainage. On the other hand, acidic pH values are not optimal for the stability and activity of bacterial  $\beta$ -galactosidase, as the enzyme considerably loses activity at pH 4.5 (Montanari, Zambonelli, Grazia, Benevelli, & Chiavari, 2000; Ladero, Ferrero, Vian, Santos, & García-Ochoa, 2005).



### 3.2. Changes in microbial populations during manufacture and ripening of Armada cheese

The changes in the microbial counts throughout ripening of the cheeses are shown in Table 1. In the majority of batches, the highest counts for aerobic mesophilic flora ( $>9.5$  cfu g<sup>-1</sup>) were already present in the curd, except for batches A and B, in which the maximum counts were observed in the first week of ripening. PCA counts dropped during the course of ripening, with several patterns in the different batches.

The changes in levels of aerobic mesophilic bacteria during manufacture and ripening of Armada cheese were similar to the counts on MRS agar. This reflects the fact that LAB were the predominant flora during the production and ripening of Armada cheese.

Counts of LAB and lactococci (enumerated on M17 agar) were lower in cheese from batch A, produced from

raw milk, than those obtained from the other batches. Moreover, batch A showed pH values higher than those of all the other batches, while the counts for LAB in this batch were strikingly smaller than those recorded for this type of cheese in previous work by Tornadijo et al. (1995). In batch A, counts of LAB and lactococci increased by 3–4 log units during coagulation; however, in batches made from pasteurized milk with an added starter, counts increased by 2–3 log units. Similar changes in counts of LAB were reported by González et al. (2003) in a study of the effect of the starters on microbiological characteristics of Ibores cheese, another traditional Spanish goat milk cheese.

The highest counts of LAB and lactococci for all batches were reached in the first week of ripening. From this point, counts of LAB decreased in a similar way in all batches up to 30 days into ripening, after which differences between

Table 1

Changes in microbial counts (log cfu g<sup>-1</sup>) throughout ripening of Armada cheese in the six batches (A–F) (Data are means of two analyses from each sample and each sample was one cheese from each batch and sampling point)

Microbial group	Batch <sup>a</sup>	Milk	Curd	Ripening time (days)				
				7	15	30	60	120
Aerobic mesophilic flora	A	5.079	7.979	9.633	9.365	8.889	8.752	7.734
	B	7.635	8.080	9.638	8.995	7.267	6.230	5.797
	C	7.167	9.811	9.878	8.911	8.283	6.514	5.660
	D	7.316	9.716	9.501	8.582	8.301	7.607	7.182
	E	7.415	9.797	9.730	8.848	8.450	7.806	7.123
	F	7.365	9.904	8.945	8.630	8.635	8.821	8.599
Lactic acid bacteria	A	4.021	7.860	9.658	9.301	8.362	8.728	7.336
	B	7.653	8.821	9.267	8.667	7.255	6.243	5.580
	C	7.236	9.857	9.886	8.845	8.418	6.455	5.097
	D	7.393	9.681	9.207	8.574	8.167	7.585	7.352
	E	7.362	9.893	9.593	8.752	8.562	8.057	7.511
	F	7.406	9.942	8.878	8.519	8.658	8.562	8.512
Presumptive lactococci	A	4.176	8.025	9.190	9.065	8.322	8.371	5.342
	B	7.531	9.243	8.929	8.845	7.086	6.250	5.415
	C	7.045	9.111	9.351	8.830	8.210	6.794	3.806
	D	7.107	9.380	9.591	8.559	8.321	6.534	5.110
	E	6.439	9.817	9.753	8.097	8.426	5.568	3.796
	F	6.941	9.771	9.013	9.613	8.767	5.434	3.625
Lactobacilli	A	2.816	4.967	6.684	8.342	8.718	8.722	7.423
	B	—	—	2.477	4.176	4.352	4.352	4.365
	C	—	2.477	2.301	2.544	3.765	5.049	5.000
	D	—	—	1.398	1.602	3.021	5.455	5.536
	E	—	—	2.000	2.398	2.322	3.574	6.925
	F	6.201	7.676	8.305	8.487	8.556	8.750	8.528
Enterobacteria	A	3.745	6.574	7.699	6.568	5.695	2.305	—
	B	—	1.763	1.813	2.760	—	—	—
	C	1.176	2.120	2.875	2.519	2.114	—	—
	D	0.505	3.346	3.061	2.658	2.151	—	—
	E	1.000	2.531	2.439	2.041	—	—	—
	F	2.688	3.079	1.916	1.602	—	—	—

<sup>a</sup>A: raw milk without starter culture; B: pasteurized milk with a commercial culture; C: pasteurized milk with starter culture; C: (constituted of strains *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TAUL 1292 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* TAUL 12); D: pasteurized milk with starter C and *Enterococcus raffinosus* TAUL 1351; E: pasteurized milk with starter C and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* TAUL 1795; F: pasteurized milk with starter C and *Lactobacillus plantarum* TAUL 1736.

batches were observed (Table 1). The decrease in counts of LAB and lactococci during ripening is a phenomenon that has been observed and described by various authors (Martley & Crow, 1993; Menéndez et al., 2000). The decrease in  $a_w$  and the increase in salt/moisture ratio could have contributed to the decrease observed in the counts of LAB.

Batches A and F had high counts of lactobacilli (obtained on Rogosa agar) throughout ripening, with values around  $8 \log \text{cfu g}^{-1}$  being reached after 7 days in batch F and 15 days in batch A. The remaining batches yielded counts  $< 5 \log \text{cfu g}^{-1}$  until 60 days of ripening.

Maximum counts of *Enterobacteriaceae* were obtained in the first 15 days of ripening for all batches. These counts reached values close to  $8 \log \text{cfu g}^{-1}$  1 week into ripening in batch A, made from raw milk. The remaining batches showed maximum counts around 2–3  $\log \text{cfu g}^{-1}$  in curd, or after 7 or 15 days of ripening. The lower pH of cheeses made with added starter may influence these counts. Counts of *Enterobacteriaceae* decreased gradually throughout ripening and only in batch A, made from raw milk, were any *Enterobacteriaceae* detected after 60 days of ripening. In the others batches, which underwent more intense acidification in the first stages of ripening, *Enterobacteriaceae* were not detected from 15 or 30 days of ripening.

Excessive handling of the curds during the operations of pressing and salting, both carried out by hand, doubtless contributed to this effect on *Enterobacteriaceae* counts for batches made with pasteurized milk, despite all efforts to ensure the highest standards of hygiene. An innovation that might be included in the process of producing Armada cheese on an industrial or semi-industrial scale would be the use of an extruder that would allow uniform and hygienic kneading of the curd mass, hence contributing to increased quality in the cheese.

### 3.3. Sensory evaluation

Table 2 shows the sensory characteristics (appearance, odour, texture, flavour and residual intensity) of the six batches of Armada cheese. Texture scores were highest for batches D and E at 60 and 120 days of ripening. Using batch A, made with raw milk, as the control, the most characteristic flavour was obtained in batches F and D at 30 and 60 days of ripening, respectively, and in batch D for 120 days. Odour scores were highest in batches A, D and E and maximum residual intensity of flavour was detected in batches A and D. For overall impression, batches A and D were, at 60 days of ripening, rated best but, at 120 days, batches D and E had highest scores.

In general, the best evaluated cheeses throughout ripening were those from batch D, which presented a granular and crumbly texture, was easy to dissolve in the mouth, and had a lactic odour, with a slightly buttery aroma, a flavour typical of goat's cheese, and a residual weak spicy taste. Menéndez et al. (2004) observed a

Table 2

Sensory characteristics (scale from 1–7) of Armada cheese throughout ripening in the six batches (A–F) (data are means of evaluation scores obtained of each sample by a panel of six tasters)

Characteristics	Batches <sup>a</sup>	Ripening time (days)		
		30	60	120
Appearance	A	4.9	4.2	4.0
	B	4.3	4.3	4.0
	C	4.2	4.0	4.0
	D	4.7	4.0	4.0
	E	4.0	4.0	4.0
	F	4.0	4.0	4.0
Odour	A	4.7	4.5	4.9
	B	4.3	3.5	4.0
	C	4.0	3.8	4.0
	D	4.2	4.8	4.5
	E	4.5	4.5	4.3
	F	4.1	3.7	4.0
Texture	A	4.9	4.0	4.0
	B	4.0	3.8	4.0
	C	3.7	4.0	4.4
	D	4.0	4.8	4.5
	E	4.0	4.7	4.3
	F	4.0	4.0	3.5
Flavour	A	4.9	5.2	4.9
	B	3.7	3.5	4.3
	C	3.7	3.5	4.4
	D	4.2	5.0	4.8
	E	4.0	3.5	4.0
	F	4.8	4.0	3.5
Residual intensity flavour	A	5.2	4.7	4.5
	B	3.7	4.0	4.0
	C	3.7	4.3	4.4
	D	4.5	4.4	4.9
	E	3.9	3.0	4.0
	F	4.8	4.0	3.5
Overall impression (score 1–10)	A	6.5	6.8	6.4
	B	5.3	5.8	5.5
	C	5.4	5.0	6.7
	D	6.3	6.8	7.1
	E	6.3	5.5	6.9
	F	6.4	5.8	6.0

<sup>a</sup>Each sample was one cheese from each batch and sampling point. Codes are explained in Table 1.

correlation between spicy taste and lipolysis; in fact, the starter used in the manufacture of batch D included enterococci with high esterolytic activity. Cheeses from batch B showed mild aromas and flavours without any special peculiarity. Batch A had fungal growth attributable to cracks in the cheese mass, and a grainy texture and, although the cheeses had a wide range of odours, at the end of ripening a residual strong rancid like off-flavour was also noted. Other defects of cheeses were a residual metallic flavour, bitter taste, residual rancid persistence and a taste between sweet and bitter. At the end of ripening, all cheeses had a dry and grainy texture, especially those from batch

A, making it hard to dissolve them in the mouth. The addition to pasteurized milk of one or another species of NSLAB, such as *Lactobacillus* or *Enterococcus*, in conjunction with acidifying strains, might accelerate the progression of ripening in these cheeses, and contribute to development of the characteristic flavour and texture of this cheese variety before 120 days. In fact, mesophilic homofermentative lactobacilli, together with strains of lactococci, have been used on numerous occasions to accelerate ripening and to improve the sensory characteristics of cheeses (Lemieux, Puchades, & Simard, 1989; Lee et al., 1990; Hannon et al., 2003). However, the cheeses from batch F, made with the starter containing *Lactobacillus*, exhibited certain defects in flavour and smell linked to excessive acidity, with an aftertaste that was also very acidic.

#### 4. Conclusions

Employing native starter cultures to produce Armada cheese had an impact on the changes in microflora and in chemical and physico-chemical parameters, especially lactose, pH and titratable acidity. The use of these starters also had an influence on sensory characteristics of Armada cheese made from pasteurized milk. The starters comprising native strains had an advantage over the commercial culture since, in general, they gave the cheeses made with pasteurized milk characteristics of flavour, aroma and texture similar to, or better than, those of cheeses produced from raw milk (batch A), taking account of the fact that cheeses from batch A showed excessive dryness at the end of ripening and a residual rancid-like off-flavour.

The proportions of different strains used could be adjusted in order to minimize some of the defects observed, such as the excessive acidity of batch F. In general, after 30 days of ripening, batches D–F received the highest ratings, along with batch A, made from raw milk. However, at 60 days of ripening, the batches rated highest were A and D, and at 120 days of ripening were batches D and E.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (Ministerio de Ciencia y Tecnología) as Projects AGL2001-0092-CO2-01, and 02.

#### References

- AOAC. (1980a). Hydrogen-ion activity (pH). In W. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis*, 13th, 213. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (1980b). Acidity in cheese. In W. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis*, 13th, 266. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (1990). Acidity in milk. In K. Helrich (Ed.), *Official methods of analysis*, 15th, vol. 2, 805. Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Fresno, J. M., Tornadizo, M. E., Carballo, J., González-Prieto, J., & Bernardo, A. (1996). Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, 55, 225–230.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Review*, 26, 163–171.
- Gómez, M. J., Gaya, P., Núñez, M., & 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.
- González, J., Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Rebollo, J. E., et al. (2003). Autochthonous starter effect on the microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics of Ibore goat's milk cheeses. *Lait*, 83, 193–202.
- Grappin, R., & Beuvier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese: A review. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 327, 16–19.
- Hannon, J. A., Wilkinson, M. G., Delahunty, C. M., Wallace, J. M., Morrissey, P. A., & Beresford, T. P. (2003). Use of an autolytic starter system to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 13, 313–323.
- Herreros, M. A., Fresno, J. M., González Prieto, M. J., & Tornadizo, M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13, 469–479.
- Herreros, M. A., Fresno, J. M., Sandoval, H., Castro, J. M., & Tornadizo, M. E. (2004). Esterolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Milchwissenschaft*, 59, 9–19.
- IDF. (1967). *Determination of the lactose content of cheese & processed cheese products*. IDF Standard 43, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1972). *Determination of the salt content of cheese*. IDF Standard 17A, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1974). *Determination of the lactose content milk*. IDF Standard 28A, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1982). *Cheese and processed cheese-Determination of total solids content*. IDF Standard 4A, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1987). *Milk, cream and evaporated milk-Total solids*. IDF Standard 21B, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1992). *Milk and milk products-Preparation of test samples and dilutions for microbiological examination*. IDF Standard 122B, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISO (1993). *Sensorial analysis-General guidance for the selection, training and monitoring of assessors*. Standard ISO 8586-1: International Organization for Standardization.
- Ladero, M., Ferrero, R., Vian, A., Santos, A., & García-Ochoa, F. (2005). Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 505–513.
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., & Gilles, J. (1987). Symposium: Cheese ripening technology. Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70, 1748–1760.
- Lee, B. H., Laleye, L. C., Simard, R. E., Holley, R. A., Emmons, D. G., & Giroux, R. N. (1990). Influence of homofermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 55, 386–390.
- Lemieux, L., Puchades, R., & Simard, R. E. (1989). Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerate ripening. *Journal of Food Science*, 54, 1234–1237.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67–78.

- Martley, F. G., & Crow, U. L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal*, 3, 461–483.
- Menéndez, S., Centeno, J. A., Godínez, R., & Rodríguez-Otero, J. L. (2000). Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *International Dairy Journal*, 59, 37–46.
- Menéndez, S., Godínez, R., Hermida, M., Centeno, J. A., & Rodríguez-Otero, J. L. (2004). Characteristics of “Tetilla” pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiology*, 21, 97–104.
- Montanari, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Benevelli, M., & Chiavari, C. (2000). Release of  $\beta$ -galactosidase from lactobacilli. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 129–133.
- Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Martin-Sarmiento, R., & Carballo, J. (1995). Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, 75, 551–570.
- Trepanier, G., Simard, R. E., & Lee, B. H. (1991). Lactic acid bacteria: Relation to accelerated maturation of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 56, 1238–1240, 1254.

## **COMUNICACIÓN A CONGRESO I**

**Influencia del tipo de cultivo iniciador en la evolución de las fracciones nitrogenadas durante la maduración del queso de Armada, variedad sobado**



Avances de la **Ciencia** y  
**Tecnología** de los **Alimentos**  
en los **inicios** del **siglo XXI**



UNIVERSIDAD DE BURGOS





# **Avances de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos en los inicios del siglo XXI**

**EDITOR CIENTÍFICO:** Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos  
Facultad de Ciencias



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

**Burgos, 2005**

# Trabajos completos del “III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos”

Burgos, 29 de mayo al 1 de junio de 2005

Organizado: Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos  
Facultad de Ciencias

Promovido: Conferencia de Decanos y Directores de Centro que imparten Ciencia y Tecnología de los Alimentos

## **COORDINADORES DE LA EDICIÓN:**

Sara Raquel Alonso de la Torre  
Angel Ballesteros Castañeda  
María Dolores Busto Núñez  
María del Mar Cavia Camarero  
Montserrat Collado Fernández  
Miguel Ángel Fernández Muíño  
M<sup>a</sup> Luisa González San José  
Isabel Jaime Moreno

Natividad Ortega Santamaría  
Manuel Pérez Mateos  
Juan Ignacio Reguera Useros  
Pilar Muñiz Rodríguez  
Jordi Rovira Carballido  
Gonzalo Salazar Mardones  
M<sup>a</sup> Teresa Sancho Ortíz  
Verónica Tricio Gómez

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita de los titulares del Copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, conocido o por conocer, comprendidas la reprografía y el tratamiento informático.

© UNIVERSIDAD DE BURGOS

Edita: Servicio de Publicaciones  
UNIVERSIDAD DE BURGOS  
Servicios Centrales. Edif. Biblioteca Universitaria  
Pza. Infanta Dña. Elena, s/n  
09001 BURGOS - ESPAÑA

ISBN: 84-96394-23-9

Depósito Legal: BU.-270-2005

# INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO INICIADOR EN LA EVOLUCIÓN DE LAS FRACCIONES NITROGENADAS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO

Herreros, M.A., Di Dionisio, A., González, L., Tornadijo, M.E. y Fresno, J.M.

Departamento de Higiene y Tecnología de Alimentos. Universidad de León. 24071. León. e-mail: [dhtjfb@unileon.es](mailto:dhtjfb@unileon.es)

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de distintas combinaciones de microorganismos aislados de un queso de cabra artesanal como cultivos iniciadores en la evolución de las fracciones nitrogenadas del queso de Armada, variedad sobado, a lo largo de la maduración.

Fueron elaborados 6 lotes de queso de cabra en la planta piloto: Lote A: leche cruda sin añadir cultivo iniciador; Lote B: Leche pasteurizada (LP) + cultivo iniciador comercial; Lote C: LP + cultivo iniciador artesanal I (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*); Lote D: LP + cultivo iniciador artesanal II (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*+ *Enterococcus raffinosus*); Lote E: LP + cultivo iniciador artesanal III (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*); Lote F: LP + cultivo iniciador artesanal IV (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*+ *Lactobacillus plantarum*). En cada lote se recogieron muestras de 2 (después de la coagulación y antes del salazonado), 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración. Se llevó a cabo la determinación de las siguientes fracciones nitrogenadas: Nitrógeno Soluble a pH 4,4 (NS-pH 4,4), Nitrógeno Soluble en ácido tricloroacético al 12% (NS-TCA12%) y Nitrógeno Soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NS-PTA5%).

Los lotes A y E fueron los que presentaron los mayores porcentajes de NS-pH 4,4/NT, NS-TCA12%/NT y NS-PTA5% al final de la maduración, siendo los valores medios al cabo de 4 meses en torno al 16%, 10% y 3,6%, respectivamente. El resto de los lotes presentaron unos valores muy similares entre sí, si bien el lote D obtuvo los niveles más bajos durante prácticamente toda la maduración.

**Palabras Clave:** queso; Armada; cultivo iniciador; proteolisis; tipificación

## INTRODUCCIÓN

Los estudios de caracterización o tipificación de los quesos artesanales tienen como objetivo conocer los atributos que hacen de los mismos productos originales, específicos y característicos. Para lograrlo debe abordarse un estudio completo de la materia prima, tecnología de fabricación, así como de la flora microbiana y de los procesos bioquímicos que transcurren durante la maduración de los quesos. La caracterización desde el punto de vista sensorial es también fundamental para completar tales estudios.

En nuestro país son varios los quesos artesanos en los que se ha abordado en mayor o menor profundidad estudios de caracterización ya sean de vaca como el queso de vaca de León, queso de Arzúa, queso Gamonedo, queso Afuega'l Pitu, Picón Bejes-Tresviso, etc ; de oveja como el queso Los Pedroches, La Serena, Roncal, Idiazábal, Manchego o queso Castellano; o de cabra como el queso Majorero, Babia-Laciana, Gredos, Ibores, Cendrat del Monset, Valdeteja, Tenerife o Aracena.

El trabajo que se presenta forma parte de un proyecto de investigación que se ha planteado con el ánimo de complementar otro trabajo finalizado recientemente en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León acerca de la caracterización del queso de Armada, variedad sobado, un queso elaborado artesanalmente en el Norte de la provincia de León, a partir de leche de cabra o bien en ocasiones de mezcla de vaca y cabra. La finalidad de este proyecto es doble: por una parte, la elaboración de un cultivo iniciador constituido por la combinación de microorganismos aislados de esta variedad artesanal y, por otra, impulsar la fabricación industrial de ésta y otras variedades artesanales de

queso que se están elaborando actualmente con cultivos iniciadores comerciales de ámbito general.

En un estudio previo y de un total de 840 cepas aisladas e identificadas a nivel de especie en distintas fases del proceso de maduración del queso de Armada artesanal se seleccionaron 171 con el objeto de realizar estudios cualitativos acerca de capacidad acidificante, proteolítica y lipolítica. Estos estudios permitieron reducir el número de cepas hasta 31 sobre las que se realizaron diversos estudios de caracterización genética y aptitud tecnológica en profundidad. A partir de estos estudios se seleccionaron 13 cepas de los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Con estas cepas se prepararon diversas combinaciones y se elaboraron varios lotes de queso Armada, variedad sobado, siguiendo el procedimiento tecnológico tradicional pero en los que la leche fue pasterizada. En cada lote se llevaron a cabo diversos estudios microbiológicos, bioquímicos y sensoriales durante la maduración con el fin de evaluar los que presentaban las mejores características. Más en concreto, en el trabajo que se presenta se realizó un estudio de la proteólisis mediante el fraccionamiento químico del nitrógeno.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de distintas combinaciones de microorganismos aislados del queso artesanal como cultivos iniciadores en la evolución de las fracciones nitrogenadas del queso de Armada, variedad sobado, a lo largo de la maduración con el fin de poder aplicar los resultados obtenidos del estudio de caracterización del queso de Armada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Elaboración de los quesos

La elaboración de los quesos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Fresno y col (1996) en la Planta Piloto de la Universidad de León e incluía las siguientes fabricaciones:

- a) Lote A: leche cruda de cabra sin añadir cultivo iniciador.
- b) Lote B: Leche pasterizada (LP) + cultivo iniciador comercial
- c) Lote C: LP + cultivo iniciador artesanal I (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*).
- d) Lote D: LP + cultivo iniciador artesanal II (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Enterococcus raffinosus*).
- e) Lote E: LP + cultivo iniciador artesanal III (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*).
- f) Lote F: LP + cultivo iniciador artesanal IV (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Lactobacillus plantarum*).

Los quesos fueron madurados bajo condiciones de temperatura y humedad relativa controladas durante 4 meses.

### Toma de muestras

En cada lote se recogieron muestras de 2 (después de la coagulación y antes del salazonado), 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración. Cada muestra estaba integrada por un queso de aproximadamente 2 Kg.

Las muestras de cuajada y queso fueron trasladadas al laboratorio en neveras a una T<sup>a</sup> de 4°C donde fueron preparadas para los diferentes análisis a realizar.

### Fracciones nitrogenadas

La determinación del Nitrógeno Total en el queso se llevó a cabo por el método Kjeldahl en un equipo Kjeltec System-1002 Distilling Unit y una unidad de digestión Digestion System-6-1007 Digester de la marca Tecator utilizando la Norma FIL-IDF 20 B (1993).

La determinación del Nitrógeno Soluble a pH 4,4 (NS-pH4,4), Nitrógeno Soluble en Ácido Tricloroacético al 12% (NS-TCA12%) y Nitrógeno Soluble en Ácido Fosfotúngstico al 5% (NS-PTA 5%) se llevó a cabo según la técnica propuesta por Bütikofer, Rüegg y Ardö (1993). La cuantificación del Nitrógeno en los extractos de NS-pH4,4, NS-TCA 12% y NS-PTA 5% se llevó a

cabo por el método Kjeldahl en un equipo Kjelttec System-1002 DistillingUnit y una unidad de digestión Digestion System-6-1007 Digester de la marca Tecator utilizando la Norma FIL-IDF 20 B (1993).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran la evolución del contenido en NS-pH 4,4, NS-TCA12% y NS-PTA5%, respectivamente, expresados como porcentaje del Nitrógeno Total, durante la maduración de los lotes de queso de Armada, variedad sobado, elaborados con diferentes mezclas de cultivos iniciadores.

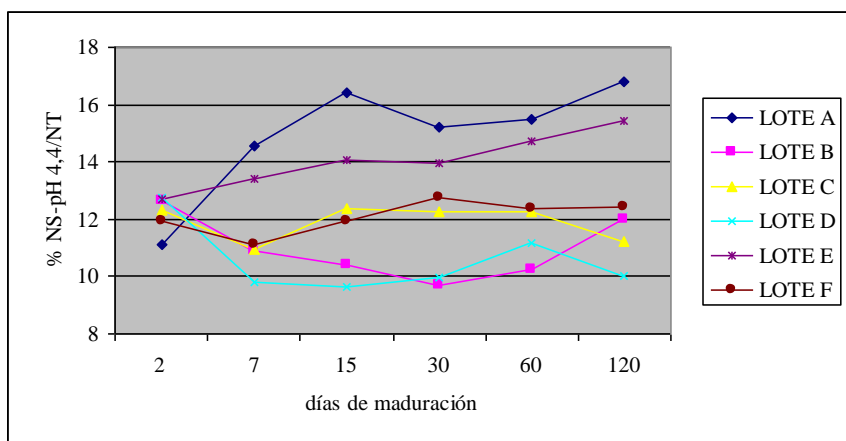


Figura 1. Evolución del porcentaje de Nitrógeno soluble a pH 4,4, expresado como NT, en los distintos lotes de queso de Armada durante la maduración

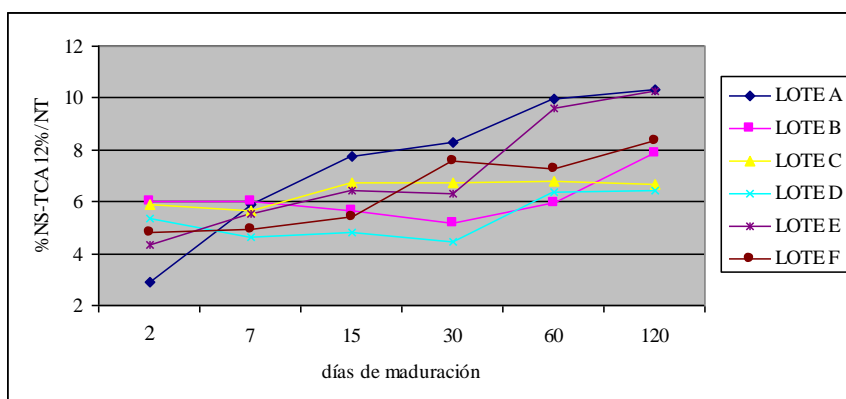


Figura 2. Evolución del porcentaje de Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12%, expresado como NT, en los distintos lotes de queso de Armada durante la maduración

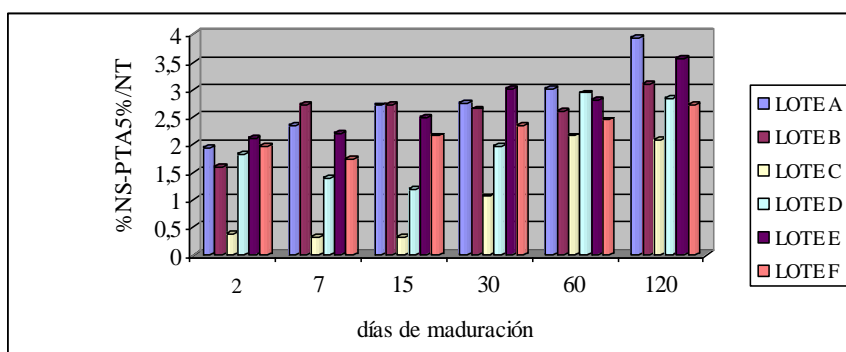


Figura 3. Evolución del porcentaje de Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%, expresado como NT, en los distintos lotes de queso de Armada durante la maduración

La extensión de la proteólisis, que viene determinada por el Nitrógeno Soluble a pH 4,4, expresado como porcentaje sobre Nitrógeno Total (%NS-pH 4,4/NT), fue muy escasa en todos los lotes de queso como demuestra la estabilidad de estos valores a lo largo de toda la maduración, los cuales oscilaron entre 12-14%. Por lotes, el A y E presentaron los mayores porcentajes. Por el contrario, la profundidad de la proteólisis, expresada como % Nitrógeno Soluble en TCA 12% sobre Nitrógeno Total (%NS-TCA12%/NT), fue más intensa, si bien existieron diferencias entre lotes. Los lotes A, E y, en menor medida, F mostraron una evolución creciente del % NS-TCA12%/NT durante toda la maduración, mientras que el resto de lotes permanecieron constantes. Cuando expresamos el NS-TCA12% como porcentaje del NS-pH 4,4 obtuvimos unos valores que, en general, se incrementaron desde un 40% en las cuajadas hasta un 60-65% en los quesos de cuatro meses. Estos valores son indicativos de la acción de proteasas y peptidasas liberadas por las bacterias lácticas presentes en el queso.

El contenido en Nitrógeno Soluble en PTA5%, expresado como porcentaje del Nitrógeno Total (%NS-PTA5%/NT), mostró un incremento más o menos acusado en todos los lotes de queso, si bien los mayores valores se obtuvieron para los lotes A y E. Cuando el NS-PTA5% se expresaba como porcentaje del NS-TCA12%, comprobamos que durante la maduración pasaba de representar un 50% en las cuajadas a un 35% en los quesos de cuatro meses, siendo determinante de una baja actividad aminopeptidasa y de un importante acúmulo de péptidos. Este hecho estaría relacionado con la baja actividad del agua y alto contenido S/H durante las últimas fases de maduración que actuarían inhibiendo o dificultando la acción de las aminopeptidasas y de otras peptidasas.

**Agradecimientos:** Los autores desean expresar su agradecimiento al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la subvención de este proyecto de investigación (**Proyecto AGL2001-0092-CO2-01**).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Bütikofer, U., Rüegg, M. y Ardö, Y. 1993. *Lebensmittel-Wissenschaft Technology*, 26, 271-275.
- Carmona, M.A., Sanjuan, E., Gómez, R. & Fernandez-Salguero, J. 1999. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 737-744.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuviel, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandez, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulous, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. & Rodríguez, E. 1997. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., González-Prieto, J. & Bernardo, A. 1996. *Food Chemistry*, 55, 225-230.
- Gómez, M.J., Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M. & Medina, M. 1999. *Journal of Dairy Science*, 82, 2300-2307.
- Hayaloglu, A.A., Guven, M., Fox, P.F., Hannon, J.A. & McSweeney, P.L.H. 2004. *International Dairy Journal*, 14, 599-610.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G. & Malcata, F.X. 2004. *Food Microbiology*, 21, 233-240.
- Medina, M., Fernández del Pozo, B., Rodríguez-Marín, M.A., Gaya, P. & Núñez, M. 1991. *Journal of Dairy Research*, 58, 355-361.
- Mendía, C., Ibáñez, F.J., Torre, P. & Barcina, Y. 2000. *Food Control*, 11, 195-200.
- Olarte-Martinez, C., Sanz, S., Gonzalez-Fandos, E. & Torre, P. 2000. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 421-429.
- Perez, G., Cardell, E. & Zarate, V. 2004. *Milchwissenschaft*, 59, 155-158.
- Reinheimer, J.A., Binetti, A.G., Quiberoni, A., Bailo, N.B., Rubiolo, A.C. & Giraffa, G. 1997. *Journal of Food Protection*, 60, 59-63.
- Roa, I., Mendiola, F.J., Gonzalez, J. & Mas, M. 1997. *Alimentaria*, 285, 45-49.

## **COMUNICACIÓN A CONGRESO II**

**Modificaciones en el perfil peptídico del queso de Armada,  
variedad sobado, elaborado con distintos cultivos iniciadores  
autóctonos a lo largo de la maduración**





RIOJAFORUM Palacio de Congresos y Auditorio de La Rioja

# CESI 2010

VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos

LOGROÑO 6, 7 y 8 DE OCTUBRE DE 2010

Organiza:



Centro Tecnológico  
de la Industria Cárnica  
de La Rioja



Centro de Innovación y  
Tecnología Alimentaria  
de La Rioja

COPYRIGHT: VI CONGRESO ESPAÑOL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS. CESIA 2010

© Textos: Los autores

ISBN: 978-84-7359-654-1

Diseño y Maquetación: Grafos Publicidad

Impresión: Ochoa Impresores

Depósito Legal: LR-284-2010

# MODIFICACIONES EN EL PERFIL PEPTÍDICO DEL QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO, ELABORADO CON DISTINTOS CULTIVOS INICIADORES AUTÓCTONOS A LO LARGO DE LA MADURACIÓN

Fernández, D., Arenas, R., Herreros, M.A., Tornadijo, M. E., y Fresno, J.M.\*

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria. Universidad de León  
24071 León, España  
\*E-mail: [jmfreb@unileon.es](mailto:jmfreb@unileon.es)

**Palabras Clave:** queso de Armada; cultivo iniciador autóctono; perfil de péptidos; maduración.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de distintas combinaciones de microorganismos autóctonos utilizados como cultivo iniciador en la evolución del perfil de péptidos a lo largo de la maduración del queso de Armada, variedad sobado.

Se elaboraron seis lotes de queso: lote A: leche cruda de cabra sin añadir cultivo iniciador; lote B: Leche pasteurizada (LP) + cultivo iniciador comercial (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*); lote C: LP + cultivo iniciador artesanal I (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*); lote D: LP + cultivo iniciador artesanal II (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Enterococcus raffinosus*); lote E: LP + cultivo iniciador artesanal III (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*); lote F: LP + cultivo iniciador artesanal IV (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Lactobacillus plantarum*).

El análisis del perfil de péptidos se llevó a cabo en muestras de 2 (después de la coagulación y antes del salazonado) 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa sobre extractos solubles en agua fraccionados con membranas de un tamaño molecular de corte de 10000 dalton. En todos los lotes de queso estudiados, la zona mayoritaria fue la hidrófoba. No obstante, el porcentaje de la misma variaba entre lotes, siendo mayoritaria en casi todos a excepción del lote A, elaborado con leche cruda, donde no representaba más del 40% del total de péptidos.

La zona hidrófoba, por lo general, fue disminuyendo a lo largo de la maduración del queso, a la vez que se iba incrementando en diferente medida las otras 2 zonas: hidrofílica y de hidrofobicidad intermedia. El mayor descenso en el porcentaje de la zona hidrófoba se observó en el lote F.

## INTRODUCCIÓN

El queso de Armada es un tipo de queso artesanal en forma de prisma o troncopiramidal irregular, con la cara superior marcada por los pliegues de tela utilizada como molde. Su tamaño es de 15 a 25 cm por 9 cm. Su peso oscila entre los 1,5 y los 3 kg. Su corteza es cerrada pero rugosa, reblandecida, algo untuosa y enmohecida de color blanco, azulado

o verdoso. El interior es cerrado, granuloso, sin ojos, salpicando de pequeñas grietas con el mismo moho que la corteza, y de color amarillo. Su sabor fuerte, agrio, picante, ligeramente amargo, con trozos salados y otros sosos, pero muy aromático y graso al paladar.

La maduración del queso lleva consigo una serie de cambios bioquímicos, siendo uno de los más importantes la proteólisis. Este proceso tiene una especial relevancia en el desarrollo del flavor y en la textura del queso debido a la transformación de las caseínas en péptidos de diferentes tamaños y pesos moleculares y en aminoácidos libres. Sin embargo, si se produce un cúmulo de péptidos hidrofóbicos en la masa del queso pueden causar la aparición de sabores amargos (González de Llano et al., 1995) afectando a la calidad final del mismo.

En nuestro estudio a partir de una selección de 31 cepas de los géneros *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Lactobacillus spp.*, aisladas previamente del queso artesanal, se prepararon diversos cultivos iniciadores autóctonos y se elaboraron varios lotes de queso Armada, variedad sobado, siguiendo el procedimiento tecnológico tradicional.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de distintas combinaciones de microorganismos aislados del queso artesanal como cultivos iniciadores en la evolución de las fracciones peptídicas del queso de Armada, variedad sobado, a lo largo de la maduración.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se elaboraron seis lotes de queso, descritos a continuación, en la Planta Piloto de la Universidad de León siguiendo el procedimiento descrito por Herreros et al. (2007).

Lote A: leche cruda de cabra sin añadir cultivo iniciador.

Lote B: Leche pasteurizada (LP) + cultivo iniciador comercial (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*).

Lote C: LP + cultivo iniciador artesanal I (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*).

Lote D: LP + cultivo iniciador artesanal II (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Enterococcus raffinosus*).

Lote E: LP + cultivo iniciador artesanal III (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*).

Lote F: LP + cultivo iniciador artesanal IV (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Lactobacillus plantarum*).

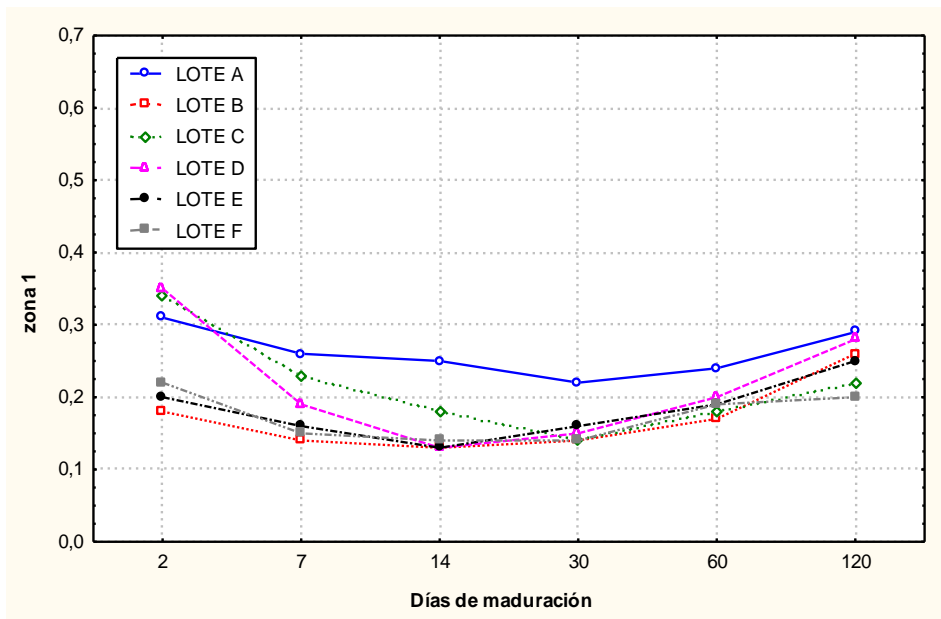
En cada lote se recogieron muestras de 2 (después de la coagulación y antes del salazonado), 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración. Cada muestra estaba integrada por un queso de aproximadamente 2 kg.

El análisis del perfil de péptidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa sobre extractos solubles en agua fraccionados con membranas de un tamaño molecular de corte de 10000 daltons, siguiendo el procedimiento descrito por Fernández et al. (2006), y utilizando una longitud de onda de 214 nm. En cada cromatograma a partir de los permeados se establecieron arbitrariamente 3 zonas en función del tiempo de retención (Parra et al., 2000): zona 1 ó hidrofílica (13-22 minutos), zona 2 ó de hidrofobicidad intermedia (22-30 minutos) y zona 3 ó muy hidrofóbica (30-45 minutos). Los resultados se establecieron como áreas relativas obtenidas al dividir la suma de todas las áreas de los picos del cromatograma incluidos en cada zona por el área total de picos del cromatograma.

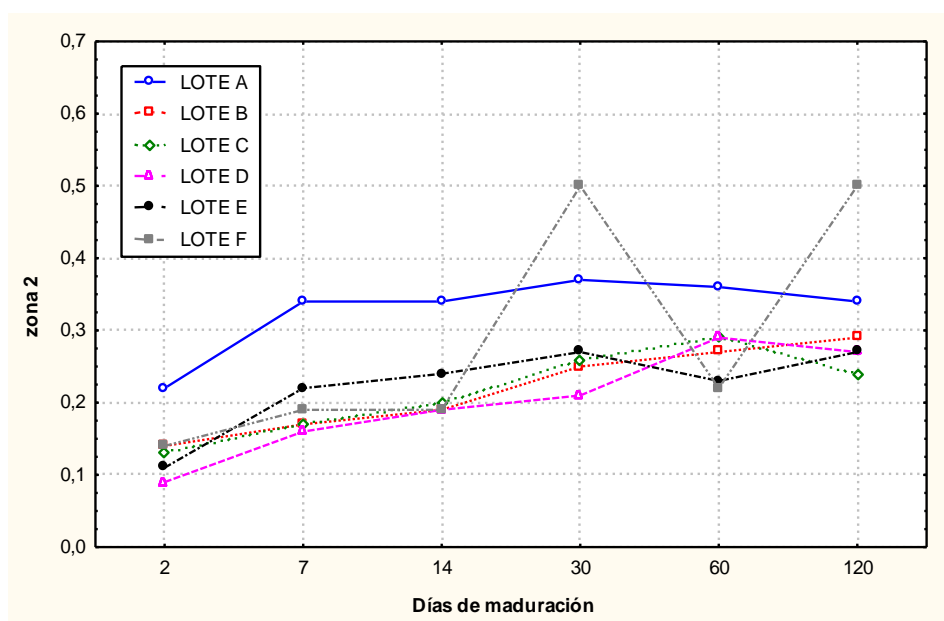
El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el método LSD para un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) mediante el programa informático Statistica version 6.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

## RESULTADOS

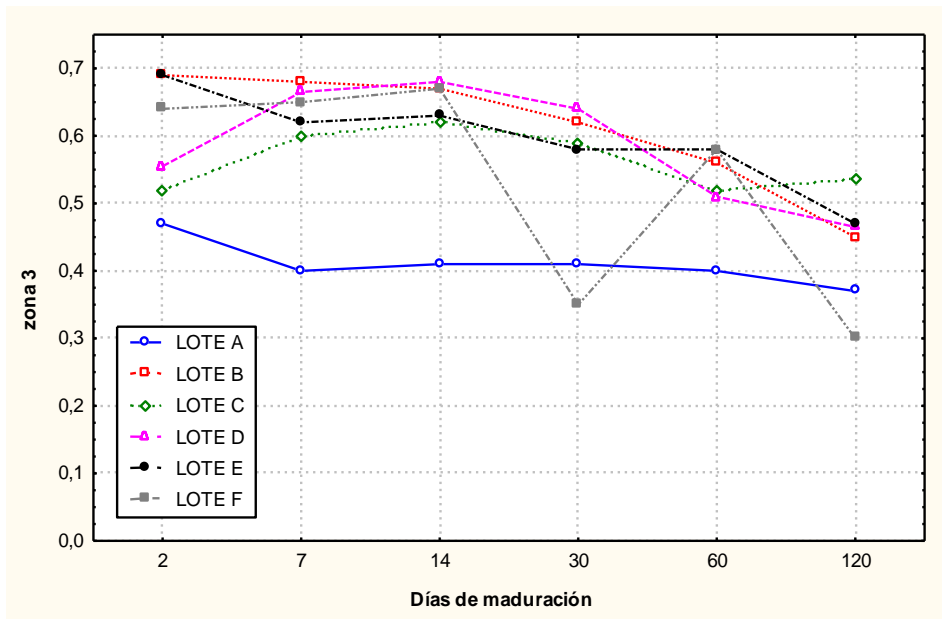
En las Figuras 1, 2 y 3 se representa la evolución del contenido de péptidos en las zonas 1 (hidrofílica), zona 2 (hidrofobicidad media) y zona 3 (hidrofóbica), respectivamente, a lo largo de la maduración de los 6 lotes de queso de Armada elaborados con distintos cultivos iniciadores autóctonos.



**Figura 1.** Evolución del perfil de péptidos en la zona 1 (hidrofílica) durante la maduración de los diferentes lotes de queso de Armada.

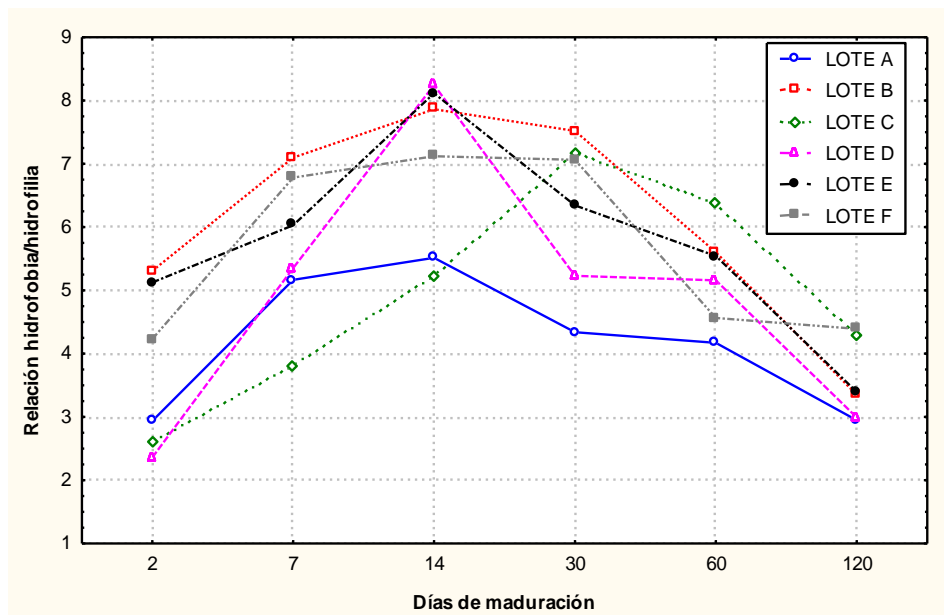


**Figura 2.** Evolución del perfil de péptidos en la zona 2 (medio hidrofóbica) durante la maduración de los diferentes lotes de queso de Armada.



**Figura 3.** Evolución del perfil de péptidos en la zona 3 (hidrofóbica) durante la maduración de los diferentes lotes de queso de Armada.

En la Figura 4 se representa la evolución seguida por la relación entre péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la maduración de los diferentes lotes del queso de Armada.



**Figura 4.** Evolución de la relación péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos durante la maduración de los diferentes lotes del queso de Armada.



En todos los lotes de queso estudiados, la zona mayoritaria fue la hidrófoba. No obstante, el porcentaje de la misma variaba entre lotes, siendo mayoritaria en casi todos a excepción del lote A, elaborado con leche cruda, donde no representaba más del 40% del total de péptidos.

La zona hidrófoba, por lo general, fue disminuyendo a lo largo de la maduración del queso, a la vez que se iba incrementando en diferente medida las otras 2 zonas: hidrofílica y de hidrofobicidad intermedia. El mayor descenso en el porcentaje de la zona hidrófoba se observó en el lote F. Sería deseable que el nivel de péptidos hidrofóbicos en las muestras de queso de Armada fuera más bajo debido a los problemas de sabores anómalos que conllevan. Sin embargo, los bajos niveles de pH y alta concentración de sal/humedad que se instauraron en el queso desde el inicio de la maduración actuaron inhibiendo, en gran medida, la actividad de peptidasas y aminopeptidasas, lo cual contribuyó a su acumulación.

No obstante, si observamos la Figura 4 podemos comprobar cómo a medida que aumenta el tiempo de maduración se produjo un descenso muy acusado en la mayoría de los lotes del queso de Armada en la relación hidrofobia/hidrofilia, al igual que había descrito Mallatou et al., (2004), lo cual nos permitió concluir que en esta variedad de queso se requerirá de tiempos de maduración en torno a 4 meses para evitar la aparición de sabores anómalos en el queso.

## CONCLUSIONES

Estos datos nos permitieron concluir que los quesos del lote A presentarán unos menores sabores anómalos y amargor que el resto de lotes debido a un menor contenido en péptidos hidrofóbicos. No obstante, la presencia de lactobacilos en el cultivo iniciador contribuyó significativamente a la reducción de los péptidos hidrofóbicos a lo largo de la maduración.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la subvención de este proyecto de investigación (**Proyecto AGL2001-0092-CO2-01**).

## BIBLIOGRAFIA

- Fernández, D., Arenas, R., Prieto, B., Tornadijo, M. E. and Fresno, J. M. 2006. Influencia del tratamiento térmico y del tipo de leche en la formación de péptidos a lo largo de la maduración del queso Zamorano con D.O.P. Libro de actas del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba (Argentina), página 387.
- González de Llano, D., Polo, M.C. and Ramos, M. 1995. Study of proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Science*, 78, 1018–1024.
- Herreros, M.A., Arenas, R., Sandoval, M.H., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. 2007. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. *International Dairy Journal*, 17, 328-335.

- Mallatou, H., Pappa, E. C. and Boumba, V. A. 2004. Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 14, 977–987.
- Parra, L., Casal, V. and Gomez, R. 2000. Contribution of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IFPL 359 and *Lactobacillus casei* subsp *casei* IFPL 731 to the Proteolysis of Caprine Curd Slurries. *Journal of Food Science*, 65, 711-715.



## **COMUNICACIÓN A CONGRESO III**

**Cambios en el contenido de aminoácidos libres durante la maduración del queso de Armada, variedad sobado, elaborado con distintos cultivos iniciadores autóctonos a lo largo de la maduración**



RIOJAFORUM Palacio de Congresos y Auditorio de La Rioja

# CESI 2010

VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos

LOGROÑO 6, 7 y 8 DE OCTUBRE DE 2010

Organiza:



Centro Tecnológico  
de la Industria Cárnica  
de La Rioja



Centro de Innovación y  
Tecnología Alimentaria  
de La Rioja

COPYRIGHT: VI CONGRESO ESPAÑOL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS. CESIA 2010

© Textos: Los autores

ISBN: 978-84-7359-654-1

Diseño y Maquetación: Grafos Publicidad

Impresión: Ochoa Impresores

Depósito Legal: LR-284-2010

# CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS LIBRES DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO, ELABORADO CON DIFERENTES CULTIVOS INICIADORES AUTÓCTONOS

Fernández, D., Diezhandino, I., Herreros, M.A., Tornadijo, M.E. y Fresno, J.M.\*

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria. Universidad de León  
24071 León, España  
\*E-mail: [jmfreb@unileon.es](mailto:jmfreb@unileon.es)

**Palabras Clave:** queso de Armada; aminoácidos libres; cultivo iniciador autóctono; maduración.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de distintas combinaciones de microorganismos aislados del queso artesanal como cultivos iniciadores en la evolución y contenido de los aminoácidos libres del queso de Armada, variedad sobado, a lo largo de la maduración.

Se elaboraron seis lotes de queso siendo el lote A: leche cruda de cabra sin añadir cultivo iniciador; lote B: Leche pasterizada (LP) + cultivo iniciador comercial (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*); lote C: LP + cultivo iniciador artesanal I (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*); lote D: LP + cultivo iniciador artesanal II (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Enterococcus raffinosus*); lote E: LP + cultivo iniciador artesanal III (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*); lote F: LP + cultivo iniciador artesanal IV (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Lactobacillus plantarum*).

En cada lote se recogieron muestras de 2 (después de la coagulación y antes del salazonado), 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración, llevando a cabo en cada uno de ellos la separación, identificación y cuantificación de 22 aminoácidos libres mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa.

En todos los lotes de queso se produjo un incremento gradual del contenido en aminoácidos libres durante toda la maduración, siendo más acusado a partir del mes de maduración. No obstante, el contenido total de aminoácidos libres fue diferente entre lotes presentando los mayores valores al final de la maduración los quesos del lote A elaborados con leche cruda y los menores el lote C, siendo los mismos de 1984 y 982 mg/100 g de extracto seco, respectivamente.

Los aminoácidos libres mayoritarios, tanto al inicio como al final de la maduración, fueron muy similares en todos los lotes de queso estudiados, siendo los mismos Asn+Ser, Gln+Gly, Arg+Thr, Val, Leu, Lys y el derivado aminoacídico Gaba.

## INTRODUCCIÓN

El trabajo que se presenta forma parte de un proyecto de investigación que se desarrolla en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de

León (ULE) acerca de la caracterización del queso de Armada, variedad sobado. Se trata de un queso elaborado artesanalmente en el Norte de la provincia de León, a partir de leche de cabra o bien en ocasiones de mezcla de vaca y cabra. La finalidad de este proyecto es doble: por una parte, la elaboración de un cultivo iniciador constituido por la combinación de microorganismos aislados de esta variedad artesanal y, por otra, impulsar la fabricación industrial de ésta y otras variedades artesanales de queso que se están elaborando actualmente con cultivos iniciadores comerciales de ámbito general. Estudios previos permitieron reducir el número de cepas aisladas originalmente del queso artesanal hasta 31 sobre las que se realizaron diversas investigaciones de caracterización genética y aptitud tecnológica en profundidad. A partir de estos trabajos se seleccionaron 13 cepas de los géneros *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Lactobacillus spp.* con las que se prepararon diversas combinaciones y se elaboraron varios lotes de queso Armada, variedad sobado, siguiendo el procedimiento tecnológico tradicional.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de distintas combinaciones de microorganismos aislados del queso artesanal como cultivos iniciadores en la evolución y contenido de los aminoácidos libres del queso de Armada, variedad sobado, a lo largo de la maduración.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se elaboraron seis lotes de queso en la Planta Piloto de la ULE siguiendo el procedimiento descrito por Herreros et al. (2007):

Lote A: leche cruda de cabra sin añadir cultivo iniciador.

Lote B: Leche pasterizada (LP) + cultivo iniciador comercial.

Lote C: LP + cultivo iniciador artesanal I (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*).

Lote D: LP + cultivo iniciador artesanal II (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Enterococcus raffinosus*).

Lote E: LP + cultivo iniciador artesanal III (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*).

Lote F: LP + cultivo iniciador artesanal IV (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* + *Lactobacillus plantarum*).

En cada lote se recogieron muestras de 2 (después de la coagulación y antes del salazonado), 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración. Cada muestra estaba integrada por un queso de aproximadamente 2 Kg.

La separación, identificación y cuantificación de los aminoácidos libres se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa, siendo identificados un total de 22 aminoácidos (glutámico, aspártico, histidina, citrulina, taurina, Gaba, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptófano, lisina y las mezclas asparragina+serina, glutamina+glicina y arginina+treonina).

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de Duncan para un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) mediante el programa informático Statistica version 6.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la evolución del contenido de los aminoácidos libres (mg/100 g ES) durante la maduración de seis lotes de queso de Armada elaborados con distintas mezclas de cultivos iniciadores.

**Tabla 1.** Evolución del contenido de aminoácidos libres durante la maduración del queso de Armada, variedad sobado.

LOTE	Días de maduración	ASP	GLU	ASN+SER	GLN+GLY	HIS	CIT	TAU	GABA	ARG+THR	ALA	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	LYS
A	2	7,35	8,35	7,75	10,15	6,10	0,47	2,75	23,93	12,56	2,09	3,06	2,48	12,25	1,60	0,82	7,27	2,12	1,65	8,83
	7	7,74	24,83	7,77	12,94	6,30	1,63	4,53	24,51	23,27	7,36	13,55	3,02	26,90	3,41	4,86	35,94	11,51	4,95	13,56
	14	9,57	29,74	7,81	19,52	6,43	2,20	5,91	30,87	34,33	7,78	16,01	3,03	38,10	4,95	8,00	54,64	22,52	11,71	14,07
	30	9,82	30,08	7,88	47,48	8,71	3,50	7,10	42,97	35,71	9,03	19,31	4,03	44,20	9,31	13,59	82,98	38,85	14,44	17,58
	60	21,64	62,81	16,52	76,26	14,21	3,82	20,20	68,98	49,96	30,17	38,88	11,69	64,60	22,70	29,36	134,97	55,73	22,71	49,06
	120	75,93	307,90	54,65	229,76	20,55	22,37	35,73	148,35	178,56	83,10	52,64	25,94	158,29	36,91	68,55	302,61	81,51	34,25	66,83
B	2	5,91	4,99	12,53	6,51	4,45	0,00	4,87	14,74	10,44	2,70	9,24	6,94	8,17	2,34	0,63	13,84	6,30	7,73	18,09
	7	6,12	6,46	13,91	12,03	10,28	0,00	4,90	34,50	12,66	7,45	14,44	10,21	12,59	4,28	2,06	35,23	14,51	9,27	21,14
	14	7,37	7,23	14,33	13,69	10,96	1,74	5,17	40,34	13,75	7,66	16,86	10,68	14,52	4,40	2,09	36,73	15,11	12,21	26,15
	30	7,92	8,88	15,79	20,17	11,57	2,23	5,56	58,36	14,65	8,13	26,71	11,15	15,86	4,69	2,56	40,21	15,79	14,84	27,16
	60	9,24	10,67	15,87	39,27	14,94	2,84	7,81	64,15	14,82	8,63	33,32	11,66	16,18	6,47	6,67	54,43	15,95	15,69	30,09
	120	25,28	21,73	80,60	349,04	15,06	14,63	45,47	93,82	66,02	38,62	33,85	26,37	72,38	21,93	31,54	180,05	38,93	18,72	147,32
C	2	7,37	6,45	11,42	10,63	3,91	0,00	4,51	31,73	11,87	4,69	8,98	5,18	11,20	1,86	1,78	19,00	5,74	9,07	21,17
	7	7,45	6,97	12,21	11,49	7,84	0,00	4,80	32,59	13,01	5,28	13,52	5,73	11,21	2,04	1,95	22,93	5,80	9,08	22,43
	14	8,09	7,52	12,62	11,91	9,43	0,00	5,09	39,36	14,23	5,48	14,60	6,03	11,63	2,26	1,98	24,87	7,39	9,17	23,56
	30	8,51	9,77	17,90	16,99	11,16	0,00	8,16	39,47	21,10	5,72	15,46	9,88	18,38	3,00	3,03	28,10	8,09	11,40	32,37
	60	10,89	26,71	24,85	79,53	14,01	0,00	15,34	48,14	23,48	11,70	24,97	15,09	29,83	8,00	11,87	81,93	19,82	11,84	52,04
	120	13,22	20,09	61,09	175,17	18,90	0,00	45,00	115,43	44,19	32,07	23,05	23,40	51,59	14,76	18,95	143,83	31,09	19,64	131,32
D	2	7,11	6,14	17,62	16,28	4,53	1,72	5,73	58,64	16,18	8,50	18,17	10,72	21,45	3,10	3,90	46,82	17,55	13,95	25,28
	7	7,57	7,64	18,20	16,80	5,14	2,20	6,70	59,06	16,63	11,33	19,48	11,01	24,12	3,19	4,83	59,77	18,05	15,58	44,78
	14	7,83	8,30	18,47	30,83	5,24	2,74	7,52	62,43	17,37	11,79	26,82	11,03	25,39	3,29	5,23	62,11	19,31	16,27	44,97
	30	8,05	9,27	25,39	47,23	5,54	3,06	15,63	66,07	20,53	13,03	27,99	18,94	35,26	6,85	5,92	68,69	20,92	16,73	50,85
	60	15,32	19,40	25,75	68,13	5,70	3,27	16,81	73,02	27,52	18,48	44,98	19,88	37,19	7,06	13,91	114,47	29,57	27,83	56,92
	120	18,02	70,55	38,03	339,43	7,82	5,87	44,64	119,22	58,16	50,59	31,90	33,10	74,47	20,27	29,78	190,58	38,10	27,32	156,45
E	2	8,75	9,42	17,54	1,84	3,45	3,70	6,47	64,89	13,58	11,13	21,57	8,92	21,46	2,46	3,38	43,88	11,51	15,79	36,67
	7	9,21	10,83	20,84	8,07	10,55	4,11	9,57	76,91	18,94	12,31	26,43	9,48	24,08	2,79	3,97	50,17	14,36	16,87	40,40
	14	10,04	10,85	27,49	32,44	10,87	4,38	14,35	77,79	20,52	14,32	28,29	12,18	25,23	3,45	4,58	68,20	20,20	17,21	40,71
	30	13,05	19,66	30,14	41,62	11,27	5,57	18,57	78,43	24,80	18,80	34,98	14,90	34,63	4,88	6,73	107,32	33,68	19,87	41,44
	60	27,52	26,41	94,45	302,96	11,48	8,32	59,47	137,42	60,66	45,97	42,31	34,54	86,13	14,45	31,11	214,12	48,85	23,69	149,99
	120	27,90	32,53	102,33	449,45	11,54	4,83	54,69	101,79	60,97	40,52	35,18	47,49	76,73	14,84	31,23	184,24	45,52	54,64	148,04
F	2	7,88	7,27	16,29	15,20	0,00	3,51	11,40	66,41	11,05	7,94	22,59	3,34	21,13	2,25	3,53	46,62	10,67	18,89	20,78
	7	8,31	9,27	18,90	18,89	4,81	4,29	14,06	74,22	15,04	8,48	25,73	3,39	23,49	2,25	3,70	54,55	12,76	21,36	22,80
	14	11,18	9,41	21,74	35,10	5,75	4,49	17,53	82,50	21,72	9,30	27,10	5,95	24,03	2,31	5,03	56,13	11,91	26,20	28,44
	30	11,38	10,86	35,39	60,40	5,90	4,57	19,76	91,75	30,72	22,19	33,86	11,04	26,20	6,91	5,41	88,96	12,80	26,65	44,62
	60	14,40	19,52	37,32	118,60	7,45	5,03	32,53	92,51	32,43	41,26	34,19	12,93	48,73	21,08	14,22	146,11	29,12	29,10	51,26
	120	33,42	27,87	68,16	304,80	5,59	5,54	56,98	142,09	69,77	49,40	56,01	27,44	80,36	30,54	31,34	170,91	33,14	36,87	150,84

En todos los lotes de queso elaborados se produjo un incremento del contenido en aminoácidos libres desde valores que oscilaron entre 120-306 mg/100 g de ES en la cuajada hasta 980-1984 mg/100 g ES en los quesos de 4 meses de maduración. En general, el aumento del contenido en aminoácidos totales fue menos acusado durante el primer mes de maduración, donde con la excepción del lote A únicamente se duplicaban los valores presentes en la cuajada. Sin embargo, durante los 3 últimos meses se produjo un aumento muy significativo en el contenido total de aminoácidos libres en todos los lotes de quesos. El lote A fue el que presentó mayor contenido en aminoácidos libres, mientras que los valores más bajos se obtuvieron en los lotes B y C.

En cuanto al perfil aminoacídico pudimos comprobar que los aminoácidos libres mayoritarios (aproximadamente el 75% del total) en las cuajadas fueron Asn+Ser, Gln+Gly, Arg+Thr, Lys, Leu, Pro, Val, Trp y Gaba para todos los lotes de queso de Armada estudiados excepto en el lote A (elaborado con leche cruda) donde la Pro y Trp fueron sustituidos por Asp y Glu. Al final de la maduración, el perfil de aminoácidos libres fue prácticamente similar en todos los lotes, estando representado el mismo por Asn+Ser, Gln+Gly, Gaba, Arg+Thr, Val, Leu y Lys, excepto en el caso del lote A donde la Asn+Ser y Lys fueron sustituidos por Glu, Ala y Phe.

Un aspecto que nos resultó llamativo fue la presencia de Gaba en todos los lotes del queso de Armada elaborados, y fundamentalmente en las cuajadas, donde resultó ser el derivado aminoacídico más importante llegando a representar en torno al 20% del contenido total de aminoácidos libres. Sin embargo, al final de la maduración, la proporción de este derivado procedente de la descarboxilación del ácido glutámico, con respecto al total de aminoácidos libres del queso se redujo hasta valores de aproximadamente 7-10%. Algunos autores (Laleye et al., 1987) han relacionado la presencia de Gaba con el desarrollo de fermentaciones anormales en los quesos, que conllevarían la aparición de sabores indefinidos. Sin embargo, Ardo (2006) ha señalado que el impacto del Gaba en el flavor no es conocido, aunque dicho impacto podría venir determinado por el descenso en el contenido de Glu debido a la acción de la glutamato descarboxilasa, el cual es conocido que contribuye al sabor umami y a la aparición de sabores agradables.

La actividad glutamato descarboxilasa ha sido raramente descrita en cepas de *Lactococcus lactis* utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración del queso, pero si frecuentemente en cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus spp.* Este hecho podría explicar el aumento en el contenido de Gaba en todos los lotes del queso de Armada durante la maduración,

La evolución y contenido de los aminoácidos libres durante la maduración en los distintos lotes de queso de Armada estuvo condicionada en gran medida por el pH, actividad del agua y % sal/humedad. Los mayores contenidos de aminoácidos libres en el lote A (elaborado con leche cruda) están relacionados con los altos valores de pH de los quesos durante toda la maduración, ya que en ningún caso fueron inferiores a 5,0 a diferencia del resto de lotes en que prácticamente desde el inicio de la maduración se mantuvieron constantes en torno a 4,5-4,7. Los bajos pHs actuarían inhibiendo la actividad de la enzima coagulante y de peptidasas y aminopeptidasas microbianas. Sin embargo, los valores obtenidos para los aminoácidos libres totales en los quesos elaborados con el cultivo iniciador autóctono fueron muy superiores, en general, en relación al queso de Armada artesanal. Estas diferencias se podrían explicar por los bajos valores de pH y actividad de agua y altos porcentajes de sal/humedad en queso artesanal con respecto a los lotes elaborados con leche pasteurizada. Sin embargo, los valores de los parámetros físico-químicos anteriores fueron similares en el queso artesanal y el elaborado con leche pasteurizada, por lo que las diferencias en el grado de proteólisis vendrán determinadas en gran medida por el tipo de microorganismos utilizados en el cultivo iniciador autóctono y por el mayor control de las condiciones de temperatura y humedad relativa durante la maduración de los quesos, permitiendo una deshidratación más gradual y un mejor desarrollo de las bacterias lácticas presentes.

## CONCLUSIONES

El lote A (leche cruda) fue el que mayor contenido total en aminoácidos libres presentó al final de la maduración. Los lotes B, D, E y F presentaron cantidades totales intermedias y el lote C presentó los menores niveles.

El perfil de aminoácidos libres mayoritarios al final de la maduración del Lote A fue Glu, Gln + Gly, Gaba, Arg + Thr, Ala, Val, Leu, Phe correspondiendo con un 75% del total de los mismos para este periodo de maduración. Mientras que el resto de lotes el perfil mayoritario se correspondió con Gln + Gly, Arg + Thr, Gaba, Val, Leu, Lys, Ans + Ser (excepto en el lote D), Tau (lotes C, E y F) y Glu (sólo el lote D) que representaba el 75% aproximadamente.



La histidina y citrulina presentaron valores muy bajos; además, la citrulina no fue detectada para el lote C.

A lo largo de la maduración, independientemente del lote, se observaron diferencias significativas, aumentando el contenido en aminoácidos a lo largo de la misma. De igual manera, se detectaron diferencias significativas en el contenido en aminoácidos libres entre los diferentes lotes de queso elaborados, lo cual resultó indicativo de la existencia de una relación entre las diferentes cepas utilizadas y su efecto sobre la profundidad de la proteólisis del queso de Armada, variedad sobado.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores desean expresar su agradecimiento al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la subvención de este proyecto de investigación (**Proyecto AGL2001-0092-CO2-01**).

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Ardo Y. 2006. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, 24, 238-242.
- Herreros, M.A., Arenas, R., Sandoval, M.H., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. 2007. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. *International Dairy Journal*, 17, 328-335.
- Laleye, L. C., Simard, R. E., Gosselin, C., Lee, B. H. and Giroux, R. N. 1987. Assessment of Cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines. *Journal of Food Science*, 52, 303–307, 311.



## **IV. DISCUSIÓN**



#### IV.1. CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO

En el desarrollo de las características organolépticas de los quesos influyen varios factores: tipo de leche, calidad microbiológica, tecnología de elaboración, etc. La microbiota nativa de la leche, en particular las bacterias lácticas (BAL), o en su caso, los cultivos iniciadores añadidos, desempeñan un papel principal en el desarrollo del flavor durante la maduración de los quesos (Ayad y col., 2000; Awad y col., 2007; Randazzo y col., 2010). Un cultivo iniciador se puede definir como una preparación microbiana de un concentrado de células, de al menos un microorganismo, diseñado para ser añadido a un material crudo con la finalidad de producir un alimento fermentado. Un cultivo iniciador funcional es aquel que posee una propiedad funcional inherente como: contribuir a la salubridad de los alimentos u ofrecer una o más ventajas organolépticas, tecnológicas, nutritivas o para la salud. La adición de cultivos iniciadores seleccionados a un material crudo para promover su fermentación redundante en un alto grado de control del proceso fermentativo y en la estandarización del producto final.

El grupo de las BAL ocupa un papel central en los procesos de producción de alimentos fermentados (Leroy y De Vuyst, 2004). Las BAL llevan a cabo una rápida acidificación del material crudo a través de la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Además, la capacidad de producir ácido acético, etanol y compuestos del aroma, así como bacteriocinas, exopolisacáridos y varios enzimas también es importante.

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son péptidos o proteínas de bajo peso molecular con un modo de acción antibacteriano dirigido principalmente frente a bacterias Gram (+). Las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas pueden tener aplicación en la conservación de alimentos a causa de sus ventajas microbiológicas, fisiológicas y tecnológicas (Cleveland y col., 2001; Chen y Hoover, 2003). Muchas bacteriocinas son activas frente a patógenos y microorganismos alterantes de alimentos, tales como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Bizani y col., 2008).

Los quesos artesanales pueden constituir una fuente de cepas con propiedades fisiológicas o bioquímicas de interés tecnológico. La capacidad acidificante, proteolítica o lipolítica puede contribuir al desarrollo del aroma y textura de los quesos. Los cultivos iniciadores constituidos por cepas de BAL provenientes de tales quesos y seleccionadas en base a su perfil de actividad enzimática podrían tener aplicación a escala industrial en la elaboración tradicional de quesos, contribuyendo a garantizar su calidad higiénica y tecnológica (Hébert y col., 2000; Benkes y col., 2001; De Vuyst y col., 2002; Minervini y col., 2009).

Los cultivos iniciadores que presentan resistencia a los fagos en la industria láctea constituyen una ventaja tecnológica. La resistencia a los fagos puede ser ocasionada por mecanismos de resistencia naturales (restricción y modificación de enzimas), prevención del desarrollo intracelular de los fagos, impidiendo la adsorción de los fagos y así la infección o por estrategias de defensa intracelulares (Forde y Fitzgerald, 1999; Sturino y Klaenhammer, 2004). Por tanto, las cepas que han adquirido una resistencia a los fagos pueden tener amplia aplicación en la industria láctea. En este sentido los fermentos complejos o naturales tienen la ventaja de no presentar graves problemas de fagos

Probablemente la propiedad más importante de las BAL que se emplean como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos sea la capacidad de acidificación inicial de la leche (Cogan y col., 1997). La acidificación inicial de la leche contribuye a la coagulación y posteriormente a la sinéresis de la cuajada. Las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, cuya capacidad acidificante origine una acidez titulable superior a 0,25 g ácido láctico por 100 mL de leche tras 6 h de incubación, son adecuadas para su utilización como cultivos iniciadores en la elaboración de queso.

Entre las 31 cepas de BAL aisladas del queso de Armada y sometidas a estudio para comprobar su aptitud tecnológica, las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* fueron las que mostraron mayor capacidad acidificante, desarrollando una acidez de 0,40 g 100 mL<sup>-1</sup> de ácido láctico después de 6 horas de incubación y de 0,65-0,70 g 100 mL<sup>-1</sup> de ácido láctico tras 12 h de incubación. La capacidad acidificante de las cepas a las 6 horas de incubación fue similar a la detectada para las cepas de lactococos aislados del queso de Arzúa Ulloa (Menéndez y col., 1998) y de otros quesos de cabra (Requena y col., 1991).

A las 12 h de incubación, las cepas de leuconostoc y de lactobacilos fueron menos acidificantes que las de lactococos al igual que ha sido señalado por otros autores (Ballesteros y col., 2006; Nieto-Arribas y col., 2009), aunque a las 24 h algunas cepas mostraron una producción final de ácido láctico similar o incluso más elevada que las de los lactococos.

Durante la maduración de los quesos se generan compuestos aromáticos debido a la acción de enzimas endógenos, así como por la acción proteolítica y lipolítica de las BAL presentes en el queso. Empleando cepas seleccionadas con elevada actividad proteolítica y/o lipolítica es posible acortar el tiempo de maduración.

El sistema proteolítico de las BAL comprende una proteinasa asociada a la pared celular, varias peptidasas intracelulares, aminopeptidasas con distintas especificidades y sistema de transporte de péptidos y aminoácidos (Kunji y col., 1996; Law, 2001). La actividad proteolítica de las BAL se dirige preferentemente a los productos resultantes de la acción del cuajo sobre la caseína. Además, algunas cepas tienen proteinasas asociadas con la pared celular, que hidrolizan preferentemente la caseína.

Muchos productos lácteos tradicionales obtienen su intensidad de aroma a partir de las bacterias lácticas no integrantes del cultivo iniciador (NSLAB), entre las que se incluyen sobre todo los lactobacilos. No constituyen parte de la microbiota del cultivo iniciador pero se desarrollan en el producto como microbiota secundaria durante la maduración (Beresford y col., 2001). La adición de NSLAB como cultivos adjuntos para la elaboración de queso incrementa el nivel de aminoácidos libres, péptidos y ácidos grasos libres, rindiendo mayor intensidad de flavor y acelerando la maduración de los quesos (Crow y col., 2001; Law 2001). Además, contribuyen a reproducir el flavor de los quesos elaborados con leche cruda cuando se emplea leche pasteurizada (De Angelis y col., 2001; Coolbear y col., 2008; Milesi y col., 2009).

El sistema proteolítico de las BAL puede también contribuir a la liberación de péptidos bioactivos a partir de la leche, con efecto positivo sobre la salud (Wouters y col., 2002; Phelan y col., 2009). Los péptidos bioactivos pueden mejorar la absorción en el tracto gastrointestinal, estimular el sistema inmune, ejercer un efecto

antihipertensivo o antitrombótico, desarrollar actividad antimicrobiana o bien actuar como transporte de minerales, especialmente calcio (Korhonen, 2009).

Las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mostraron los valores más altos de actividad proteolítica, superiores a 2 mM Gly L<sup>-1</sup>. Estos valores superaron también los indicados por otros autores para cepas de lactococos (Mayo y col., 1990; Centeno y col., 1996). Las cepas de lactobacilos mostraron unos valores de actividad proteolítica menores que los encontrados en queso Manchego (Nieto-Arribas y col., 2009).

Las peptidasas intracelulares hidrolizan los péptidos a aminoácidos. Los aminoácidos liberados a partir de los péptidos derivados de la hidrólisis de la caseína pueden contribuir directa o indirectamente al desarrollo del aroma durante la maduración de los quesos (Williams y Banks, 1997; Williams y col., 1998).

No se detectó actividad aminopeptidasa en los extractos libres de células de las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* usando los sustratos Ala-, Lys-, Pro- y Leu-p-nitroanilida (pNA). Otros autores tampoco detectaron (o en su caso fue muy baja) actividad aminopeptidasa en los extractos libres de células de *L. lactis* subsp. *lactis* empleando dichos sustratos (Macedo y col., 2000). Sin embargo, Picón y col. (2010) en un estudio realizado sobre 24 cepas salvajes de *Lactococcus lactis* observaron mayor actividad aminopeptidasa, aunque con grandes variaciones entre cepas, que se atribuyeron al procedimiento utilizado en la rotura de las células, tipo de tampón y condiciones de temperatura utilizadas en los ensayos.

Sólo una cepa de *L. lactis* subsp. *cremoris* y una de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* mostraron actividad Pro-aminopeptidasa y Leu-aminopeptidasa. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* mostraron la actividad aminopeptidasa más alta frente a los derivados Ala-, Lys- y Leu-pNA, siendo especialmente altas las actividades Lys- y Leu-aminopeptidasa.

Las cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* mostraron en general menor actividad aminopeptidasa que las de *Lb. plantarum* y fueron también más altas para los sustratos Lys- y Leu-pNA.

Macedo y col. (2000) también detectaron elevada actividad Leu- y Lys-aminopeptidasa para cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. La mayor actividad



aminopeptidasa en muchas cepas de NSLAB se dirige hacia sustratos conteniendo un aminoácido básico (Lys o Arg) (Williams y Banks, 1997).

Algunas cepas de lactococos mostraron alta actividad dipeptidasa hacia los dipéptidos Leu-Leu, Leu-Gly y Phe-Ala, siendo muy elevada dicha actividad para una cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Las cepas de *Leuconostoc* mostraron actividad dipeptidasa variable.

Algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* tuvieron considerable actividad dipeptidasa, si bien, en general, fue inferior a la de los lactococos. La actividad dipeptidasa de los extractos libres de células de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* fue menor que la observada en los extractos de *Lb. plantarum* y *Lb. brevis*.

La actividad carboxipeptidasa de los extractos libres de células de las BAL fue, por lo general, más baja que la actividad dipeptidasa. De hecho, la actividad carboxipeptidasa es por lo general baja o nula en BAL (Tan y col., 1993). Algunos autores sugieren que la actividad carboxipeptidasa es una propiedad atípica de *Lactococcus* spp. en los cultivos iniciadores comerciales.

La actividad carboxipeptidasa de los extractos libres de células de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* fue menor que la observada en los extractos de *Lactobacillus plantarum* y *Lb. brevis*. También es poco común la actividad carboxipeptidasa entre las cepas de NSLAB aisladas de otras variedades de quesos (Williams y Banks, 1997).

Entre los extractos libres de células de *Lactobacillus plantarum* se detectaron los valores más altos de actividad caseinolítica. Algunos autores han mencionado la elevada capacidad caseinolítica de ciertas especies y cepas de lactobacilos, por lo que podrían jugar un importante papel en la maduración de los quesos (Broome y col., 1991). En cambio, la actividad caseinolítica de los extractos libres de células de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* fue muy baja, al igual que han señalado otros autores en cepas de la misma especie (Requena y col., 1993). Dicha actividad fue también alta para los extractos libres de células de *Lb. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Además de la actividad proteolítica se evaluó la actividad lipolítica y esterolítica de cepas de BAL aisladas del queso de Armada. Dichas propiedades tecnológicas también intervienen en la calidad de los quesos y/o aceleran su

maduración, con influencia en el flavor. En general, la actividad lipolítica y esterolítica de las BAL es baja. Sin embargo, bajos niveles de actividad lipolítica en las cepas del cultivo iniciador pueden tener importancia en el desarrollo del aroma de los quesos, debido al bajo umbral de detección de los compuestos que se derivan de la acción lipolítica y al largo proceso madurativo que experimentan algunos quesos.

Las esterases de las BAL liberan principalmente ácidos grasos de cadena corta, incluso a bajas concentraciones y podrían contribuir al desarrollo del flavor del queso.

La actividad esterasa de las BAL es fundamentalmente intracelular como han señalado varios autores (El Soda y col., 1986; Khalid y Marth, 1990; Lee y Lee, 1990; Oliszewski y col., 2007). Otros autores señalan que en las cepas de lactobacilos y lactococos puede haber esterases ligadas a la pared celular (Ezzat y col., 1993; Crow y col., 1994).

Parece ser que las enzimas que más contribuyen al desarrollo del flavor de los quesos son las lipasas intracelulares y las esterases liberadas tras la lisis celular.

La actividad esterolítica de los extractos libres de células provenientes de los lactococos y leuconostoc aisladas del queso de Armada fue considerable, sobre todo en el caso de algunas cepas. Tres cepas de *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis* TAUL 221, *L. lactis* subsp. *cremoris* TAUL 1239 y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* TAUL 12) mostraron la actividad hidrolítica más elevada frente a los sustratos  $\beta$  naftil butirato y  $\beta$  naftil caprilato. En particular, una cepa de *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351) mostró una elevada actividad enzimática sobre todos los sustratos ensayados, pero en general, la actividad hidrolítica fue mayor sobre los naftil derivados de cadena corta (C4 y C8) que sobre los esterificados con ácidos grasos de cadena larga (C14 y C18).

Las cepas de leuconostoc también mostraron actividad esterolítica principalmente sobre los  $\beta$  naftil derivados de cadena corta (C4 y C8).

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* evidenciaron una actividad esterolítica principalmente dirigida sobre los  $\beta$  naftil caprilato y miristato, mientras que la actividad esterolítica de las cepas de *Lactobacillus brevis* fue similar para los ésteres

C4, C8 y C14. Entre las cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* se detectó baja actividad esterasa sobre los  $\beta$  naftil sustratos empleados.

Con la mayoría de las cepas de BAL ensayadas no se detectó ninguna actividad sobre  $\beta$  naftil estearato, a excepción de alguna cepa de lactococos y lactobacilos que presentaron cierta actividad y la cepa TAUL 1351 de *Enterococcus* con elevada actividad.

#### **IV.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO**

Las bacterias lácticas pueden producir sustancias antimicrobianas con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes. Entre estos compuestos se incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Daeschel, 1989). Los cultivos iniciadores constituidos por BAL que producen bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos pueden garantizar la salubridad y calidad tecnológica de los productos fermentados.

También es interesante conocer la capacidad de resistencia a antibióticos de las cepas que vayan a integrar un cultivo iniciador. De hecho, la microbiota láctica que contamina la leche y la carne obtenida de animales tratados con antibióticos puede incluir cepas de BAL resistentes a los antibióticos (Teuber y col., 1999). Dicha resistencia podría ser transmitida a los humanos a través de la cadena alimentaria. El amplio uso de antibióticos en medicina veterinaria y agricultura puede haber contribuido a la diseminación de resistencias entre la población de BAL presentes en los quesos y otros productos fermentados.

Además, aunque algunas cepas no son patógenas, actúan como reservorio de genes resistentes a los antibióticos que pueden ser transmitidos a cepas patógenas en el tracto intestinal (Lukašová y Šustáčková, 2003). Por consiguiente, aquellas cepas que sean seleccionadas para emplear como cultivos iniciadores en la

elaboración de alimentos deben ser cuidadosamente examinadas para determinar la susceptibilidad a los antibióticos (Teuber y col., 1999; Amor y col., 2007).

La resistencia a antibióticos por sí sola no puede ser considerada un factor de virulencia pero puede constituir un problema en el tratamiento de infecciones oportunistas (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001).

Se estudió la actividad antimicrobiana de las 31 cepas de BAL aisladas del queso de Armada y caracterizadas en función de sus actividades enzimáticas, entre ellas, y dirigida hacia los indicadores *Listeria monocytogenes* (CECT 4031), *Staphylococcus aureus* (CECT 240), *Enterococcus faecalis* (CECT 481) y *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011).

Una vez excluida la acción de los ácidos y del peróxido de hidrógeno, cuatro cepas mostraron actividad bacteriocina al ensayarlas frente al resto de las BAL, para comprobar las posibles interacciones si llegaran a formar parte de un cultivo iniciador. Una de dichas cepas (*Lactobacillus plantarum* TAUL 1539) dirigió su actividad antimicrobiana a 9 cepas de las BAL y también a la cepa de referencia *Lactobacillus plantarum* (CECT 748).

Cuando se estudió la resistencia a los antibióticos de las cepas de BAL se comprobó que mostraban múltiple resistencia a antibióticos. De hecho, tal como recogen varios estudios, las BAL normalmente son resistentes a los principales tipos de antibióticos, tales como  $\beta$  lactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas, etc. (Halami y col., 2000; Rodríguez Alonso y col., 2009).

Se estudió la resistencia de las cepas a los antibióticos del grupo I ( $\beta$  lactámicos que inhiben la síntesis de la pared celular): ampicilina (10  $\mu$ g), augmentine (30  $\mu$ g), cefoxitina (30  $\mu$ g), cefalotina (30  $\mu$ g) y oxacilina (1  $\mu$ g). Las cepas ensayadas fueron más resistentes a la cefoxitina y oxacilina y más susceptibles a la ampicilina y augmentine. En la resistencia a los antibióticos  $\beta$  lactámicos están incluidos enzimas como las penicilinasas y cefalosporinasas (Bush y col., 1995).

Con respecto a los antibióticos del grupo II (no  $\beta$  lactámicos, inhibidores de la pared celular) se estudió la resistencia de las cepas a la vancomicina (30  $\mu$ g) y teicoplanina (30  $\mu$ g). Resultaron resistentes a la vancomicina 14 de 18 cepas y 15

fueron resistentes a la teicoplanina. Todos los leuconostoc y lactobacilos ensayados fueron resistentes a los dos antibióticos, al igual que ha sido señalado por Devirgiliis y col. (2008).

Todos los lactobacilos y leuconostoc aislados del queso de Cabrales (Flórez y col., 2005) fueron resistentes a elevadas concentraciones de vancomicina, mientras que los lactococos y enterococos fueron muy susceptibles. Estos autores hallaron también mayor resistencia múltiple a antibióticos entre los enterococos aislados del queso de Cabrales que entre los lactococos.

Las cepas fueron más susceptibles a la clindamicina y tetraciclina, con un similar grado de resistencia al resto de los antibióticos del grupo III (inhibidores de la síntesis proteica al unirse al ribosoma), entre los que se ensayaron: cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ), clindamicina (2  $\mu\text{g}$ ), rifampicina (5  $\mu\text{g}$ ), tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ) y kanamicina (30  $\mu\text{g}$ ).

Se observó un mayor grado de resistencia entre las cepas con relación a ciertos agentes antimicrobianos del grupo IV. En este grupo se ensayó: ciprofloxacina (5  $\mu\text{g}$ ), nitrofurantoína (300  $\mu\text{g}$ ) y trimetoprim (5  $\mu\text{g}$ ). En general, las cepas fueron resistentes a la ciprofloxacina.

A diferencia de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, otros estudios, como los que se recogen en la Tesis Doctoral de Flórez (2007) indican que las BAL procedentes de quesos tradicionales presentaron pocas resistencias a los antibióticos ensayados. La resistencia a la vancomicina de lactobacilos y leuconostoc se supone una resistencia intrínseca, mientras que la resistencia que mostraron algunas cepas de *Lactococcus lactis* a la tetraciclina es una resistencia posiblemente adquirida. Estos mismos autores señalan que la presencia de cepas de BAL multirresistentes no parece ser un hecho habitual. No obstante, en nuestro estudio se manifestó multirresistencia entre las cepas.

#### **IV.3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE CULTIVOS NATIVOS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL QUESO DE ARMADA ELABORADO CON LECHE PASTERIZADA**

La microbiota autóctona de la leche parece ser el principal factor en el desarrollo de las características peculiares de los quesos elaborados con leche cruda (Grappin y Beuvier, 1997). Por tanto, el empleo de cultivos iniciadores, constituidos por cepas de BAL autóctonas, aisladas de los quesos artesanales y seleccionadas en base a su aptitud tecnológica puede preservar sus características peculiares cuando son elaborados con leche pasteurizada.

Se investigó el efecto de adicionar diferentes cultivos iniciadores (constituidos por cepas seleccionadas de BAL aisladas del queso de Armada, variedad Sobado) sobre las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales del queso de Armada, elaborado con leche pasteurizada.

El estudio de la aptitud tecnológica de las cepas se efectuó sobre 31 cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Armada, variedad Sobado, en diferentes etapas de su maduración: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (8 cepas), *L. lactis* subsp. *cremoris* (4 cepas), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (2 cepas), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (2 cepas), *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (2 cepas), *Lactobacillus plantarum* (5 cepas), *Lb. brevis* (2 cepas), *Lb. casei* subsp. *casei* (6 cepas). Estas 31 cepas fueron seleccionadas entre 171 cepas que previamente fueron evaluadas respecto a su capacidad acidificante, actividad proteolítica (hidrólisis de caseína en agar leche) y actividad lipolítica (hidrólisis de compuestos del Tween) siguiendo los criterios de Núñez y col. (1981), Requena y col. (1991) y Menéndez y col. (1998).

Las 31 cepas fueron sometidas a las siguientes pruebas de aptitud tecnológica: capacidad acidificante, proteolítica, aminopeptidasa, dipeptidasa, carboxipeptidasa, caseinolítica y esterolítica (Herrerros y col., 2003 y Herrerros y col., 2004).

El estudio de las actividades enzimáticas de las BAL aisladas de queso de Armada permitió efectuar una preselección de cepas destinadas a integrar uno o más cultivos iniciadores autóctonos. En este sentido las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TAUL 95 y TAUL 1292 presentaron elevada actividad acidificante y proteolítica, la cepa TAUL 221 destacó por su elevada actividad esterolítica y la cepa TAUL 12 por mostrar considerable actividad esterolítica, además de una elevada actividad dipeptidasa y capacidad de producir compuestos responsables del aroma. Las cepas *L. lactis* subsp. *cremoris* TAUL 1239 y *Enterococcus raffinosus* TAUL

1351 mostraron elevada actividad dipeptidasa y carboxipeptidasa, respectivamente. La cepa TAUL 1351 destacó también por su elevada actividad esterolítica. La cepa *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* TAUL 1795 mostró elevada actividad dipeptidasa y caseinolítica. Además, algunas cepas de *Lactobacillus plantarum*, como la cepa TAUL 1736 mostraron elevada actividad aminopeptidasa y  $\beta$  galactosidasa pudiendo repercutir por tanto en el desarrollo del flavor de los quesos.

La cepa TAUL 1351 adscrita por técnicas moleculares definitivamente a la especie *Enterococcus raffinosus*, fue inicialmente identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* por presentar un perfil bioquímico característico de esta especie.

En función del estudio de la aptitud tecnológica finalmente se seleccionaron las siguientes 5 cepas:

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (TAUL 12), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (TAUL 1795), *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351) y *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736).

Estas cepas fueron combinadas para diseñar 4 cultivos iniciadores destinados a la elaboración de 4 lotes de queso de Armada, empleando leche pasteurizada. Además, se fabricaron otros 2 lotes más, uno con leche cruda y otro con leche pasteurizada, empleando únicamente un cultivo comercial mesófilo de BAL.

El lote A fue elaborado con leche cruda de cabra. El lote B con leche pasteurizada y el cultivo comercial de BAL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*). Los lotes C a F fueron elaborados con leche pasteurizada y los siguientes cultivos iniciadores autóctonos: cultivo iniciador C (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TAUL 1292 y *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* TAUL 12), empleado en la elaboración del lote C; cultivo iniciador C + *Enterococcus raffinosus* TAUL 1351, empleado en la elaboración del lote D; cultivo iniciador C + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* TAUL 1795, empleado en la elaboración del lote E; y cultivo iniciador C + *Lactobacillus plantarum* TAUL 1736, empleado en la elaboración del lote F.

La leche cruda o pasteurizada e inoculada en este caso con los fermentos fue coagulada a 30°C por adición de 15 mL de cuajo comercial (fuerza 1:10.000) por

cada 100 L de leche. Las operaciones subsiguientes fueron realizadas siguiendo el procedimiento de elaboración tradicional del queso de Armada, descrito por Tornadijo y col., 1995.

En total se fabricaron 36 quesos (6 quesos en cada lote), de los que se tomaron muestras al cabo de 2 días (después de la coagulación y antes del salazonado), 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración.

En los quesos elaborados se evaluaron los cambios experimentados en los parámetros físico-químicos, microbiológicos y sensoriales a lo largo de la maduración.

Los lotes producidos a partir de leche pasteurizada inoculada con los cultivos iniciadores experimentaron durante las primeras etapas de la maduración del queso un descenso del pH mayor que el lote elaborado con leche cruda, alcanzando valores de pH inferiores a 5,0 en la cuajada y primera semana de maduración.

El descenso del pH fue sobre todo evidente en los quesos del lote F (elaborados con un cultivo iniciador que incluyó una cepa de *Lactobacillus*), alcanzando valores próximos a 4,0 a los 60 días de maduración. Una evolución similar de pH fue observada por Awad y col. (2007) en quesos para cuya elaboración se emplearon fermentos lácticos mesófilos o termófilos incluyendo lactobacilos. El incremento en la acidez titulable también fue más pronunciado en la cuajada de los lotes elaborados con leche pasteurizada inoculada con los cultivos iniciadores pero después de la coagulación los quesos elaborados con leche pasteurizada experimentaron un incremento de acidez inferior a los elaborados con leche cruda.

La evolución del contenido en lactosa también difirió de unos lotes a otros. En el lote elaborado con leche cruda, la lactosa fue indetectable a partir de la primera semana de maduración. El rápido desarrollo de las BAL, acentuado porque el salado no se efectúa hasta dos días después de la coagulación, contribuyó posiblemente al rápido descenso de la lactosa. Los bajos valores de pH alcanzados por algunos lotes en las primeras etapas de la maduración no fueron óptimos para la estabilidad y actividad de la  $\beta$  galactosidasa, ya que este enzima pierde actividad a un pH de 4,5 (Montanari y col., 2000; Ladero y col., 2005).

Por lo que se refiere a la evolución de los recuentos microbianos durante la maduración de los quesos, los recuentos más elevados para la microbiota aerobia



mesófila total se alcanzaron en la cuajada, a excepción del lote elaborado con leche cruda y el elaborado con leche pasteurizada y el fermento comercial en que los máximos recuentos fueron obtenidos a la semana de maduración. La evolución de los recuentos de la microbiota aerobia mesófila total fue un reflejo de la microbiota láctica que fue la dominante durante la elaboración y maduración del queso de Armada.

El contenido en BAL del lote A (elaborado con leche cruda) se incrementó en la cuajada del orden de 3 a 4 unidades logarítmicas, mientras que el incremento del resto de lotes fue de 1 a 2 unidades logarítmicas.

Los recuentos más elevados de la población de BAL se obtuvieron para todos los lotes en la primera semana de maduración, a partir de este momento descendieron progresivamente hasta el final de la misma, de forma diferente según el lote. El descenso en los recuentos de BAL, en general, y de lactococos en particular, durante la maduración es un fenómeno observado y descrito por varios autores (Martley y Crow, 1993; Menéndez y col., 2000).

Los lotes A y F mostraron elevados recuentos de lactobacilos (obtenidos en agar Rogosa), con valores en torno a 8 log UFC/g que fueron alcanzados después de 7 días de maduración en el lote F y después de 15 días en el lote A.

Los recuentos más altos de *Enterobacteriaceae* fueron obtenidos en los primeros 15 días de maduración para todos los lotes, siendo más elevados como era de esperar en el lote A, elaborado con leche cruda. La contaminación de los lotes elaborados con leche pasteurizada pudo verse favorecida por las operaciones de sobado de la cuajada. Los recuentos de este grupo microbiano descendieron gradualmente durante la maduración y sólo se detectaron al cabo de 60 días de maduración en el lote elaborado con leche cruda. Los lotes elaborados con leche pasteurizada no mostraron recuentos de *Enterobacteriaceae* a partir de los 15 -30 días de la maduración.

La extensión de la proteólisis viene determinada por el Nitrógeno Soluble a pH 4,4 expresado como porcentaje sobre Nitrógeno Total (% NS-pH4,4/NT). Los valores de % NS-pH4,4/NT oscilaron en un rango entre el 10 y el 16% aproximadamente, siendo indicativos de la escasa proteólisis desarrollada en todos los lotes del queso

de Armada durante la maduración. Comparando los lotes, el A y el E presentaron los mayores porcentajes durante toda la maduración.

La profundidad de la proteólisis se expresó como % de Nitrógeno Soluble en TCA 12% sobre Nitrógeno Total ( $\% \text{NS-TCA12\% /NT}$ ). La profundidad de la proteólisis fue más o menos intensa según los lotes, los lotes A, E y en menor medida, el F, mostraron una evolución creciente.

El contenido en Nitrógeno soluble en PTA 5%, expresado como porcentaje del Nitrógeno Total ( $\text{NS-PTA5\%/NT}$ ) constituye un buen índice del grado de actividad aminopeptidasa. La evolución del  $\% \text{NSPTA5\%/NT}$  se caracterizó en todos los lotes por un incremento más o menos acusado durante la maduración de los quesos, pasando de unos valores en la cuajada de aproximadamente 1,5-2% hasta un 3,5% en los quesos de 4 meses. No obstante, se observaron importantes diferencias entre lotes, ya que los quesos del lote C presentaron los valores más bajos durante toda la maduración y los quesos de los lotes A y E mostraron el incremento más acusado con valores en torno al 3,5-4%  $\text{NSPTA5\%/NT}$ .

En términos generales, el lote de queso que mejor cinética de maduración presentó fue el A (elaborado con leche cruda y sin adición de cultivos iniciadores) como demostraron los altos valores de  $\% \text{NS-pH4,4}$ ,  $\% \text{NS-TCA12\%}$  y  $\text{NS-PTA5\%}$ . Respecto al resto de lotes, se observó un efecto positivo del uso de estos cultivos iniciadores autóctonos sobre la proteólisis en el lote E (*Lc lactis* subsp. *lactis* TAUL 1292, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* TAUL 12 y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* TAUL 1795) y F (TAUL 1292 + TAUL 12 + *Lb plantarum* TAUL 1736), los cuales presentaron unos valores de  $\% \text{NS-pH4,4}$  y  $\% \text{NS-TCA12\%}$ , similares a los del lote A durante toda la maduración. En los lotes E y F, el recuento de lactococos disminuyó en 2,5 unidades logarítmicas de los 30 a los 60 días de maduración y experimentó un nuevo descenso de aproximadamente 2 unidades logarítmicas hasta el final de la maduración. Los recuentos de lactococos estuvieron en torno a 5,5 log UFC/g a los 60 días de maduración, lo cual representa una unidad logarítmica inferior a la de los lotes B, C y D y 3 unidades logarítmicas con respecto al lote A y podría relacionarse con la autólisis experimentada por la población de lactococos. Durante la autólisis, las bacterias lácticas liberan gran cantidad de enzimas intracelulares, fundamentalmente peptidasas y aminopeptidasas, las cuales van a contribuir a la maduración del queso (Fox y Mc

Sweeney, 1996; Law y Haandrikman, 1997; Valence y col., 2000). En el lote A es difícil atribuir la proteólisis a un grupo microbiano específico o a una sola especie, debido a la heterogeneidad microbiana del queso de Armada elaborado con leche cruda, siendo el resultado de un complejo equilibrio entre las diversas especies presentes.

La profundidad de la proteólisis fue más acusada que la extensión en todos los lotes de queso de Armada elaborados. Por lo general, en todos los lotes el % NS-TCA12% se incrementó desde un rango del 3-6% en las cuajadas hasta el 6-10% al final de la maduración. El contenido de NS-TCA12% expresado como porcentaje del NS-pH4,4, experimentó un comportamiento muy similar en todos los lotes de queso, pasando de un 40% en las cuajadas hasta un 60-68% en los quesos de 4 meses, independientemente del tipo de cultivo iniciador utilizado. Estos valores fueron muy similares a los obtenidos por Fresno y col. (1997) para el queso de Armada artesanal.

Las diferencias observadas tanto en la extensión como en la profundidad de la proteólisis, entre los diferentes lotes del queso elaborados están determinadas principalmente por la evolución de la microbiota presente en el queso y por el tipo de cultivo empleado cuando se comparan los quesos elaborados con leche pasteurizada y un cultivo iniciador.

Las condiciones ambientales reinantes en cada uno de los lotes de queso a lo largo de la maduración, fundamentalmente en lo que se refiere al pH, actividad de agua y cociente sal/humedad, también repercuten en el grado de proteólisis de los quesos, al condicionar directamente la actividad y/o viabilidad de la microbiota del queso.

Al expresar el NS-PTA5% como porcentaje del NS-TCA12% comprobamos un comportamiento diferente entre los distintos lotes estudiados. El lote A fue el que mayor % NS-PTA5%/NS-TCA12% presentó en las cuajadas, reduciéndose el mismo a lo largo de la maduración hasta alcanzar unos valores finales del 30-38%. Por el contrario, el NS-PTA5%/NS-TCA12% de los quesos del lote B (elaborado con cultivo iniciador comercial), se incrementó en casi un 100% durante el primer mes de maduración, a partir del cual se redujo hasta alcanzar el final de la misma a valores muy similares a los obtenidos en el lote A. El porcentaje de NS-PTA5%/NS-TCA12% en los quesos del lote D se incrementó durante los primeros 30 días de maduración

permaneciendo a partir de ese momento constante, alcanzando al final de la misma valores del 45%. El porcentaje de NS-PTA5%/NS-TCA12% en los lotes E y F se mantuvo constante durante prácticamente toda la maduración con valores en torno al 40%, si bien en el lote E, su porcentaje se redujo durante los 2 últimos meses de maduración hasta valores similares a los obtenidos en los lotes A, B y C.

Es deseable que el nivel de péptidos hidrofóbicos en el queso de Armada sea bajo debido a los problemas de sabores anómalos que conllevan. Sin embargo, el porcentaje de la zona hidrófoba fue mayoritaria en todos los lotes a excepción del lote A, elaborado con leche cruda. Los bajos niveles de pH y la alta concentración de sal/humedad instaurados en el queso desde el inicio de la maduración actúan inhibiendo, en gran medida, la actividad de peptidasas y aminopeptidasas, lo cual contribuye a la acumulación de péptidos hidrofóbicos. La relación seguida por la relación entre péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la maduración se caracterizó por un descenso muy acusado en la mayoría de los lotes. El mayor descenso se observó en los lotes D y F en las últimas fases de la maduración, siendo el lote F el que presentó una relación entre péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos más baja a los 2 meses de maduración y el lote D a los 4 meses. En este sentido cabe señalar que la presencia de lactobacilos en el cultivo iniciador contribuyó significativamente a la reducción de los péptidos hidrofóbicos a lo largo de la maduración. El acusado descenso en la relación péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos con el transcurso de la maduración del queso de Armada permite concluir que en esta variedad de queso se requieren tiempos de maduración de al menos 2 meses para evitar la aparición de sabores anómalos en el queso.

Los valores de las distintas fracciones nitrogenadas fueron superiores a los descritos por Fresno y col. (1997) en el queso de Armada artesanal, si bien las mayores diferencias se establecieron en el % NS-pH4,4/NT, que en la variedad artesanal se mantuvo en unos valores constantes de 7-9% durante la maduración.

La tendencia seguida por el contenido en aminoácidos libres durante la maduración del queso de Armada fue prácticamente similar en todos los lotes a la descrita previamente para el % NS-PTA5%/NT. En todos los lotes de queso elaborados se produjo un incremento del contenido en aminoácidos libres desde valores que oscilaron entre 120-306 mg/100 g de ES en la cuajada hasta 980-1984 mg/100g ES en los quesos de 4 meses de maduración (Fernández y col., 2010).

Estos valores fueron superiores a los obtenidos en el queso Armada artesanal (Fresno y col., 1997) pero similares a los descritos por Franco y col. (2003) para el queso Babia-Laciana. En general, el aumento del contenido en aminoácidos totales fue menos acusado durante el primer mes de maduración donde, con la excepción del lote A, únicamente se duplicaban los valores presentes en la cuajada. Sin embargo, durante los 3 últimos meses se produjo un aumento muy significativo en el contenido total de aminoácidos libres en todos los lotes de quesos. El lote A fue el que presentó mayor contenido en aminoácidos libres, mientras que los valores más bajos se obtuvieron en los lotes B y C.

En cuanto al perfil aminoacídico pudimos comprobar que los aminoácidos libres mayoritarios (aproximadamente el 75% del total) en las cuajadas fueron Asn+Ser, Gln+Gly, Arg+Thr, Lys, Leu, Pro, Val, Trp y Gaba para todos los lotes de queso de Armada estudiados, excepto en el lote A (elaborado con leche cruda) donde la Pro y Trp fueron sustituidos por Asp y Glu. Al final de la maduración, el perfil de aminoácidos libres fue prácticamente similar en todos los lotes, estando representado el mismo por Asn+Ser, Gln+Gly, Gaba, Arg+Thr, Val, Leu y Lys, excepto en el caso del lote A donde la Asn+Ser y Lys fueron sustituidos por Glu, Ala y Phe. El perfil aminoacídico del lote A fue el más parecido al descrito para la variedad de queso de Armada artesanal (Fresno y col., 1997), si bien la proporción de Pro en éste fue significativamente mayor que en el elaborado en la planta piloto.

Un aspecto que nos resultó llamativo fue la presencia de Gaba fundamentalmente en las cuajadas en todos los lotes del queso de Armada elaborados representando en torno al 20% del contenido total de aminoácidos libres. Sin embargo, al final de la maduración, la proporción de este derivado procedente de la descarboxilación del ácido glutámico, con respecto al total de aminoácidos libres del queso se redujo hasta valores de aproximadamente 7-10%. Algunos autores (Layele y col., 1987) han relacionado la presencia de Gaba con el desarrollo de fermentaciones anormales en los quesos, que conllevarían la aparición de sabores indefinidos. Sin embargo, Ardo (2006) ha señalado que el impacto del Gaba en el sabor no es conocido, aunque dicho impacto podría venir determinado por el descenso en el contenido de Glu debido a la acción de la glutamato decarboxilasa, el cual es conocido que contribuye al sabor umami y a la aparición de sabores agradables.

La actividad glutamato decarboxilasa ha sido raramente descrita en cepas de *Lactococcus lactis* utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración del queso, pero si frecuentemente en cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus spp.* Este hecho podría explicar el aumento en el contenido de Gaba en todos los lotes del queso de Armada durante la maduración, ya que el nivel de lactobacilos se incrementa de manera significativa a lo largo de la misma. Además, el mayor contenido de Gaba en los lotes A y F podría estar relacionado con una mayor presencia de lactobacilos durante toda la maduración. Sin embargo, la presencia de lactobacilos no explicaría por qué los lotes D y E, donde no se utilizaron lactobacilos en el cultivo iniciador, presentaron unas cantidades similares a los lotes A y F. Una posible explicación podría estar relacionada por una parte, con la capacidad de algunas cepas de lactococos para producir Gaba (Nomura y col., 1998) y, por otra, con que la actividad glutamato decarboxilasa podría verse favorecida por las condiciones de pH reinantes en los quesos. En este sentido, Nomura y col. (1998) observaron un incremento del contenido en Gaba a medida que el pH del queso iba disminuyendo al incorporar lactococos como cultivo iniciador. Si tenemos en cuenta que el pH óptimo de acción de la glutamato decarboxilasa es de 4,7 (Nomura y col., 1998) la instauración de valores de pH en torno a este valor desde el inicio de la maduración en todos los lotes de queso de Armada puede explicar el alto contenido en Gaba.

La evolución y contenido de las distintas fracciones nitrogenadas y de los aminoácidos libres durante la maduración de los distintos lotes de queso de Armada estuvo condicionada en gran medida por el pH, actividad del agua y % sal/humedad. Los mayores contenidos, tanto de las fracciones nitrogenadas como de aminoácidos libres, en los quesos del lote A (elaborado con leche cruda) están relacionadas con valores de pH más elevados durante toda la maduración, ya que en ningún caso fueron inferiores a 5,0, a diferencia del resto de lotes en que prácticamente desde el inicio de la maduración se mantuvieron constantes en torno a 4,5-4,7. Los bajos pHs actuarían inhibiendo la actividad de la enzima coagulante y de peptidasas y aminopeptidasas microbianas. Sin embargo, los valores obtenidos para las distintas fracciones nitrogenadas y aminoácidos libres totales en los quesos elaborados con el cultivo iniciador autóctono fueron muy superiores, en general, a los obtenidos con el queso de Armada artesanal. Los valores de pH y actividad de agua y el porcentaje

de sal/humedad en los quesos artesanales fueron similares a los que mostraron los quesos elaborados con leche pasteurizada. Por consiguiente, las diferencias en el grado de proteolisis pueden venir determinadas por el tipo de microorganismos integrantes del cultivo iniciador autóctono y por el mayor control de las condiciones de temperatura y humedad relativa durante la maduración de los quesos, permitiendo una deshidratación más gradual y un mejor desarrollo de las bacterias lácticas presentes.

En la evaluación sensorial, las diferencias más acentuadas se observaron en el olor, sabor y textura y se deben fundamentalmente a la acción glucolítica, proteolítica y lipolítica de las bacterias del cultivo iniciador. Los quesos de los lotes A, D, E y F fueron, en general, los mejor valorados a los 30 días de maduración. A los 60 días de maduración los que recibieron las puntuaciones más altas fueron los lotes A y D. Los quesos de 120 días de maduración mejor valorados fueron los lotes A, C, D y E. Por consiguiente, los quesos de los lotes A, D y E fueron los mejor evaluados durante toda la maduración, si bien en el caso del lote E la puntuación del sabor fue inferior.

Los quesos del lote D se caracterizaron por una textura granular y friable, típica del queso de Armada, fácil de disolver en boca y con un olor y aroma láctico, con connotaciones a mantequilla y un ligero picor residual, recordando a las características típicas del queso de Armada.

Los quesos del lote B mostraron aromas y sabores sin ninguna connotación especial.

Los quesos del lote F exhibieron algunos defectos en el sabor y el olor ligado a la acidez excesiva, resultando a la vez salados y con retrogusto ácido.

Los quesos del lote A se caracterizaron por un crecimiento fúngico atribuible a las grietas en la masa y a su textura excesivamente granular y por fuerte flavor rancio desagradable residual. A pesar de estar entre los quesos mejor valorados sensorialmente presentaron algunos defectos, entre ellos el agrietamiento de la corteza y presencia de mohos en el interior de los quesos, excesiva sequedad de la pasta que se intensificaba a medida que avanzaba la maduración, haciéndose quebradiza.

Otros defectos que se detectaron en algunos quesos fueron sabor residual metálico, sabor a cuajo, sabor amargo y sabor residual persistente a rancio.

Como se comentó anteriormente los lotes D y E fueron bien evaluados sensorialmente, sobre todo por las características aromáticas, parte de las cuales están relacionadas con una mayor presencia de aminoácidos libres y una menor cantidad de péptidos sobre todo hidrofóbicos que aportan un sabor amargo desagradable al queso. De hecho, la evolución de la relación péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos durante la maduración siguió un comportamiento similar en los lotes D y E. Dicha relación fue máxima a las dos semanas de la maduración, descendiendo a lo largo de la misma por presentar, respecto al resto de lotes, los niveles, más bajos junto con el lote A, a los 30 días de la maduración, momento en el cual el resto de los lotes mostraban una relación con tendencia creciente o más o menos constante.

Los lotes D y F, junto con el A, presentaron la relación entre péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos más baja a los 2 y 4 meses de la maduración respectivamente (Fernández y col., 2010). Por consiguiente los tiempos de maduración, en el queso de Armada, variedad sobado, deben ser de al menos 2 meses para evitar la aparición de amargor en los quesos.

Por tanto, la pasterización de la leche y posterior adición de cultivos autóctonos, constituidos por combinaciones específicas de cepas, puede contribuir al desarrollo del flavor y texturas típicas del queso de Armada y podría ser extensible a otros quesos de características similares.



## **V. CONCLUSIONES**



1. Del ensayo de 31 cepas de bacterias lácticas (BAL), aisladas del queso de Armada, variedad Sobado, fueron seleccionadas las siguientes para diseñar los cultivos iniciadores: una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) por presentar una adecuada actividad acidificante y proteolítica; una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (TAUL 12) por la elevada actividad dipeptidasa y capacidad de producir compuestos responsables del aroma; la cepa TAUL 1795 de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* con evidente actividad dipeptidasa y caseinolítica; y *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351) por presentar elevada actividad esterolítica y carboxipeptidasa. Algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* como la cepa TAUL 1736 mostraron elevada actividad aminopeptidasa y  $\beta$  galactosidasa pudiendo repercutir en el desarrollo de flavor de los quesos por lo que también esta cepa fue seleccionada.
2. Ninguna de las cepas 31 cepas de BAL ensayadas mostró actividad antimicrobiana frente a las cepas de referencia *Listeria monocytogenes* (CECT 4031), *Staphylococcus aureus* (CECT 240), *Enterococcus faecalis* (CECT 481) y *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011). En los ensayos de incompatibilidad entre cepas, dos cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 71 y TAUL 78), una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (TAUL 13) y sobre todo la cepa de *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1539) presentaron actividad bacteriocina frente a alguna de las cepas ensayadas.
3. Ninguna de las cepas de bacterias lácticas estudiada fue sensible a todos los antibióticos ensayados. Las cepas de leuconostoc y lactobacilos fueron resistentes prácticamente a todos los antibióticos ensayados, excepto *Lb. brevis* que fue sensible a augmentine y a tetraciclina y *Lb. plantarum* que lo fue frente al cloranfenicol. Por contra, los lactococos, fueron por lo general, más sensibles a la mayoría de los antibióticos (sobre todo a ampicilina y tetraciclina)

aunque se pudo observar gran variabilidad entre las distintas cepas ensayadas. La práctica totalidad de las cepas de lactococos presentó resistencia frente a la oxacilina, nitrofurantoína y trimetoprim. Las cepas seleccionadas para constituir el cultivo iniciador fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos ensayados. Este aspecto es importante para evitar que actúen como vectores generando resistencia a ciertos antibióticos en infecciones humanas.

4. El uso de cultivos iniciadores autóctonos en la elaboración de queso de Armada tuvo una influencia muy notable en los cambios de la microflora y en los parámetros físico-químicos, fundamentalmente en el contenido en lactosa, pH y acidez titulable. La excesiva manipulación de la cuajada durante las operaciones de sobado y salado contribuyó a que las enterobacterias estuviesen presentes en el queso, aunque en un número mucho más bajo que en los quesos elaborados con leche cruda. Por tanto, para mejorar la calidad de este queso resulta imprescindible una mayor mecanización del proceso de elaboración.
5. En cuanto a la extensión de la proteólisis, expresada como %NS-pH 4,4/NT, el uso de cultivos iniciadores autóctonos tuvo un efecto positivo sobre la proteólisis en los quesos del lote E, presentando valores muy similares a los descritos para el lote elaborado con leche cruda. Sin embargo, la profundidad de la proteólisis fue más acusada en los quesos de todos los lotes, si bien resultó ser mayoritaria en el lote elaborado con leche cruda y en los lotes E y F. El mayor descenso en la relación entre péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos se observó en los lotes D y F al término de la maduración, lo que indica una menor proporción de péptidos responsables del amargor en los quesos. El contenido total de aminoácidos libres aumentó significativamente durante los tres últimos meses de maduración en los quesos de todos los lotes de quesos. Los quesos del lote A fueron los que presentaron un mayor contenido en aminoácidos libres mientras que los valores más bajos se obtuvieron de los lotes B y C.

6. El empleo de los cultivos iniciadores autóctonos tuvo influencia positiva en las características sensoriales del queso de Armada elaborado con leche pasteurizada. En general, las características organolépticas de los quesos elaborados con leche pasteurizada y los cultivos autóctonos fueron similares o mejores que las de los quesos elaborados con leche cruda o con leche pasteurizada y el cultivo comercial. No obstante, la inclusión de un lactobacilo en el cultivo supuso algún defecto en el flavor y una excesiva acidez. Los quesos elaborados con el fermento que incluyó *Enterococcus raffinosus*, fueron en general, los que mejor puntuación recibieron en la evaluación sensorial y se caracterizaron por tener una textura granular, fácil de disolver en boca y un aroma láctico con connotaciones a mantequilla, así como el flavor típico de los quesos de cabra y un ligero sabor picante residual.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- Alegría, A., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casin, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, **136**, 44-51.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, **24**, 559-570.
- Ardo, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, **24**, 238-242.
- Arenas, R., González, L., Bernardo, A., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. (2004). Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*, **15**, 271-279.
- Argumosa, O.G., Carballo, J., Bernardo, A., Martín, R. (1992). Chemical characterization of a Spanish artisanal goat cheese (Babia-Laciana variety). *Microbiologie Aliments Nutrition*, **10**, 69-76.
- Arizcun, J., Itulain, M., Salmeron, J., Torre, P. (1996). Estudio de los quesos de la denominación de origen Roncal e Idiazábal fabricados en Navarra. *Alimentaria*, **274**, 69-71.
- Awad S. (2006). Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. *Food Chemistry*, **97**, 394-400.
- Awad, S., Ahmed, N., El Soda, M (2007). Evaluation of isolated starter acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chemistry*, **104**, 1192-1199.
- Ayad, H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2000). Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*, **10**, 169-179.
- Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A., Cabezas, L. (2006). Microbiological biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, **17**, 249-255.
- Barcina, Y., Ibáñez, F.C., Ordoñez, A.I. (1995). Evolution of free amino acids during Idiazabal cheese ripening. *Food Control*, **6**, 161-164.
- Barron, L.J.R., Fernández de Labastida, E., Perea, S., Chavarri, F., de Vega, C., Vicente, M.S., Torrres, M.I., Nájera, A.I., Virto, M., Santisteban, A., Pérez-Erlotondo, F.J., Albisu, M., Salmerón, J., Mendía, C., Torre, P., Ibáñez, F.C.,



- de Renobales, M. (2001). Review. Seasonal changes in the composition of bulk raw ewe's milk used for Idiazábal cheese manufacture. *International Dairy Journal*, **11**, 771-778.
- Benkes, E.M., Bester, B.H., Mostert, J.F. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, **63**, 189-197.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, **11**, 259-274.
- Binetti, A., Bailo, N., Reinheimer, J. (2007). Spontaneous phage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*: isolation and technological characteristic. *International Dairy Journal*, **17**, 343-349.
- Bizani, D., Morrissy, J.A.C., Domínguez, A.P.M., Brandelli, A. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology*, **121**, 229-233.
- Booth, M., Donnelly W.J., Ni Fhaolain, I., Jennings, P.V., O'Cuín, G. (1990a). Proline-specific peptidases of *Streptococcus cremoris* AM2. *Journal of Dairy Research*, **57**, 79-88.
- Booth, M., Ni Fhaolain, I., Jennings, P.V., O'Cuín, G. (1990b). Purification and characterization of a post-proline dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus cremoris* AM2. *Journal of Dairy Research*, **57**, 89-99.
- Bourne M.C. (1968). Texture profile of ripening pears. *Journal of Food Science*, **33**, 223.
- Broome, M.C., Hickey, M.W., Briggs, D.R., Jones, G.P. (1991). Peptidase activity of non-starter lactobacilli. *Australian Journal of Dairy Technology*, **46**, 19-23.
- Broome, M.C. & Limsowtin, G.K.Y. (1998). Starter peptidase activity in maturing cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, **53**, 79-82.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. (1995). Minireview. A functional classification scheme for  $\beta$  lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **39**, 1211-1233.
- Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, M.L.L. (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, **18**, 11-17.

- Carballo, J., Fresno, J.M., Tuero, J.R., Prieto, J.G., Bernardo, A., Martín-Sarmiento, R. (1994). Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish hard goat cheese. *Food Chemistry*, **49**, 77-82.
- Carmona, M.A., Sanjuan, E., Gómez, R., Fernández Salguero, J. (1999). Effect of starter cultures on the physico-chemical and biochemical features in ewe cheese made with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 737-744.
- Casalta, E., Vassal, Y., Desmazeaud, M.J., Casablanca, F. (1995). Comparaison de l'activité acidifiante de souches de *Lactococcus lactis* isolées de latí de corse. *Lebensmittel-Wissenschaft un Technologie*, **28**, 291-299.
- Casla, D., Fontecha, J., Gómez, R., Peláez, C. (1995). The effects of freezing and frozen storage of ewe's milk cheese on the viability and proteolytic activity of lactococci used as a starter. *Zeitschrift fur Lebensmittel Unters Forsch*, **200**, 59-63.
- Castillo, I., Requena, P., Fernández de Palencia, P., Fontecha, J. y Gobbetti, M. (1999). Isolation and characterization o fan intracellular esterase from *Lactobacillus casei subsp. casei* IFPL731. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 653-659.
- Castillo, I., Calvo, M.V., Alonso, L., Juárez, M., Fontecha, J. (2007). Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and defined strain starter. *Food Chemistry*, **100**, 590-598.
- Cayot, N. (2007). Sensory quality of traditional foods. *Food Chemistry*, **102**, 445-453.
- Centeno, J.A., Cepeda, A., Rodríguez Otero, J.L. (1996). Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cow's milk cheese. *International Dairy Journal*, **6**, 65-78.
- Chen, H. and Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their foods applications. *Comprehensive Reviews in Food Science of Food Safety*, **2**, 82-100.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 27-246.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 1-20.

- Cogan, T.M., Hill, C. (1993). Cheese starter cultures. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed. Elsevier. London, 193-257.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Coconcelli, P.S., Fernandez, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulous, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodríguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, **64**, 409-421.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current know ledge. *International Dairy Journal*, **13**, 841-866.
- Coolbear T., Crow V., Harnett, J., Harvey, S., Holland, R., Martley, F. (2008). Developments in cheese microbiology in New Zeland - Use of starter and non-starter lactic acid bacteria and their enzymes in determining flavour. *International Dairy Journal*, **18**, 705-713.
- Crow, V.L., Holland, R., Pritchard, G.G., Coolbear, T. (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid bacteria. 2 The levels of subcellular distributions of peptidase and esterase activities. *International Dairy Journal*, **4**, 723-742.
- Crow, V., Curry, B., Hayes, M. (2001). The ecology of non starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, **11**, 275-283.
- Cuesta, P., Fernández-García, E., González Del Llano, D., Montilla, A., Rodríguez, A. (1996). Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega'l Pitu cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, **79**, 1693-1698.
- Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, **43**, 164-166.
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R., Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2011-2020.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J., Ramírez, R. (2010). Characterisation by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry*, **118**, 182-189.

- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Ladero, L., Cava, R., Ramírez, R. (2009). Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (DOP "Torta del Casar") during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, **44**, 1721-1728.
- Devirgiliis, C., Caravelli, A., Coppola, D., Barile, S., Perozzi, G. (2008). Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. *Internacional Journal of Food Microbiology*, **128**, 378-384.
- De Vuyst, M., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Messens, W. (2002). The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 6059-6069.
- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, **118**, 173-184.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied Environmental Microbiology*, **67**, 1628-1635.
- El Soda, M., Abd-El-Wanab, H., Ezzat, N., Desmazeaud, M.J., Ismael, A. (1986a). The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of the esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis* and *Lb. acidophilus*. *Lait*, **66**, 431-443.
- El Soda, M., Korayem, M., Ezzat, N. (1986b). The esterolytic and lipolytic activities of lactobacilli III. Detection and characterization of the lipase system. *Milchwissenschaft*, **41**, 353-355.
- El Soda, M., Desmazeaud, M.J. (1982). Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe Thermobacterium. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Canadian Journal Microbiology*, **28**, 1181-1188.
- El Soda, M., Desmazeaud, M.J., Le bars, D., Zevaco, C. (1986a). Cell wall-associated proteinases in *Lactobacillus casei* and *Lb. plantarum*. *Journal of Food Protection*, **49**, 361-365.
- El Soda, M. y Ezzat, N. (1993). Peptidase and esterase activities from mutant strains of *Lactobacillus casei*. *Die Nahrung*, **37**, 321-327.

- Exterkate, F.A., de Veer, G.J.C.M. (1987). Purification and some properties of a membrane-bound aminopeptidase A from *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 577-583.
- Exterkate, F.A., de Jong, M., de Veer, G.J.C.M., Baankreis, R. (1992). Location and characterization of aminopeptidase N in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **37**, 46-54.
- Ezzat, N., El Soda, M., Bouillanne, C., Zevaco, C., Blanchard, P. (1985). Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lb. bulgaricus* and *Lb. lactis*. *Milchwissenschaft*, **40**, 140-143.
- Ezzat, N., Zevaco, C., El Soda, M., Gripon, J.C. (1987). Partial purification and characterisation of a cell wall associated proteinase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft*, **42**, 95-97.
- Ezzat, N., El Soda, M. El Shafei, H., Olson, N.F. (1993). *Food Chemistry*, **48**, 19-23.
- Fernández, D., Arenas, R., Herreros, M.A., Tornadijo, M.E., Fresno J.M. (2010). Modificaciones en el perfil peptídico del Queso de Armada, variedad Sobado, elaborado con distintos cultivos iniciadores autóctonos a lo largo de la maduración. Libro de actas del VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, 1-6. Logroño (España)
- Fernández, D., Diezhandino, I., Herreros, M.A., Tornadijo, M.E., Fresno J.M. (2010). Cambios en el contenido de aminoácidos libres durante la maduración del queso de Armada, variedad sobado, elaborado con diferentes cultivos iniciadores autóctonos. Libro de actas del IV Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, 1-5. Logroño (España)
- Fernández García, E., Gaya, P., Medina, M., Núñez, M. (2004). Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, **14**, 39-46.
- Fernández García, E., Carbonell, M., Gaya, P., Núñez, M. (2004). Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *International Dairy Journal*, **14**, 701-711.
- Ferrazza, R.E., Fresno, J.M., Ribeiro, J.I., Tornadijo, M.E., Mansur Furtado, M. (2004). Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. *Food Research International*, **37**, 149-155.

- Flórez, A.B., Delgado, S., Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian Journal Microbiology*, **51**, 51-58.
- Flórez, A.B. (2007). *Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia*. Tesis Doctoral. Dpto. de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo.
- Foegeding E.A. y Drake M.A. (2007). Invited review: sensory and mechanical properties of cheese texture. *Journal of Dairy Science*, **90**, 1611-1624.
- Forde, A., Fitzgerald, G.F. (1999). Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 89-113.
- Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M. y McSweeney P.L.H. (2000). *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg. MD: Aspen.
- Fox , P. F., Lucey, J.A., y Cogan, T.M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *C.R.C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **29**, 237-253.
- Fox , P. F. y McSweeney, P.L.H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International*, **12**, 457-509.
- Franco, I., Prieto, B., Bernardo, A., González Prieto, J., Carballo, J. (2003). Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, **13**, 221-230.
- Franz, C.M., Holzappel, W.H., Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *International Journal of Food Microbiology*, **47**, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococci* isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4385-4389.
- Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., Bernardo, A., González-Prieto, J. (1997). Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of a Spanish craft goat's cheese (Armada variety). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **75**, 148-154.
- Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., González-Prieto, J., Bernardo, A. (1996). Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, **55**, 225-230.

- Friedman H., Whitney J. y Szczesniak A.S. (1963). The texturometer – a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food Science*, **28**, 390.
- Garrido, M.P., Quintana, M.A., Barneto, R. (1993). Microbiological and physico-chemical study of goat's cheese. *Chemie-Mikrobiologie-Technologie-der-Lebensmittel*, **15**, 11-13.
- Gasser, F. (1994). Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin Institut Pasteur*, **92**, 45-67.
- Gaya, P., Medina, M., Núñez, M. (1993). Accelerated decrease of *Enterobacteriaceae* counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. *Journal of Food Protection*, **46**, 305-308.
- Gaya, P., Medina, M., Bautista, L., Núñez, M. (1988). Influence of lactic acid starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **6**, 249-257.
- Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, **60**, 732-738.
- Giraffa, G., (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Review*, **26**, 163-171.
- Giraffa, G., (2004). Enterococcus. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 617-624.
- Gobbetti, M., Fox, P.F., Stepaniak, L. (1996). Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, **8**, 127-135.
- Gómez, M.J., Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M., Medina, M. (1999). Characteristics of Manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, **82**, 2300-2307.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, **18**, 716-722.
- González Crespo, J., Mas, M. (1993). Estudio del empleo de fermentos iniciadores autóctonos en la elaboración de quesos de cabra de pasta prensada, con leche pasterizada. *Alimentaria*, **Junio**, 51-53.

- González del Llano, D., Ramos, M., Rodríguez, A., Montilla, A., Juárez, M. (1992). Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo blue cheese during ripening. *International Dairy Journal*, **2**, 121-125.
- González Crespo, J., Mas Mayoral, M. (1993). Utilización de cepas salvajes como cultivos iniciadores en la fabricación de un queso de cabra de pasta prensada elaborado con leche pasteurizada. *Alimentaria*, **243**, 51-53.
- Grappin, R., Beuvier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese: A review. *Bulletin of the International Dairy Federation*, **327**, 16-19.
- Halami, P.M., Chandrashekar, A., Nand, K. (2000). *Lactobacillus farciminis* M.D., a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Letters in Applied Microbiology*, **30**, 197-202.
- Harrigan, W.F. y Mc Cance, M.E. (1979). *Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos*. Academia. León.
- Hébert, E.M., Raye, R.R., Tailliez, P., de Giori, G.S. (2000). Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **59**, 19-27.
- Hennequin D. y Ardí J. (1993). Evaluation instrumentale et sensorielle de certaines propriétés texturales de fromages a pate molle. *International Dairy Journal*, **3**, 635-647.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González Prieto, M.J., Tornadijo, M.E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, **13**, 469-479.
- Huang, H.T., Dooley, J.G. (1976). Enhancement of cheese flavours with microbial esterases. *Biotechnology Bioengineering*, **18**, 909-919.
- Hughenoltz, J., Exterkate, F., Konings, W.N. (1984). The proteolytic system of *Streptococcus cremoris*: an immunological analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **48**, 1105-1110.
- Huggins, A.R., Sandine, W. (1984). Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates in strains of lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science*, **67**, 1675-1679.
- Ibáñez, F.C., Torre, P., Ordoñez, A.I., Barcina, Y. (1995). Changes in physicochemical properties and in content of nitrogen compounds with



- traditional smoking during the ripening of Idiazabal cheese. *Netherland Milk Dairy Journal*, **49**, 167-175.
- Innocente N., Pittia P., Stefanuto O. y Corradini C. (2000). Texture profile of Montasio cheese. *Milchwissenschaft*, **55**.
- International Dairy Federation (FIL-IDF) (1985). Standard 50:B. Milk and milk products-Guidance on sampling. Brussels.
- International Dairy Federation (1991 b). Reological and fracture properties of cheese. *Bulletin* **268**, pp 1-67. Brussels.
- International Dairy Federation (FIL-IDF) (1992). Standard 122:B/ISO 8261. Milk and milk products- Preparation of samples and dilutions for microbiological examination. Brussels.
- International Dairy Federation (FIL-IDF) (1995). Standard 161:A. Milk-Quantitative determination of bacteriological quality. Brussels.
- International Dairy Federation (FIL-IDF) (1995). Standard 306. Determination of acidifying activity of dairy cultures. Brussels.
- International Dairy Federation (FIL-IDF) (2009). Standard 099:1/ISO 22935-1. Milk and milk products- Sensory analysis- Part 1: General guidance for the recruitment, selection, training and monitoring of assessors. Brussels.
- International Dairy Federation (FIL-IDF) (2009). Standard 099:2/ISO 22935-2. Milk and milk products- Sensory analysis- Part 2: Recommended methods for sensory. Brussels.
- International Dairy Federation (FIL-IDF) (2009). Standard 099:3/ISO 22935-3. Milk and milk products- Sensory analysis- Part 3: Guidance on a method for evaluation of compliance. Brussels.
- Izco, J.M., Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the “purge and trap” method and analysed by GC-MS. *Food Chemistry*, **70** 409-417.
- Khalid, N.M. y Marth, E.H. (1990). Lactobacilli, their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *Journal Dairy Science*, **73**, 2669-2684.
- Katz, M., Medina, R., González, S., Oliver, G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe’s milk and cheese. *International Association for Food Protection*, **65**, 12, 1997-2001.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**, 39-86.

- Kok, J. (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**, 15-42.
- Konings, W.N., Poolman, B., Driessen, A.J.M., Smid, E.J. y Molenaar, D. (1994). Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. En: Roissart, H. y Luquet, F.M. Loriga. Editors. Uriage. France, **1**, 229-231.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, **1**, 177-187.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. In G. Verema, J.H.J. & Huits in't Veld, & J. Jugenholtz (Eds.), *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications* (pp. 91-125). Dordrecht, Holland: Kluwer Academic Publishers.
- Ladero, M., Ferrero, R., Vian, A., Santos., García Ochoa, F. (2005). Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of a thermostable  $\beta$  galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**, 505-513.
- Laleye, L. C., Simard, R. E., Gosselin, C., Lee, B. H., Giroux, R. N. (1987). Assessment of Cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines. *Journal of Food Science*, **52**, 303-307, 311.
- Law, B.A., Kolstad, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 225-245.
- Law, J., Haandrikman, A. (1997). Review article. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **7**, 1-11.
- Law, B.A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. *International Dairy Journal*, **11**, 383-398.
- Lawrence, R.C. y Gilles, J. (1982). Moisture and sodium levels in commercial goat cheeses compared with cow cheeses. *Small Ruminant Research*, **5**, 141-148.
- Ledda, A., Scintu, M.F., Pirisi, A., Sanna, S., Mannu, L. (1994). Caratterizzazione tecnologica di ceppi di lattococchi e di enterococchi per la produzione di formaggio pecorino Fiode Sardo. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, **45**, 443-456.
- Lee, S.Y., Lee, B.H. (1990). Esterolytic and Lipolytic Activities of *Lactobacillus Casei*-subsp-*Casei* LLG. *Journal of Food Science*, **55**, 119-122.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, **15**, 67-78.

- Limsowtin, G., Urbach, G., Hugenholtz, J., Broadbent, J., Beresford, T., Powel, I., Weimer, B., Bruinenberg, P., Bocekmann, W. (1995). Trends in starter technology. *Australian Journal Dairy Technology*, **50**, 24-27.
- Lucey J.A., Johnson M.E. y Horne D.S. (2003). Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, **86**, 2725-2743.
- Lukašová, J., Šustáčková, A. (2003). Review article. Enterococci and antibiotic resistance. *Acta Veterinaria. Brno*, **72**, 315-323.
- Macedo, A.C., Vieira, M., Poças, R., Malcata, F.X. (2000). Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, **10**, 769-774.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, **132**, 24-32.
- Martley, F.G., Crow, U.L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal*, **3**, 461-483.
- Mayo, B., Hardisson, C., Braña, A.F. (1990). Characterization of wild strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Cabrales cheese. *Journal of Dairy Research*, **58** (1), 125-134.
- Mc Grath, S., Fitzgerald, G. f., van Sinderen, D. (2007). Bacteriophages in dairy products: Pros and cons. *Biotechnology Journal*, **2**, 450-455.
- Medina, M., Fernández del Pozo, B., Rodríguez-Marín, M.A., Gaya, P., Núñez, M. (1991). Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research*, **58**, 355-361.
- Medina, M., Gaya, P., Núñez, M. (1992). Gredos goats' milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, **59**, 563-566.
- Menéndez, S., Centeno, J.A., Godínez, R., Rodríguez Otero, J.L. (1998). Propiedades tecnológicas y actividades enzimáticas de cepas de *Lactococcus lactis* aisladas del queso de Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, **296**, 59-64.

- Menéndez, S., Centeno, J.A., Godínez, R., Rodríguez Otero, J.L. (1999). Caracterización de cepas de lactobacilos aisladas del queso de Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, **299**, 51-56.
- Menéndez, S., Centeno, J.A., Godínez, R., Rodríguez Otero, J.L. (2000). Effects of Lactobacillus strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *International Dairy Journal*, **59**, 37-46.
- Milesi, M.M., Vinderola, G., Sabbag, N., Meinardi, G.A., Hynes, E. (2009). Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Research International*, **42**, 1186-1196.
- Minervini, F., Bilancia, M.T., Siragusa, S., Gobbetti, M., Caponio, F. (2009). Fermented goat's milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, **26**, 559-564.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1990). Catálogo de Quesos de España, Madrid.
- Moineau, S. (1999). Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 377-382.
- Montanari, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Benevelli, M., Chiavari, C. (2000). Release of  $\beta$ -galactosidase from lactobacilli. *Food Technology and Biotechnology*, **38**, 129-133.
- Mor-Mur, M., Carretero, C., Pla, R., Guamis, B. (1994). Microbiological changes during ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. *Food Microbiology*, **11**, 177-185.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, L., Cabeza, L. (2009). Technological characterization of Lactobacillus isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, **20**, 1092-1098.
- Noel Y., Zannon M. y Hunter E. (1996). Textura of Parmigiano Reggiano cheese: statistical relationships between rheological and sensory variates. *Lait*, **76**, 243-254.
- Nomura M., Kimoto H., Someya Y., Furukawa S. y Suzuki I. (1998). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, **81**, 1486-1491.

- Núñez, M., Martínez Moreno, J.L., Medina, M. (1981). Testing of *Streptococcus lactis* as starter for manufacture of Manchego-type cheese. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie Ganadera*, **12**, 65-72.
- Oliszewski, R., Medina, R.B., González, S.N., Pérez Chaia, A.B. (2007). Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goat's milk and cheeses. *Food Chemistry*, **101**, 1446-1450.
- Parente, E., Rota, M.A., Ricciardi, A., Clementi, F. (1997). Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). *International Dairy Journal*, **7**:775-783.
- Park Y.W. (2007). Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, **68**, 73-87.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. J., O'Brien, N.M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, **19**, 643-654.
- Picón, A., García-Casado, M.A., Núñez, M. (2010). Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Internacional Dairy Journal*, **20**, 156-162.
- Prentice J.H., Langley K.R. y Marshall R.J. (1993). Cheese rheology. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Ed P. F. Fox). *Elsevier Applied Science. London*, pp. 303-340.
- Prieto, B., Fresno, J.M., Carballo, J., Bernardo, A., Martín-Sarmiento, R. (1994). Biochemical characteristics of León raw cow milk cheese, a Spanish craft variety. *Sciences des Aliments*, **14**, 203-215.
- Prieto, B., Urdiales, R., Franco, I., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Carballo, J. (1999). Biochemical changes in Picón Bejes-Tresviso cheese, a Spanish blue-veined variety, during ripening. *Food Chemistry*, **67**, 415-421.
- Prieto, B., Franco, I., Fresno, J.M., Bernardo, A., Carballo, J. (2000). Picón Bejes-Tresviso blue cheese: an overall biochemical survey throughout the ripening process. *International Dairy Journal*, **10**, 159-167.
- Prieto, B., Franco, I., González Prieto, J., Bernardo, A., Carballo, J. (2002). Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of León raw cow's milk cheese, a Spanish traditional variety. *International Journal of Food Science & Technology*, **37**, 661-671.

- Randazzo, C.P., Pitino, I., Ribbera, A., Caggia, C (2010). Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiology*, **27**, 363-374.
- Raphaelides S., Antonion K. y Petridis D. (1995). Evaluation of ultrafiltered Teleme cheese. *Journal of Food Science*, **60**, 1211-1215.
- Reinheimer, J.A., Binetti, A.G., Quiberoni, A., Bailo, N.B., Rubiolo, A.C., Giraffa, G. (1997). Natural milk cultures for the production of Argentinian cheeses. *Journal of Food Protection*, **60**, 59-63.
- Requena, T., Peláez, C., Desmazeaud, M.J. (1991). Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semi-hard goat's cheese. *Journal of Dairy Research*, **58**, 137-145.
- Requena, T., Peláez, C., Fox, P.F. (1993). Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und – Forschung*, **196**, 351-355.
- Roa, I., Mendiola, F.J., González, J., Mas, M. (1997). Efecto de la innovación tecnológica en la fabricación del queso de La Serena. *Alimentaria*, **285**, 45-49.
- Rodríguez Alonso, P., Fernández Otero, C., Centeno, J.A., Garabal, J.I. (2009). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae/Staphilococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potencial implications on cheese making. *Journal of Food Science*, **74**, 284-293.
- Rodríguez Medina, M.L., Tornadijo M.E., Carballo, j., Martín-Sarmiento, R. (1995). Microbiological study of León raw cow-milk cheese, a Spanish craft variety. *Journal of Food Protection*, **57**, 998-1006.
- Román Blanco, C., Santos Buelga, J., Moreno García, B., García López, M.L. (1999). Composition and microbiology of Castellano cheese (Spanish hard cheese variety made from ewes' milk). *Milchwissenschaft*, **54**, 255-257.
- Ross, R.P., Stanteon, C., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Coffey, A. (2000). Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science & Technology*, **11**, 96-104.
- Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., Fernández-Salguero, J. (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of *Los Pedroches* cheese during ripening. *Food Chemistry*, **78**, 281-289.

- Saxelin, M., Rautelin, H., Salminen, S., Mäkelä, P.H. (1996). Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, **5**, 331-335.
- Scott-Blair (1958). Rheology in food research. *Advances in Food Research*, **8**, 1-56.
- Sheehan, J.J., Wilkinson, M.G., McSweeney P.L.H.(2008). Influence of processing and ripening parameters on starter, non starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, **18**, 905-917.
- Stadhouders, J y Veringa, H.A. (1973). Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **27**, 77-91.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, 1-29.
- Sturino, J. M. and Klaenhammer, T. R. (2004). Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, **56**, 331-377.
- Suárez, V. B., Maciel, N., Guglielmotti, D., Zago, M., Giraffa, G., Reinheimer, J. (2008). *Internacional Journal of Food Microbiology*, **128**. 401-405.
- Szczesniak A.S., Brandt M.A. y Friedman H.H. (1963). Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science*, **28**, 397-403.
- Talon, R. y Montel, M. (1994). Activités estérasiques et lipolytiques des bactéries lactiques. Cap. 10, p. 349-352. En : Roissart, H. y Luquet, F.M. (1994). Bactéries lactiques. *Aspects fondamentaux et technologiques*. Vol 1. Loriga. Uriage. France.
- Tan, P.S.T., Konings, W.N. (1990). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 526-532.
- Tan, PST, Alen-Boerrigter, I.J., Poolman, B., Siezen, R.J., De Vos, W.M., Konings, W.N. (1992). *FEBS Letters*, **306**, 9-16.
- Tan, P.S.T., Poolman, B., Konings, W.N. (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*, **60**, 269-286.

- Tan, P.S.T., Chapot-Chartier, M.P., Pos K.M., Rousseau, M., Boquien, C.Y., Gripon, J.C., Konings, W.N. (1992). Location of peptidases in lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 285-290.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 115-137.
- Thomas, T.D., y Pearce, K.N. (1981). Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **16**, 253-259.
- Thomas, T.D., Pritchard, G. (1987). Proteolytic enzymes in dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Letters*, **46**, 245-268
- Tornadijo, E., Fresno, J.M., Carballo, J., Martín-Sarmiento, R. (1993). Study of *Enterobacteriaceae* throughout the manufacturing and ripening of hard goat cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**, 240-246.
- Tornadijo M.E. (1995). *Evolución e identificación de los microorganismos responsables de la maduración del queso de Armada, variedad sobado*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Bernardo, A., Martín Sarmiento, R., Carballo, J. (1995). Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, **75**, 551-570.
- Tornadijo, E., Fresno, J.M., Carballo, J., Martín-Sarmiento, R. (1996). Population levels, species and characteristics of *Micrococcaceae* during the manufacturing and ripening of Armada-Sobado hard goat's milk cheese. *Journal of Food Protection*, **59**, 1200-1207.
- Tunick M.H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch and fracture. *Journal of Dairy Science*, **83**, 1892-1898.
- Tunick M.H. y Van Hekken D.L. (2002). Torsion gelometry of cheese. *Journal of Dairy Science*, **85**, 2743-2749.
- Turner, K.W. and Thomas T.D. (1980). Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **15**, 265-276.
- Tzanetakis, N., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. (1995). The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. *Food Microbiology*, **12**, 55-63.



- Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, **3**, 389-422.
- Valence, F., Deutsch, S.M., Richoux, R., Gagnaire, V., Lortal, S. (2000). Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal Dairy Reseach*, **67**, 261-271.
- Van Hekken D.L., Tunick M.H. y Park Y.W. (2004). Rheological and proteolytic properties of Monterey Jack goat milk cheese during 6 months aging. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **52**, 5372-5377.
- Vandenberg, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**, 221-238.
- Visser J. (1991). Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. In *Rheological and fracture properties of cheese. Bulletin IDF n° 268, International Dairy Federation*. Brussels. Belgium. pp. 49-61.
- Visser, S., Exterkate, F.A., Slangen, C.J., de Veer, G.J.C.M. (1986). Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine  $\alpha$ s1-,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein. *Applied and Environmental Microbiology*, **52**, 1162-1166.
- Ward,D.D.(1985) The TBA assay and lipid oxidation: an overview of the relevant literature. *Milchwissenschaft*, **40**, 583–588.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E.B., De Vuist, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 498-505.
- Wilkinson C., Dijksterhuis G.B. y Minekus M. (2000). From food structure to texture. *Trends in Food Science & Technology*, **11**, 442-450.
- Williams, A.G., Banks, J.M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International of Dairy Journal*, **7**, 763-774.
- Williams, A.G., Felipe, X., Banks, J.M. (1998). Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobacillus spp.* And non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, **8**, 255-256.

- Wium H. y Qvist K.B. (1998). Effect of rennet concentration and method of coagulation on the texture of Feta cheeses made from ultrafiltered bovine milk. *Journal of Dairy Research*, **65**, 653-663.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, **12**, 91-109.
- Zárate, V., Belda, F., Pérez, C., Cardell, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*, **7**, 635-641.

**Bibliografía de Internet:**

- FIL-IDF.** International Dairy Federation. Disponible en Web: <http://www.fil-idf.org>  
[Consulta 2 de julio de 2010].
- MAPA.** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en Web: <http://www.mapa.es> [Consulta 2 de julio de 2010].
- MERCASA.** Empresa nacional Mercasa. Disponible en Web: <http://www.mercasa.es> [Consulta 2 de julio de 2010].
- Cheese from Spain.** Disponible en Web: <http://www.cheesefromspain.com>.  
[Consulta 2 de julio de 2010].