



CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO GENESTOSO:

IDENTIFICACIÓN, APTITUD TECNOLÓGICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Leticia González Arias



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos

León, 2013

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Aspectos generales relativos al queso de Genestoso	3
1.2.- Las bacterias lácticas	12
1.2.1.- Características generales de las bacterias lácticas	12
1.2.2.- Importancia de las bacterias lácticas en el queso	13
1.2.3.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas	16
1.2.4.- Capacidad probiótica de las bacterias lácticas	17
1.3.- Bibliografía	19
2.- JUSTIFICACIÓN	25
2.1.- Interés social	27
2.2.- Interés científico y tecnológico	28
2.3.- Bibliografía	30
3.- OBJETIVOS	31
4.- PUBLICACIONES	35
4.1.- Artículos	37
4.2.- Comunicaciones a Congresos	38
5.- DISCUSIÓN GENERAL	113
5.1.- Identificación de las bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso durante su maduración	115
5.2.- Estudio de la actividad antimicrobiana de las cepas de bacterias lácticas aisladas durante la maduración del queso de Genestoso	116
5.3.- Adscripción a nivel de especie de las cepas con actividad antimicrobiana	119
5.4.- Estudio de aptitud tecnológica de las cepas identificadas a nivel de especie	119
5.4.1.- Actividad acidificante y actividad enzimática extracelular	120
5.4.2.- Actividad enzimática de los extractos libres de células (Cell Free Extracts, CFE)	121
5.5.- Estudio de la actividad enzimática probiótica de las cepas identificadas a nivel de especie	123
5.6.- Estudio de las propiedades hidrofóbicas de las cepas identificadas a nivel de especie, seleccionadas por su aptitud tecnológica	125
5.7.- Estudio de la capacidad de producción de aminas biogénas de las cepas identificadas a nivel de especie, seleccionadas por su aptitud tecnológica	126
5.8.- Estudio de la incompatibilidad entre las cepas identificadas a nivel de especie, seleccionadas por su aptitud tecnológica	127
5.9.- Bibliografía	129
6.- ELECCIÓN DEL CULTIVO INICIADOR	135
7.- CONCLUSIONES	139

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral se encuadra en el marco de un Proyecto de investigación acerca de la caracterización del queso de Genestoso., dando continuidad a un trabajo previo de caracterización bioquímica, físico-química y reológica que se llevó a cabo en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León.

El estudio de la actividad enzimática de las cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso e identificadas a nivel de especie permite llevar a cabo una selección de las cepas con mayor aptitud tecnológica y diseñar un cultivo iniciador autóctono para su uso en la fabricación industrial de quesos artesanales. La adición de cultivos iniciadores autóctonos puede contribuir a conservar la peculiaridad del producto, controlando la fermentación para que transcurra de modo adecuado y garantizando la calidad higiénico-sanitaria de los quesos, así como la uniformidad de las partidas en su fabricación. A su vez, la recuperación de estos quesos artesanales podría suponer un plan de dinamización económica y social para la zona de producción del queso de Genestoso.

Las cepas de bacterias lácticas fueron adscritas a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. Después de utilizar técnicas bioquímicas y genéticas, de forma combinada, se adscribieron a nivel de especie catorce cepas que a su vez presentaron actividad antimicrobiana frente a cinco cepas de referencia.

En base al bajo nivel de actividad proteasa, la alta actividad peptidasa y los niveles de actividad esterasa-lipasa (C4 y C8) es posible sugerir que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 11, GE 12 y GE 2363, *Lactobacillus paracasei* GE 2036 y *Enterococcus faecalis* GE 2320 serían adecuadas para diseñar uno o más cultivos autóctonos. Todas estas cepas mostraron altos índices de hidrofobicidad, propiedad interesante en la selección de cepas probióticas. El estudio de incompatibilidad de cepas resultó imprescindible en la propuesta de cultivos mixtos. La combinación de cepas que mejor reproduzca los atributos de calidad del queso de Genestoso en las elaboraciones piloto previstas, constituirán el/los cultivos iniciadores autóctonos más idóneos.

Summary

This study researches into the characterization of Genestoso cheese in a Research Project which is the continuation of a previous biochemical, physico-chemical and rheologic study carried out at Food Science and Technology Department of University of León.

The enzymatic activity study on the LAB strains isolated from Genestoso cheese and identified at species level allowed for the carrying out of a selection of the strains with a greater technological aptitude and designing of autochthonous starter for the use of industrial manufacturing of artisanal cheeses. The addition of the autochthonous starter could contribute to the peculiarity of this product and control the adequate fermentation and guaranteeing hygienic quality of cheeses as well as the uniformity of the batches.

The recovery of these artisanal cheeses also involves an economic and social strategy for the region where this cheese is produced.

LAB strains were assigned to the *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Enterococcus* genii. After using biochemical and genetic techniques at the same time, fourteen strains were assigned at species level showing antimicrobial activity against five reference strains.

Based on low protease activity, high peptidase activity, and esterase-lipase activity (C4-C8) levels, it is suggested that *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 11, GE 12 y GE 2363, *Lactobacillus paracasei* GE 2036 and *Enterococcus faecalis* GE 2320 would be appropriate strains to take part in one or more autochthonous starter cultures. All those strains showed high hydrophobicity levels, which is of interest as a probiotic property. The study of incompatibility inter-strains were of vital importance in order to propose mixed starter cultures. The combination of strains, which best reproduce quality attributes of Genestoso cheese in future pilot plant manufacturing, would make the most suitable autochthonous starter culture.

1-. INTRODUCCIÓN

1.1.- Aspectos generales relativos al queso de Genestoso

El queso de Genestoso se elabora en el Principado de Asturias. “Queisu-i-Xinistosu” es su denominación tradicional en asturiano.

La zona de elaboración de este queso es casi exclusivamente el pueblo de Genestoso o “Xenestoso”, un montañoso y apartado pueblo del municipio de Cangas del Narcea, concejo situado al sur occidente del Principado de Asturias.

Su producción se remonta a la trashumancia que se hacía en la zona hacia Castilla y Extremadura y era elaborado por los pastores con la leche de sus cabras y ovejas. Como influencia de aquellos tiempos le ha quedado la forma, muy rara para los quesos elaborados en Asturias y más habitual en los extremeños, con los que comparte no pocas de sus características. En la actualidad, la elaboración de este queso artesano es muy escasa, quedando reducida a dos productores del propio pueblo de Genestoso, si bien, la Consejería de Agricultura del Principado de Asturias ha presentado un plan para la dinamización del sector. El planteamiento de esta tesis surge como consecuencia del contacto establecido con las instituciones locales, pretendiendo impulsar así un proyecto de industrialización del queso de Genestoso.



La elaboración de este queso se lleva a cabo de forma exclusivamente artesanal, con leche cruda de vaca de la raza Asturiana de los Valles, aunque excepcionalmente se elabora algún queso con mezcla de leche de oveja y cabra. El proceso de elaboración fue estudiado por Arenas (2007) y se describe a continuación. A la leche recién ordeñada y templada a una temperatura de 20-25°C se le añade cuajo comercial de ternero (10-20 mL por cada 100 L de leche, de fuerza 1:10000). La coagulación transcurre durante 24 horas. Una vez escurrida, la cuajada se coloca en un plato donde se corta en cruz con el objeto de facilitar el desuerado, permaneciendo así durante un par de horas. Finalizado este reposo, la cuajada se pasa a una cazuela y se trabaja con ayuda de una cuchara hasta obtener una masa cremosa. Seguidamente, la cuajada se salazona con sal de mesa, con 10-12 g de sal por cada 2 Kg de cuajada. A continuación, se introduce en moldes artesanales de esparto sobre un plato hondo, donde permanece durante 48 horas, 24 horas sobre una cara y 24 horas sobre la otra. Cuando la

cuajada adquiere la consistencia adecuada el cincho de esparto es retirado y se procede a su maduración. Ésta se realiza en hórreos, dentro de queseras colgadas del techo, sobre una base constituida por piezas de pizarra. Los quesos se voltean diariamente durante la primera semana. La maduración se mantiene durante un periodo de dos a tres semanas.

El queso de Genestoso es agradable a la vista, su aroma evoca olores florales, verdes y, en ocasiones, afrutados, con aromas primarios y un bouquet suave que recuerda a las avellanas y a la miel. En primavera, el aroma a mantequilla es motivado por la leche utilizada, con escaso retrogusto, recordando al Afuega'l Pitu fresco; en otoño, presenta un aroma más intenso y un bouquet pronunciado, con sensaciones de hierba seca y olores de brezo. Tiene un sabor ácido, escaso de sal y más o menos picante según su madurez. Se consume normalmente con dos o tres semanas de maduración.

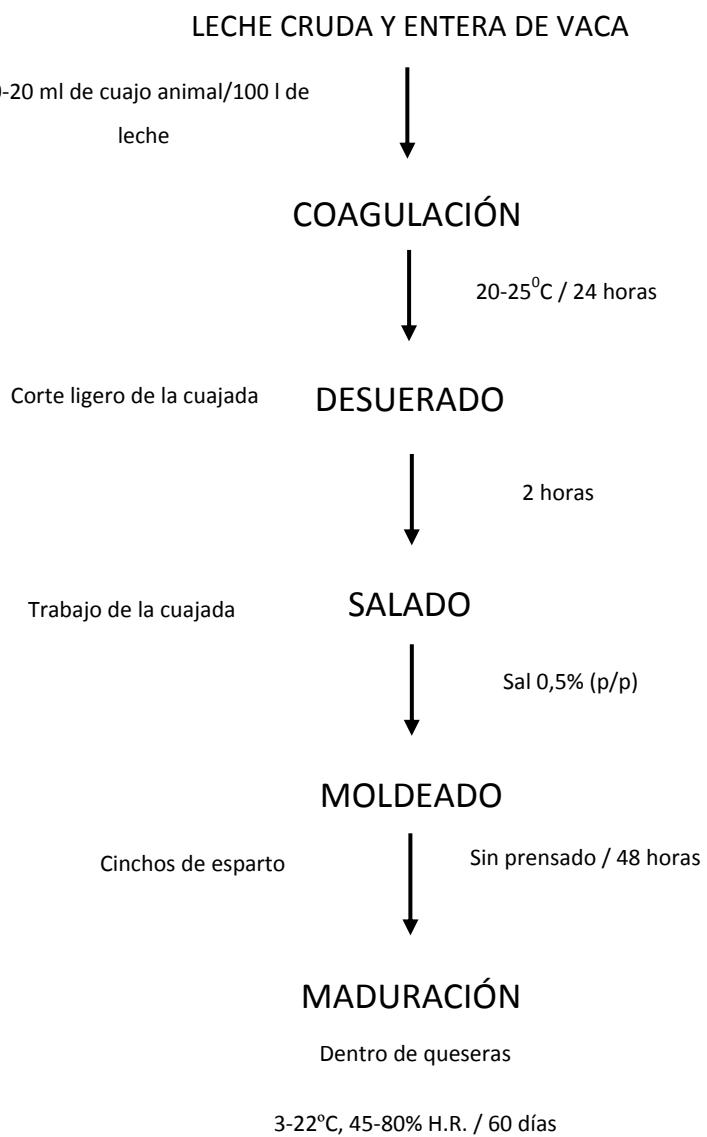


Diagrama de flujo del procedimiento de elaboración del queso Genestoso

Los quesos usados para este estudio fueron elaborados por dos productores siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, aunque se dejaron madurar durante dos meses, que es el periodo mínimo de maduración que ofrece garantías sanitarias para el consumo de los quesos elaborados con leche cruda. El peso al final de la maduración osciló entre los 500 y los 700 g. La maduración transcurrió en hórreos en los que la temperatura y la humedad fluctuaron en función de la época del año. Estas variaciones de temperatura y humedad relativa fueron registradas mediante un higrómetro (Ratona Termograph mod. 9708) y los valores se muestran en la tabla I:

Tabla I.- Variación de la temperatura y la humedad relativa en los hórreos de maduración según la época del año.

	Temperatura (ºC)	Humedad relativa (%)
Otoño	5-11	50-80
Invierno	3-9	45-53
Primavera	8-15	60-70
Verano	15-22	48-52

En el marco del mismo proyecto de investigación, un trabajo previo de caracterización del queso de Genestoso, comprendió el estudio microbiológico, físico-químico, bioquímico y reológico del queso durante su maduración(Arenas, 2007). Los valores de composición media del queso de Genestoso obtenidos en dicho estudio se reflejan en la tabla II. A continuación, se recogen las conclusiones de Arenas (2007) respecto a la evolución de la composición media del queso.

El queso de Genestoso se caracterizó por presentar un alto contenido en extracto seco al final de la maduración, mientras que los valores de materia grasa y proteína fueron muy similares a los descritos para otros quesos de vaca artesanales. Con la excepción del contenido en extracto seco, que presentó diferencias significativas en función de la época de elaboración, ni el contenido en materia grasa ni el de proteína las mostraron, ni en función del tiempo de maduración, época de elaboración o productor.

Tabla II.- Evolución de los principales parámetros químicos y físico-químicos del queso de Genestoso a lo largo de la maduración. (Valores medios de 8 lotes)

	Días de maduración					
	2	7	15	30	45	60
Acidez Titulable						
(g/100g ES)	2,02±0,30	1,55±0,28	1,52±0,35	1,42±0,19	1,34±0,29	1,42±0,50
Sal/Humedad						
(%)	0,25±0,08	1,69±0,65	2,28±1,49	4,66±2,78	7,03±3,09	9,28±3,52
Extracto Seco						
(g/100 g queso)	30,35±2,85	42,60±3,39	46,97±7,02	61,46±8,23	71,04±4,05	75,20±4,90
Grasa						
(g/100 g ES)	46,21±4,20	46,22±4,85	47,05±5,25	48,35±4,51	49,24±4,97	47,51±6,21
Proteína						
(g/100 g ES)	39,30±3,51	39,10±3,48	39,96±4,12	41,14±3,48	41,92±4,24	45,28±4,80
Cenizas						
(g/100 g ES)	2,68±0,80	3,89±0,85	3,64±0,83	3,80±0,81	3,70±0,76	3,71±0,63
Lactosa						
(g/100 g ES)	8,51±0,94	5,33±0,93	3,67±0,65	2,42±1,24	1,65±1,46	1,25±1,41
Actividad del agua						
a_w	0,995±0,003	0,984±0,005	0,975±0,006	0,953±0,015	0,931±0,025	0,910±0,026
pH						
	4,19±0,36	4,14±0,20	4,10±0,13	4,08±0,13	4,12±0,14	4,04±0,14

El contenido en lactosa experimentó el descenso más acusado durante el primer mes de la maduración, si bien al final de la misma todavía se mantuvieron niveles más o menos importantes dependiendo de la época de elaboración y de productor. El pronunciado descenso inicial del pH posiblemente influye en la actividad de la lactasa microbiana, así como en el desarrollo de la microbiota láctica, ralentizando el metabolismo de la lactosa; un comportamiento similar al obtenido en el queso Afuega'l Pitu (Margolles y col., 1996), Babia-Laciana (Franco y col., 2003) y Armada (Fresno y col., 1996).

El cociente sal/humedad se incrementó de manera muy notable a lo largo del primer mes de la maduración alcanzando niveles del 7-9%, con el consiguiente efecto negativo sobre la actividad enzimática del cuajo y el desarrollo de la microbiota láctica.

En general, los valores medios globales de la actividad de agua del queso de Genestoso mostraron un descenso gradual y significativo durante toda la maduración, difiriendo entre épocas de elaboración y productores a partir del primer mes de maduración.

El queso es un ecosistema en continuo cambio en el cual unas especies bacterianas suceden a otras de forma continua, dependiendo de las condiciones físico-químicas que a su vez son modificadas por el metabolismo de la propia microbiota. Los recuentos microbianos obtenidos en los diferentes medios de cultivo a lo largo de la elaboración y maduración del queso de Genestoso en las diferentes épocas del año (otoño-invierno, primavera-verano) se muestran en las tablas III y IV.

Los recuentos de la microbiota aerobia mesófila total, efectuados en plate count agar (PCA), fueron altos en la leche empleada en la elaboración de los diferentes lotes, alcanzando los máximos valores en los quesos de 2 días de maduración. Este comportamiento refleja la evolución seguida por la mayoría de los grupos microbianos y, en particular, por la microbiota láctica. Los recuentos de enterococos, llevados a cabo en kanamicine aesculine agar (KAA), difirieron entre los distintos lotes con respecto a la época del año y al productor, debido, probablemente, al grado de contaminación inicial de la leche y a la evolución de los parámetros físicos y químicos. La población de *Enterobacteriaceae*, aislada en violet red bile glucose agar (VRBGA), evolucionó de forma diferente en cada uno de los lotes dependiendo del productor y de la estación del año. Los recuentos obtenidos en manitol salt agar (MSA), medio empleado para el recuento y aislamiento de *Micrococcaceae*, fueron muy bajos desapareciendo en las primeras etapas de la maduración, y siendo incluso indetectables en alguno de los lotes desde el inicio de la misma. Por su parte, los recuentos de mohos y levaduras, llevados a cabo en el

medio oxytetracycline glucose yeast extract agar (OGYEA), aumentaron progresivamente hasta los 30 días de maduración, momento a partir del cual descendieron progresivamente hasta el término de la misma. De hecho, la correlación entre los parámetros físico-químicos y los recuentos en OGYEA fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) (Arenas y col, 2004).

Los recuentos en todos los medios de cultivo experimentaron un incremento en la cuajada debido, en parte, a la retención física de los microorganismos en el coágulo y a la multiplicación microbiana durante la coagulación y el drenaje del suero. Según Tatini y col. (1971), la retención física produce el incremento en una unidad logarítmica, siendo el crecimiento microbiano responsable del resto. Además hay que tener en cuenta la contaminación producida durante la elaboración de los quesos (Plommet y col., 1988).

La evolución de los recuentos en tres de estos medios queda reflejada en las gráficas 1 a 3. En M17 y Mayeux, Sandine y Elliker agar (MSE) se observó un incremento mayor de los recuentos en los estadios iniciales de la maduración, en comparación con los recuentos en ROGOSA, cuyo incremento fue paulatino hasta los 30-45 días de maduración. Lactococos y leuconostoc se multiplican activamente al inicio de la maduración, y debido a su capacidad acidificante provocan un rápido descenso del pH. En el transcurso de la maduración la población de lactococos desciende gradualmente, mientras que los lactobacilos, con un metabolismo más lento y mayor capacidad de adaptación a condiciones adversas dominan en etapas avanzadas de la maduración. La correlación negativa entre los valores de actividad de agua y los recuentos microbianos en agar ROGOSA así como la correlación positiva entre los mismos y el cociente sal/humedad, sugieren dicha capacidad de adaptación. Si bien este grupo microbiano es considerado microbiota láctica non-starter (NSLAB), gracias a su potencial enzimático contribuye al incremento de la concentración de péptidos de pequeño tamaño, aminoácidos libres y ácidos grasos libres en el queso, como han reseñado también otros autores (Albenzio y col., 2001).

Los recuentos de bacterias lácticas en M17 y MSE fueron inferiores a los obtenidos para otros quesos como Arzúa (Centeno y col., 1994), Cebreiro (Centeno y col., 1996) y San Simón (García Fontán y col., 2001). Desde el segundo día de maduración los recuentos en agar M17 fueron decreciendo gradualmente hasta el final de la misma, mientras que en MSE se observó un descenso de una o dos unidades logarítmicas la primera semana, manteniéndose después más o menos constantes hasta el final.

Tabla III.- Evolución de los recuentos microbianos (log UFC/g) obtenidos en los diferentes medios de cultivo durante la maduración del queso Genestoso elaborado por el primer productor en otoño-invierno y primavera-verano

		Queso (días de maduración)						
		Leche	2	7	15	30	45	60
PCA_m	o-i	7,04	10,12	8,15	8,20	8,08	8,16	8,04
	p-v	6,04	10,22	8,44	8,14	8,51	8,02	8,14
PCA_p	o-i	6,93	8,52	8,02	8,06	7,98	7,47	7,35
	p-v	4,92	8,12	6,90	7,90	8,01	6,37	6,73
M17	o-i	5,06	8,02	5,24	5,47	5,78	3,17	2,29
	p-v	3,70	7,57	5,74	4,93	3,15	5,39	5,10
MSE	o-i	4,35	7,63	5,40	5,25	5,36	5,35	5,07
	p-v	1,84	7,09	5,49	5,31	6,13	5,94	5,97
ROGOSA	o-i	4,85	7,43	7,35	7,55	7,57	7,47	7,53
	p-v	2,84	6,60	7,06	7,22	8,34	8,19	8,01
KAA	o-i	2,35	4,80	2,98	3,57	2,94	2,87	2,40
	p-v	1,02	4,32	3,76	2,99	-	-	-
VRBGA	o-i	3,21	4,01	-	-	-	-	-
	p-v	1,63	3,98	2,59	2,31	-	-	-
MSA	o-i	2,08	1,52	1,47	-	-	-	-
	p-v	1,46	2,29	-	-	-	-	-
OGYEÁ	o-i	3,97	6,09	6,63	6,95	6,84	6,94	6,86
	p-v	3,85	5,22	6,36	6,68	8,04	7,36	7,30

o-i: lotes elaborados en otoño-invierno.

p-v: lotes elaborados en primavera-verano.

Tabla IV.- Evolución de los recuentos microbianos (log UFC/g) obtenidos en los diferentes medios de cultivo durante la maduración del queso Genestoso elaborado por el segundo productor en otoño-invierno y primavera-verano

		Queso (días de maduración)						
		Leche	2	7	15	30	45	60
PCA_m	o-i	6,91	9,84	8,40	8,18	8,09	8,23	8,10
	p-v	6,95	9,78	9,44	8,97	8,99	8,70	8,56
PCA_p	o-i	6,45	9,79	7,80	7,85	7,75	7,49	7,57
	p-v	6,77	9,58	9,10	7,68	8,12	7,69	6,69
M17	o-i	4,49	7,81	6,30	6,12	3,87	5,32	4,85
	p-v	4,49	7,56	6,89	6,61	5,12	4,22	4,19
MSE	o-i	3,39	7,65	5,85	5,68	5,63	5,11	5,28
	p-v	3,17	6,78	6,01	5,58	5,89	6,00	5,49
ROGOSA	o-i	4,44	6,03	6,68	6,76	6,94	7,54	7,07
	p-v	5,48	6,90	7,40	7,98	9,27	8,93	8,67
KAA	o-i	4,98	6,48	7,69	7,53	7,48	7,70	6,63
	p-v	5,10	7,67	7,82	7,49	6,59	5,83	5,40
VRBGA	o-i	3,84	7,07	6,16	5,06	4,79	3,10	2,30
	p-v	4,39	7,91	6,64	5,96	-	-	-
MSA	o-i	1,40	1,67	0,97	-	-	-	-
	p-v	-	-	-	-	-	-	-
OGYEÁ	o-i	3,83	4,84	5,39	5,87	6,01	5,22	6,11
	p-v	4,01	5,00	5,35	5,68	6,00	4,91	5,47

o-i: lotes elaborados en otoño-invierno.

p-v: lotes elaborados en primavera-verano.

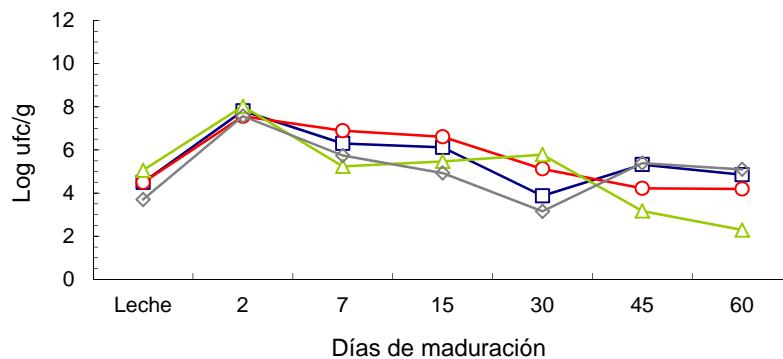


Figura 1.- Evolución de los recuentos en M17 durante la maduración del queso de Genestoso. (□ primer productor o-i, ○ segundo productor o-i, △ primer productor p-v, ◊segundo productor p-v)

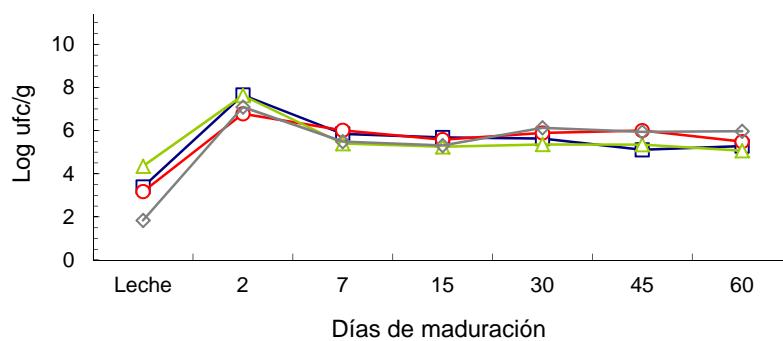


Figura 2.- Evolución de los recuentos en MSE durante la maduración del queso de Genestoso. (□ primer productor o-i, ○ segundo productor o-i, △ primer productor p-v, ◊segundo productor p-v)

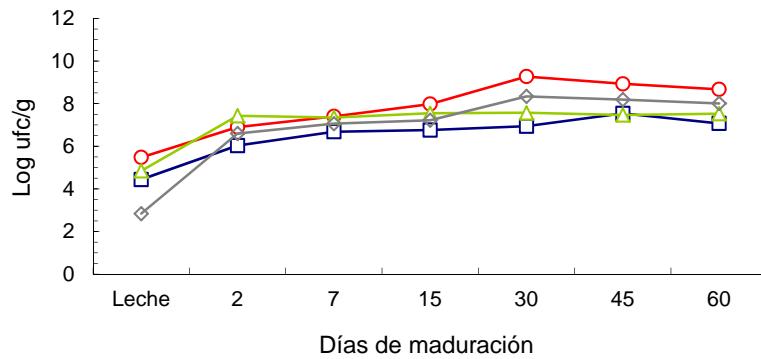


Figura 3.- Evolución de los recuentos en ROGOSA durante la maduración del queso de Genestoso. (□ primer productor o-i, ○ segundo productor o-i, △ primer productor p-v, ◊segundo productor p-v)

1.2.- Las bacterias lácticas

1.2.1.- Características generales de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas (BAL) comprenden un amplio rango de géneros que incluyen un considerable número de especies. Por regla general, las BAL se consideran Gram (+) y normalmente catalasa negativas, pudiendo crecer desde condiciones microaerofílicas hasta condiciones de anaerobiosis estricta y no forman esporas. Los géneros más importantes de bacterias lácticas son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Bifidobacterium* (Klein y col., 1998). Filogenéticamente las bacterias Gram (+) se dividen en dos grandes Phylum. Con la excepción de las bifidobacterias, todos los géneros mencionados pertenecen al Phylum de Gram (+) con un bajo contenido en Guanosina+Citosina (< 50%). El género *Bifidobacterium* no incluye bacterias Gram (+), pero se las considera BAL por tener propiedades fisiológicas y bioquímicas similares a los otros géneros, y compartir algunos nichos ecológicos, como el tracto gastrointestinal humano y productos fermentados (Scheifer y Ludwig, 1995).

Las BAL tienen limitadas habilidades biosintéticas (Klaenhammer y col., 2005) y altos requerimientos de fuentes de carbono y nitrógeno (Salminen y Von Wright, 1998) siendo su hábitat natural los ambientes ricos desde el punto de vista nutritivo, entre los cuales destacan los productos fermentados. De hecho, las bacterias lácticas contribuyen significativamente al flavor, textura, valor nutricional y seguridad microbiana de dichos alimentos, siendo objeto de numerosas aplicaciones industriales. Los géneros comúnmente seleccionados para estas aplicaciones son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Streptococcus*. Aunque también *Enterococcus* puede llegar a emplearse.

Algunas características fisiológicas importantes de las BAL desde el punto de vista taxonómico se refieren a los modelos de fermentación de los carbohidratos, la resistencia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, el crecimiento en presencia de distintos nutrientes, el crecimiento a distintas y determinadas temperaturas y la resistencia a antibióticos. Otras características fisiológicas tienen interés desde un punto de vista probiótico como la capacidad de supervivencia en el tracto gastrointestinal, basada en su resistencia a la presencia de sales biliares y a pH bajos (Fuller, 1989).

La taxonomía de las BAL se ha basado durante décadas en propiedades fenotípicas, de acuerdo a la serie de características anteriormente citadas. Los métodos modernos, basados en la biología molecular, han mostrado que estos grupos taxonómicos tradicionales son inconsistentes con las relaciones filogenéticas de las especies. Teniendo en cuenta las limitaciones de los métodos de identificación fenotípica se han impuesto los métodos moleculares como procedimientos alternativos y/o complementarios. Los métodos genotípicos se basan en análisis de homología de ADN, pruebas genéticas y técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) y análisis con enzimas de restricción. Otros métodos consisten en el análisis de la composición de la pared celular, análisis de proteínas citoplasmáticas solubles y movilidad electroforética de ciertos enzimas. Estas técnicas que se conocen como técnicas de taxonomía polifásica, se aplican combinadas y permiten diferenciar especies que fenotípicamente son muy similares pero genéticamente son bastante diferentes (Vandamme y col., 1996). De acuerdo a estas técnicas se han llevado a cabo revisiones de los grupos taxonómicos a nivel de especie, recogidas en la literatura científica.

1.2.2.- Importancia de las bacterias lácticas en el queso

Los quesos pueden ser clasificados siguiendo diferentes criterios, uno de los cuales se basa en los microorganismos que integran el cultivo iniciador. Una de las clasificaciones más recientes es la propuesta por Mucchetti y Neviani, (2006), diferenciando en quesos fabricados con:

- Leche pasterizada y cultivos iniciadores definidos
- Leche pasterizada y cultivos iniciadores naturales
- Leche cruda y cultivos iniciadores definidos
- Leche cruda y cultivos iniciadores naturales
- Leche cruda sin cultivo iniciador

El queso de Genestoso, según esta clasificación, pertenece a la categoría de queso elaborado con leche cruda sin cultivo iniciador. El proyecto de elaboración industrial del queso de Genestoso pretende como fin último la elaboración industrial de esta variedad con leche

pasterizada y un cultivo iniciador natural. Para ello es imprescindible la selección de cepas autóctonas con adecuada aptitud tecnológica.

Durante la maduración del queso de Genestoso, la evolución del pH, la actividad de agua y el cociente sal/humedad determinan un hábitat hostil para muchos microorganismos, excepto para algunas especies de bacterias lácticas que pueden multiplicarse en tales condiciones y ejercer al mismo tiempo efectos beneficiosos (Settanni y Moschetti, 2010).

Las bacterias lácticas juegan diferentes papeles en el proceso de fabricación del queso. Algunas especies participan más en la fermentación y otras están implicadas sobre todo en la maduración. En la fabricación del queso, las bacterias lácticas llevan a cabo la acidificación inicial de la leche, favoreciendo la coagulación. De hecho, su habilidad para producir ácido láctico es probablemente la propiedad más importante de las bacterias lácticas integrantes del cultivo iniciador, entre las que se encuentran los lactococos (Cogan y col., 1997). La capacidad acidificante contribuye también a la sinéresis de la cuajada, a la expulsión del suero, a la solubilización del calcio micelar y, por tanto, a la textura final del queso.

Las bacterias lácticas no integrantes del cultivo iniciador, “non-starter lactic acid bacteria” (NSLAB), contribuyen a la maduración de los quesos, desarrollando reacciones enzimáticas proteolíticas y lipolíticas. En este grupo se encuentran los lactobacilos, que en función de su aptitud tecnológica pueden incluirse como adjuntos en el cultivo iniciador (Williams y col., 1998). Algunas cepas tienen proteinasas asociadas a la pared celular que preferentemente hidrolizan la caseína. Los péptidos libres de la caseína son hidrolizados a péptidos más pequeños y a aminoácidos libres por las peptidasas intracelulares. La contribución de las bacterias lácticas a la lipólisis durante la maduración de los quesos es, por lo general, escasa. Sin embargo, algunas cepas son capaces de hidrolizar la grasa de la leche o al menos algunos triglicéridos (Gobbetti y col., 1996). Las lipasas y esterasas de las bacterias del cultivo iniciador y las bacterias NSLAB pueden influenciar, en mayor o menor medida, el desarrollo del flavor del queso.

Otras cualidades de las bacterias lácticas de particular interés en la industria quesera incluyen: la resistencia a bacteriófagos, la producción de sustancias antimicrobianas, las propiedades probioticas y la capacidad para formar compuestos bioactivos (De Vuyst y Leroy, 2007; Collado y col., 2007; Siragusa y col., 2007; Guglielmetti y col., 2008).

Por consiguiente, en tecnología quesera, la selección de cepas de bacterias lácticas influye en el buen desarrollo del coágulo y del proceso madurativo de los quesos. La capacidad

de producir bacteriocinas incrementa el interés de las cepas lácticas integrantes del cultivo iniciador. Cuando la acción antimicrobiana de las bacteriocinas se dirige hacia microorganismos patógenos y/o alterantes, la incorporación al cultivo iniciador de las cepas productoras de estos metabolitos conlleva sin duda ventajas.

Uno de los principales problemas en la distribución de algunos quesos artesanales es la dificultad de asegurar su calidad higiénico-sanitaria. Un ejemplo lo encontramos precisamente en el queso de Genestoso que se elabora con leche cruda y alcanza sus óptimas características sensoriales en menos de sesenta días de maduración. Un problema añadido es la ausencia de uniformidad entre lotes. La producción industrial de estos quesos requiere la pasterización de la leche y la adición de un cultivo iniciador. El uso de cultivos iniciadores autóctonos, constituidos por bacterias lácticas aisladas de los propios quesos artesanales y seleccionadas en función de su aptitud tecnológica podría garantizar la calidad higiénico-sanitaria de estos quesos, preservando las características que definen su identidad (Pérez y col., 2003). Las características específicas de sabor y aroma de los quesos artesanales pueden ser atribuidas al tipo de leche usado en la fabricación, a la calidad microbiológica, al grado de acidificación de la cuajada y a las condiciones de maduración. La presencia de microbiota autóctona introduce variabilidad en el proceso de maduración de los quesos, que no es fácilmente controlable, lo cual puede influir en las características finales del producto (Franciosi y col., 2008). Esta variabilidad ha sido detectada entre elaboraciones de diferentes industrias (Antonsson y col., 2003; De Angelis y col., 2001), productores, así como entre quesos fabricados en la misma quesería en días distintos y entre quesos de diferentes lotes del mismo día de fabricación (Williams y Banks., 1997; Fitzsimons y col., 1999;). Por todo ello y con el fin de minimizar la variabilidad en todo el proceso de producción de los quesos, es muy importante el control de dicha microbiota.

Las NSLAB se han seleccionado tradicionalmente en función de las características organolépticas que confieren a los quesos gracias a su aptitud tecnológica (Beresford y Williams, 2004). Sin embargo, los criterios de selección de cepas destinadas a formar parte de cultivos iniciadores deben tener en cuenta, además, la patogenicidad de las cepas y la posibilidad de que tengan efectos nocivos en la salud de los consumidores o para el medio ambiente. Por ello es importante una diferenciación clara de posibles patógenos y la determinación de factores de virulencia, en particular si se trata de cepas del género *Enterococcus*. De hecho, las cepas pertenecientes a este género además de formar parte de la microbiota natural de los quesos artesanales y contribuir notablemente al flavor de los mismos, son reconocidos patógenos nosocomiales que causan bacteriemia, endocarditis y otras infecciones (Saavedra y col., 2003), y

presentan resistencia intrínseca a determinados antibióticos, particularmente a la vancomicina, uno de los antibióticos reservados para combatir microorganismos multirresistentes (Olivares y col., 2006).

1.2.3.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas

En los últimos años se ha incrementado notablemente el interés por los conservantes naturales debido a la demanda por parte de los consumidores de que los alimentos sean seguros desde un punto de vista higiénico-sanitario y si es posible tengan efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, aditivos químicos como los nitratos siguen siendo usados en la industria quesera. Las bacterias lácticas con capacidad antimicrobiana incluidas en los cultivos iniciadores o como co-cultivos constituyen una prometedora alternativa al empleo de conservantes en ciertos procesos tecnológicos tales como la elaboración de queso (Foulquié Moreno y col., 2003).

La capacidad inhibitoria de las bacterias lácticas se debe tanto al acúmulo de metabolitos primarios (láctico, acético, etanol y CO₂) como a la producción de otros compuestos antimicrobianos (ácidos fórmico y benzoico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetoína y bacteriocinas). Los niveles de producción de estos compuestos y la proporción en la que se encuentran dependen de la cepa y de la composición del medio de cultivo. Las bacteriocinas merecen atención aparte al tratarse de un grupo de sustancias de naturaleza proteica con capacidad antimicrobiana, liberadas extracelularmente. Producidas por un amplio rango de cepas bacterianas, generalmente muestran actividad frente a bacterias cercanas filogenéticamente y frente a las cuales la cepa productora tiene mecanismos de protección específica (Delgado y col., 2001). Las bacteriocinas han sido ensayadas como agentes antipatógenos en infecciones del tracto digestivo humano (O'Connor y col., 2006; Millette y col., 2008).

Un cultivo iniciador constituido por bacterias lácticas autóctonas seleccionadas por su aptitud tecnológica y por la capacidad de producir bacteriocinas activas frente a microorganismos potencialmente patógenos para el hombre o responsables de alteraciones en el queso, tiene sin duda un amplio rango de aplicaciones en la producción de quesos artesanales (Daeschel, 1989; Schillinger y col., 1996; Cleveland y col., 2001; Silva y col., 2002).

Los microorganismos con capacidad de producir bacteriocinas se presentan como una alternativa para suplementar las terapias con antibióticos (Saavedra, 2001; Senok y col., 2005).

Dos hechos principales distinguen a la mayoría de las bacteriocinas de los antibióticos clásicos su síntesis ribosomal y su espectro de actividad (Riley y Wertz, 2002).

La regulación de la expresión de la síntesis de bacteriocinas no es dependiente del ciclo celular, *per se*, pero en bacterias Gram (+) sí parece estar relacionada con el paso de la fase logarítmica a la fase estacionaria y ser bastante dependiente por tanto de la densidad del cultivo (Dufour y col., 2007). La expresión de las bacteriocinas está regulada por su concentración en el medio. Su biosíntesis está regulada por los mecanismos de transporte a través de membrana, facilitando su liberación (Gillor y col., 2008). El rango de actividad de las bacteriocinas varía significativamente desde el relativamente estrecho, en el caso de las lactococcinas A, B y M, hasta el más amplio rango, por ejemplo, de la nisin A y mutacina B-Ny 266 (Martínez-Cuesta y col., 2006). Contrariamente a la visión convencional, otros autores apuntan que las bacteriocinas producidas por Gram (+) son de más amplio espectro de actividad, no sólo frente a las relacionadas filogenéticamente sino también frente a bacterias Gram (-) de importancia médica (Morency y col., 2001). De hecho, las bacteriocinas producidas por cepas del género *Enterococcus* aisladas de alimentos son péptidos de clase II con actividad anti listeria. (Ennahar y col., 2001; Saavedra y col., 2003; Foulquié Moreno y col., 2003).

1.2.4.- Capacidad probiótica de las bacterias lácticas

De acuerdo a las recomendaciones de la FAO/WHO (Food and Agricultural Organization and World Health Organization Expert Consultation), los probióticos deben ser capaces de ejercer beneficios al hospedador. Sin embargo, los efectos descritos sólo pueden ser atribuidos a las cepas analizadas en cada estudio y no se puede generalizar a toda la especie ni a todo el grupo de bacterias lácticas u otros probióticos (Guías prácticas de la Organización Mundial de GastroEnterología, 2008). Además, es la especificidad de la acción y no la fuente de los microorganismos lo que es importante (FAO, 2001). No obstante, un requisito en cada posible cepa probiótica es la capacidad de seguir siendo viables y efectivas en el tracto gastrointestinal. El ambiente ácido del estómago y la presencia de ácidos biliares en el duodeno son los factores que más afectan a la viabilidad de las bacterias probióticas (Mainville y col., 2005). A este respecto, las cepas de *Lactobacillus* son relativamente resistentes a pH ≥ 3 y toleran bien los ácidos biliares bajo condiciones *in vitro* (Verdenelli y col., 2009). Por lo general, las cepas de *Enterococcus* muestran mayor resistencia a las sales biliares (1, 2 y 3 % de concentración) que

otras bacterias lácticas (Rossi y col., 1999; Bhardwaj y col., 2010), si bien, cepas de *Lactococcus* y *Leuconostoc* pueden presentar un crecimiento aceptable en medios suplementados con sales biliares (Cho y Do, 2006; Kimoto-Nira y col., 2009).

Los microorganismos probióticos son microorganismos vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos (llamados funcionales), medicamentos y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las usadas más comúnmente como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *Escherichia coli* y *Bacillus* también son utilizadas como probióticos. Algunas cepas de bacterias lácticas empleadas como cultivos en la elaboración de productos fermentados pueden ejercer un efecto beneficioso para la salud del consumidor. Ello guarda relación con la capacidad que tienen las bacterias lácticas de colonizar el tracto gastrointestinal humano (Panesar, 2011). Además, productos lácteos fermentados como el queso constituyen “vehículos” idóneos de cepas probióticas, al encontrar en la matriz del queso condiciones adecuadas para su supervivencia y actividad metabólica (Mäkeläinen y col., 2009). De hecho, estudios recientes han mostrado que el queso puede ser un ambiente menos hostil para las bacterias probióticas que otros productos lácteos, teniendo en cuenta la capacidad de supervivencia, no sólo en el producto, sino en el tracto gastrointestinal (Gomes da Cruz y col., 2009).

Actualmente se está invirtiendo mucho esfuerzo en la investigación y desarrollo de cultivos iniciadores probióticos para incorporar en el queso, de modo que este producto pueda incluirse en la categoría de “alimentos funcionales”. El queso parece ser un excelente vehículo de probióticos aunque en España no existen quesos comerciales fabricados con cultivos iniciadores de este tipo, a excepción de algunos como el queso Acti-Bif de García Baquero que incorpora *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias (Mayo, 2010). Las características probióticas no son propiedades generales asociadas a un género o especie bacteriana, sino que dependen de cada cepa particular. Tampoco parecen existir probióticos “universales” que presenten todas las propiedades deseables, sino que cada cepa presenta una o unas pocas características deseables (Mayo, 2010).

Las bacterias lácticas con carácter probiótico presentan, por lo general, alguna de las siguientes características: capacidad de inhibir la colonización patogénica, mejorar la digestibilidad de algunos alimentos, modular el sistema inmune, reduciendo los niveles de

enzimas involucrados en la formación de moléculas inductoras de tumores y agentes mutagénicos y carcinogénicos, reducir la absorción del colesterol ingerido en la dieta y producir bacteriocinas (Saavedra y col., 2003).

Es importante añadir el comportamiento probiótico de algunas actividades enzimáticas de bacterias lácticas. Algunos enzimas, como la β -galactosidasa de las bacterias lácticas compensan la debilitada capacidad de estas bacterias para sobrevivir a través del tracto gastrointestinal, puesto que aunque las bacterias propiamente dichas no resistan las condiciones de este medio, sus enzimas sí llegan activas al intestino (Vinderola y Reinheimer, 2003). Los cultivos de bacterias lácticas pueden hacer disponibles sustratos prebióticos gracias a su actividad enzimática, como es el caso de la actividad α -galactosidasa de las bacterias lácticas (Roopashri y Varadaraj, 2009). El efecto prebiótico de un carbohidrato se valora en función de su capacidad de estimular la proliferación de bacterias deseables (bifidobacterias, lactobacilos...) en detrimento de las no deseables (bacteroides, clostridios, E. coli) (Salmiron y col., 1998).

1.3.- Bibliografía

Albenzio, M. Corbo, M.R., Rehman, U.S., Fox, P.F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobetti,M. 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology* 67, 35-48.

Antonsson, M., Molis, G., Ardö, Y. 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology* 85, 159-169.

Arenas R., 2007. Caracterización del queso Genestoso durante su maduración: estudio microbiológico, físico-químico, bioquímico y reológico. Tesis Doctoral Universidad de León, España.

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.

Beresford, T., Williams, A. 2004. The microbiology of cheese ripening. In cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General Aspects, pp 287-318. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. y Guinee, T. P., Eds. London: Elsevier.

Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Gurpreet, K., Vij S., Malik R.K. 2010. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH strain under *in vitro* and *in vivo* conditions. *International Journal of Food Microbiology* 141, 156-164.

Centeno, J.A., Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L. 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese (NW Spain). *International Journal of Food Microbiology* 33, 307-313.

Centeno, J.A., Rodríguez-Otero, J.L., Cepeda, A. 1994. Microbiological study of Arzúa cheese (NW Spain) throughout cheesemaking and ripening. *Journal of Food Safety* 14, 229-241.

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., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, S., Cocconcelli, P.S., Fernandes, L., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Lledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodríguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisan dairy products. *Journal of Dairy Research* 64, 409-421.

Collado, M.C., Surono, I.S., Meriluoto, J., Salminen, S. 2007. Potential probiotic characteristics of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains isolated from traditional dadih fermented milk against pathogen intestinal colonization. *Journal of Food Protection* 70, 700-705.

Cho, G.S., Do, H.K. 2006. Isolation and identification of lactic acid bacteria from a traditional jeotgal product in Korea. *Ocean Science Journal* 41, 113-119.

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.

De Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *Journal of Molecular Biotechnology and Microbiology* 13, 194-199.

Delgado A., Brito D., Fevereiro P., Peres C. y Figueiredo Marqués J. 2001. Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Lait* 81, 203-215.

Dufour, A., Hindre, T., Harar, D., Le Pennec, J.P. 2007. The biology of lantibiotics from the lacticin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiology Review* 31, 134-167.

Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology* 70, 291-301.

Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3418-3426.

Food and Agricultural Organization and World Health Organization Expert Consultation. (**FAO/WOHEC**) Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina: Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. 2001. Available from: ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio_report_en.pdf.

Foulquié Moreno, M.R., Rea M.C., Cogan, T.M. y De Vuyst, L. 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 81, 73-84.

Franciosi, E., Settani, L., Cavaza, A., Poznanski, E. 2008. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International of Dairy Journal* 19, 3-11.

Franco, I., Prieto, B., Bernardo, A., González-Prieto, M.J., Carballo, J. 2003. Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, 13, 221-230.

Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., González-Prieto, M.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.

Fuller R. 1989. A review. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.

García-Fontán, M.C., Franco, I., Prieto B., Tornadijo M.E., Carballo J. 2001 Microbiological changes in "San Simón" cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. *Food Microbiology* 18, 25-33

Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 591-606

Gobbetti, M., Smacchi, E., Fox, P., Stepaniak, L., Corsetti, A. 1996. The sourdough microflora. Cellular localization and characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 29, 561-569.

Gomes da Cruz, A., Alonso Buriti, F.C., Batista de Souza, C.H., Fonseca Faria, J.A., Isay Saad, S.M. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science and Technology* 20, 344-354.

Guglielmetti, S., De Noni, I., Caracciolo, F., Molinari, F., Parini, C., Moro, D. 2008. Bacterial cinnamoyl esterase activity screening for the production of a novel functional food product. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1284-1288.

Guías de la Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE). 2008. Probióticos y Prebióticos.

Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nombra, M., Sasaki, K. y Suzuki, C. 2009. Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: Analysis by using different growth media. *International Journal of Food Microbiology* 131, 182-188.

Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcárate-Peril, M.A., Altermann, E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria affecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393-409.

Klein, G., Pack A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 41, 103-125.

Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E.R. 2005. A dinamyc model that stimulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 99, 287-296.

Mäkeläinen, H., Forssten, S., Olli, K., Granlund, L., Rautonen, N., Ouwehand, A.C. 2009. Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal* 19, 675-683.

Margolles, A., Rodríguez, A., de los Reyes-Gavilán, G. 1996. Some chemical and bacteriological characteristics of regional cheeses from Asturias, Spain. *Journal of Food Protection*, 59, 509-515.

Martínez Cuesta, T., Requena, T, Peláez C. 2006. Cell membrane damage induced by lacticin 3147 enhances aldehyde formation in *Lactococcus lactis* IFPL 730. *International Journal of Food Microbiology* 109, 198-204.

Mayo, B. 2010. Productos lácteos del s. XXI: conjugando tradición e innovación. Ponencia XIV Jornada Anual de ACTA/CL. Valladolid, España.

Millette, M., Cornut, G., Dupont, C., Sharek, F., Archambault, D., Lacroix, M. 2008. Capacity of human nisin- and pediocin- producing lactic acid bacteria to reduce colonization by vancomycin- resistant enterococci. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1997-2003.

Morency ,H., Motta-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., Lavoire, M.C. 2001. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 322-331.

Mucchetti, G., Neviani, E. 2006. Microbiologia e tecnologia lattiero-cascaria. Qualità e sicurezza. Tecniche Nuove, Milano.

O'Connor, E.B., O'Riordan, B., Morgan, S.M., Whelton, H., O'Mullane, D.M., Ross, R.P., Hill, C. 2006. A lacticin 3147 enriched food ingredient reduces *Streptococcus mutans* isolated from the human oral cavity in saliva. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1251-1260.

Olivares, M., Martín, R., Díaz-Próspero, M.P., Boza, J., Jiménez, J., Rodríguez, J.M., Xaus, J. 2006. Potencial probiótico de cepas de lactobacilos aisladas de leche humana, heces infantiles y alimentos fermentados. *Microorganismos y Salud: Bacterias lácticas y Bifidobacterias probióticas*. Rodríguez Gómez, J.M. (coordinador). Editorial Complutense. Madrid.

Panesar, P.S. 2011. Fermented dairy products: starter cultures and potential nutritional benefits. *Food Nutritional Science*, 2, 47-51.

Pérez G., Cardell E., Zárate V. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *International Journal of Science and Technology* 38, 537-546.

Plommet, M., Fensterbank, R., Vassal, L., Avelair, J., Mocquot, G. 1988. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. *Le Lait* 68, 115-120.

Riley, M.A., Wertz J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review in Microbiology* 56, 117-137.

Roopashri, A.N., Varadaraj, M.C. 2009. Molecular characterization of native isolates of lactic acid bacteria, bifidobacteria and yeasts for beneficial attributes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 1115-1126.

Rossi, E.A., Vendramini, R.C., Carlos, I.Z., de Valdez, G.F. 1999. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *European Food Research Technology* 209, 305-307.

Saavedra, J.M. 2001. Clinical applications of probiotics agents. *American Journal of Clinical and Nutrition* 73, 1475-1515.

Saavedra, L., Taranto, M., Sesma, F., Font de Valdez, G. 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 88, 241-245.

Salminen, S., Deighton, M.,A., Benno, Y., Gorbach, S.,L. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. pp, 211–54. Salminen, S., von Wright, A., eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. New York.

Salmiron, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.,C. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *BR Journal of Nutrirtion* 80, 5147-5171.

Scheiffer K.H., Ludwig W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic Applied of Microbiology* 14, 461-467.

- Schillinger, U., Geissen, R., Holzapfel, W.H.** 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology* 7, 158-164.
- Senok, A.C., Ismaeel A.Y., Botta G.A.** 2005. Probiotics: facts and myths. *Clinical and Microbiology Infection* 11, 958-966.
- Settanni L., Moschetti G.** 2010. Non starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* 27, 691-697.
- Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P., Gibbs, P.A.** 2002. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 34, 77-81.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R., Gobbetti, M.** 2007. Sintesys of γ - aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7283-7290.
- Tatini, S.R., Jezeski, J., Morris, H.A., Olson, J.C., Casman E.P.,** 1971. Production of Staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. *Journal of Dairy Science* 54, 815-825.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vor, P., Kersters, K. Y., Swings, J.** 1996. Polyphasic approach to bacterial systematic. *Microbiology reviews* 60, 407-438.
- Verdenelli, M.C., Ghelfi, S.S., Orpianesi, C., Cecchini C., Cresci A.** 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition* 48, 355-363.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A.** 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36, 895-904.
- 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 Dairy Journal* 7, 763-774.
- Williams, A.G., Felipe X., Banks J.M.** 1998. Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobacillus* spp. and non-starters lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 8, 255-266.

2.-JUSTIFICACIÓN

Este trabajo se incluye en una línea de investigación dedicada al estudio de la caracterización y tipificación de quesos artesanales, que implica el estudio químico, físico-químico, bioquímico, microbiológico, reológico y organoléptico de varios quesos artesanales tradicionales de la provincia de León, pero también de quesos cántabros, gallegos y, como el caso que nos ocupa, asturianos. El objetivo último de estos estudios es establecer pautas tecnológicas que permitan la continuidad de la elaboración de los quesos tradicionales e iniciar su industrialización sin pérdidas de tipicidad a la vez que garantizar la calidad higiénico-sanitaria de los mismos. Los quesos elaborados con leche cruda de modo artesanal carecen en ocasiones de garantía sanitaria. La industrialización exige, entonces, la pasterización de la leche y la adición a la misma de cultivos iniciadores que contribuyan a la maduración de los quesos y eviten la pérdida de su peculiaridad.

Las investigaciones centradas en este objetivo constituyen a nuestro modo de ver una apuesta científica, tecnológica y empresarial interesante. Para que los productos tradicionales puedan implantarse en el mercado deben adaptarse a las modernas tecnologías y a las demandas alimentarias actuales. La producción empresarial de alimentos y la investigación científica deben contribuir a dicha adaptación

Actualmente los cultivos comerciales existentes en el mercado son empleados de modo estándar en la elaboración de una amplia variedad de quesos. Una alternativa para los quesos artesanales es el diseño de cultivos iniciadores autóctonos constituidos por cepas de BAL, aisladas de los mismos quesos elaborados con leche cruda y seleccionadas en función de sus características tecnológicas.

2.1.-Interés social

Los estudios de caracterización de los quesos artesanales tradicionales 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 sistemas de elaboración industrial, incrementando su volumen de producción y su ámbito de distribución. Con respecto al queso de Genestoso cabe destacar el interés que han mostrado ciertas entidades políticas y económicas del Gobierno del Principado de Asturias como la Consejería de Agricultura y la agencia de Desarrollo Local del Ayuntamiento de Cangas del

Narcea, tratando de evitar que el queso de Genestoso caiga en el olvido, así como de impulsar su industrialización. De este modo, se aseguraría la conservación de este peculiar queso y se generaría empleo tanto en la localidad de origen del producto, como en el Concejo cangués en el que se ubica.

Si tenemos en cuenta la importancia que actualmente está teniendo en nuestra civilización occidental el gusto por lo tradicional, por recuperar o no perder todos aquellos rasgos que forman nuestra identidad histórica y cultural podemos entender el interés que hay en recuperar o no perder, productos alimenticios o tecnologías alimentarias centenarias. Cabe destacar también que el consumidor moderno está cada vez más informado y percibe una clara relación entre alimentación y salud. Así, exige que los alimentos aporten nutrientes, sean seguros desde el punto de vista higiénico-sanitario, tengan buenas cualidades organolépticas y posean, en la medida de lo posible, efectos beneficiosos para la salud. El interés creciente por la calidad de los productos alimenticios ha hecho surgir con fuerza en las últimas décadas el gusto por los productos tradicionales amparados en marcas de calidad garantizadas. Las denominaciones de origen protegidas (DOP), las indicaciones geográficas protegidas (IGP) y las especialidades tradicionales garantizadas (ETG) son algunos ejemplos de ello, que en la actualidad rigen en todo el ámbito comunitario europeo (Reglamento CE 510/2006). Todas estas marcas se hallan respaldadas por un interés social creciente que posibilita la demanda de productos con calidad certificada por la que se está dispuesto a pagar un poco más.

2.2.-Interés científico y tecnológico

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 Genestoso (Arenas, 2007).

Los productos lácteos tradicionales albergan una enorme reserva de diversidad microbiana fenotípica y genética que puede tener muchas aplicaciones biotecnológicas (Van Hyckama Vlieg y col., 2006; Alegría y col., 2009). 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. Para ello 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. 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

La fabricación industrial de quesos que hasta ahora se elaboran de modo exclusivamente artesanal partiendo de leche cruda y sin adición de fermentos podría suponer cierta pérdida de autenticidad de estos quesos al implicar la pasterización de la leche y la adición a la misma de un cultivo iniciador estándar. Con el objetivo de preservar las características típicas de esta variedad se planteó la obtención de un cultivo iniciador constituido por cepas de BAL aisladas del queso de Genestoso tradicional y seleccionadas en función de su aptitud tecnológica, su actividad antimicrobiana y su capacidad probiótica.

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, por las condiciones higiénicas mantenidas durante el proceso y por las condiciones de maduración. El empleo de leche cruda y la falta de estandarización en las condiciones de elaboración y maduración introducen variaciones en la calidad de los quesos elaborados de modo artesanal. Por lo tanto, la disponibilidad de cultivos iniciadores autóctonos facilita la puesta a punto de una tecnología de fabricación industrial que garantice la calidad higiénico-sanitaria y sensorial y que, además, permita uniformizar y conservar esta variedad.

En este sentido quedan pendientes algunos aspectos de la investigación antes de que las cepas que han sido seleccionadas del queso de Genestoso elaborado con leche cruda puedan constituir un cultivo iniciador. Estos aspectos pendientes se refieren al ensayo de los cultivos en planta piloto para la fabricación de queso Genestoso partiendo de leche pasterizada y el análisis químico, microbiológico y organoléptico de los quesos así elaborados para seleccionar el cultivo que mejor reproduzca las características de la variedad artesanal. Por otra parte, se hace imprescindible comprobar la inocuidad de las cepas integrantes del cultivo iniciador.

2.3.- Bibliografía

Arenas, R. 2007. Caracterización del queso de Genestoso durante su maduración: estudio microbiológico, físico-químico, bioquímico y reológico. Tesis doctoral. Universidad de León, España.

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 Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 44-51.

Van Hylckama Vlieg, J.E.T., Rademaker, J.L.W., Bachmann, H., Malenaar, D., Kelly, W.J., Siezen, R.J. 2006. Natural diversity and adaptive response of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 183-190.

3.- OBJETIVOS

1. **Aislar** un número representativo de cepas de bacterias lácticas en diferentes medios de cultivos selectivos o electivos, a lo largo de la elaboración y maduración del queso de Genestoso.
2. **Identificar** a nivel de especie las cepas de bacterias lácticas aisladas, empleando pruebas bioquímicas y fisiológicas de la microbiología clásica, así como técnicas de biología molecular.
3. **Detectar** la actividad antimicrobiana de las cepas de bacterias lácticas frente a cepas patógenas y/o alterantes empleadas como indicadoras y **detectar** la capacidad de producir bacteriocinas en las cepas que manifiesten dicha actividad.
4. **Seleccionar** las cepas con actividad antimicrobiana frente a uno o más microorganismos indicadores y **determinar** su incompatibilidad.
5. **Determinar** de forma semicuantitativa, mediante el sistema Api-ZYM, la actividad enzimática de las cepas de bacterias lácticas seleccionadas.
6. **Cuantificar** la actividad enzimática de las cepas de bacterias lácticas seleccionadas y **determinar** su aptitud tecnológica.
7. **Diseñar** uno o más cultivos iniciadores constituidos por combinaciones de cepas de bacterias lácticas con mayor proyección tecnológica y/o probiótica.
8. **Transferir** los resultados de la investigación al sector industrial con vistas a su utilización para impulsar la industrialización de esta y otras variedades de quesos artesanales.

El último de estos objetivos aún no ha sido completado ya que se requiere previamente el ensayo en planta piloto de los cultivos iniciadores propuestos. Esto se abordará en otro trabajo de investigación, debido a la envergadura del mismo, e incluirá la elaboración de varios lotes de queso de Genestoso, siguiendo el procedimiento de elaboración tradicional. Se fabricarán algunos lotes con leche pasterizada a la que se incorporará en unos casos el cultivo iniciador autóctono de elección y en otros uno comercial. También se elaborará otro lote con leche cruda a la que no se va a añadir cultivo y que constituirá la referencia para los análisis químicos, bioquímicos, microbiológicos y organolépticos. El cultivo o cultivos iniciadores que

mejor reproduzcan las características típicas del queso de Genestoso podrán ser transferidos al sector industrial para elaborar queso de Genestoso con leche pasterizada y dicho cultivo autóctono.

4.- PUBLICACIONES

4.1.-Artículos:

- 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.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Torbadijo, 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, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2010. "Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese". *Food Microbiology* 27, 592-597.
- González, L., Fernández, D., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2013. "Enzymatic activity surface hydrophobicity and biogenic amines production in lactic acid bacteria isolated from an artisanal Spanish cheese". *African Journal of Microbiology Research*.

Factor de impacto (FI) en el año de publicación

REVISTA	FI	CATEGORÍA
Food Control	1,132 (2004) 1,823 (2007)	Food Science and Technology
Food Microbiology	3,320	Food Science and Technology
African Journal of Microbiology Research	0,540	Microbiology

4.2.-Comunicaciones a Congresos:

- XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos. Bilbao, 2002. "Evolución de la flora microbiana durante la elaboración y maduración del queso de Genestoso".
- XIX Congreso Nacional de Microbiología. Santiago de Compostela, 2003. "Identificación de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso".
- III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Burgos, 2005. "Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso durante su maduración"
- XX Congreso Nacional de Microbiología. Cáceres, 2005. "Bacterias lácticas (lactococos) aisladas del queso de Genestoso durante su maduración. Actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia".
- XV Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Ourense, 2006. "Aptitud tecnológica de cepas de bacterias lácticas con capacidad antimicrobiana, aisladas del queso de Genestoso".
- XXI Congreso Nacional de Microbiología. Sevilla, 2007."Estudio de la actividad proteolítica de *Geotrichum candidum* y bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales".
- II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria. V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos. Barcelona, 2008. "Estudio de la aptitud tecnológica de cepas de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos tradicionales como criterio de selección para uso comercial en starters".
- 3rd Congress of European Microbiologists. FEMS. Gothenburg, 2009. "Esterase activity of LAB isolated from an artisanal Spanish cheese".

Artículo I



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.

Available online at www.sciencedirect.com

Food Control 15 (2004) 271–279

**FOOD
CONTROL**www.elsevier.com/locate/foodcont

Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening

R. Arenas, L. González, A. Bernardo, J.M. Fresno, M.E. Tornadijo *

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

Received 11 October 2002; received in revised form 29 March 2003; accepted 31 March 2003

Abstract

The aim of this work was to study the microbiological and physico-chemical changes in four batches of Genestoso cheese (two ripened in autumn–winter and the other two in spring–summer) throughout manufacture and ripening.

In general, the pH decreased more quickly in the cheeses manufactured in spring which, moreover showed values lower in a_w and higher in salt/moisture content.

The highest counts of aerobic mesophilic bacteria, presumptive lactococci and presumptive leuconostoc were reached in 2 day old cheeses. Lactobacilli and fungic flora became predominant with ripening. The counts of enterococci differed between the batches, but in general the maximum counts in kanamycin aesculin azide were obtained after ripening for 2 or 7 days. The counts on mannitol salt agar were very low and disappeared in the first days of ripening. *Enterobacteriaceae* were not detected after 15 days of ripening in the cheeses manufactured in spring nor in the 7 day old cheeses of an autumn batch.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cheese; Characterization; Microbiological changes; Physico-chemical parameters

1. Introduction

The Genestoso cheese is named after the municipality in which it is manufactured, belonging to the council of Cangas del Narcea, in the Principality of Asturias, in the Northwest of Spain. This is a short-ripened acid-curd cheese, manufactured with raw cow's milk from the "Asturiana de los Valles" breed, though it was first manufactured with goat milk and later on with a mixture of goat milk, cow milk and sheep milk. Its manufacture is exclusively artisanal and with a very limited production. However, the popularity which this cheese has in Asturias and the inability to guarantee the hygiene of artisanal cheese has motivated the local and regional institutions to develop a project of industrialization of Genestoso cheese. The challenge which this project creates is to manufacture Genestoso cheese with pasteurized milk since the best organoleptic characteristics of this cheese are obtained with short period of ripening (20–30 days). It also tries to group together in a

cooperative the different farmers interested in the industrialization of Genestoso cheese.

Firstly we have to ascertain the characteristics which identify the Genestoso cheese. The characterization of an artisanal cheese includes the study of the technological process of manufacture, the chemical and biochemical study of ripening process and the microbiological changes which take place.

The object of this work was to study the evolution of several microbial groups during manufacture and ripening of Genestoso cheese and to find the relationship between its microbiological and physico-chemical characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Cheese manufacture and sampling

Four batches of Genestoso cheese, two ripened in autumn–winter and the other two in spring–summer, were manufactured by two cheesemakers following the traditional methods. Each of the artisans made a batch in autumn (consisting of six cheeses) and the other in

* Corresponding author. Tel.: +34-987-291184; fax: +34-987-291284.

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

spring (consisting the other six cheeses), making a total of 24 cheeses.

The cheeses were made with raw and whole cow milk from the "Asturiana de los Valles" breed. Five to ten ml of commercial calf rennet (1:10,000 strength) for every 100 l of milk was added to the milk just milked and was left to coagulate at a room temperature (20–25 °C) for 24 h. After which the curd was transferred to pierced plastic moulds where it was kept while draining the whey by its own weight for 24 h more. After that two radial cuts were made and it was left to release the whey another 24 h. The curd was kneaded manually for 5 min to homogenize the whole mass. Salting was carried out by adding solid salt (approximately 10–12 g salt to every 2 kg of curd). Afterwards, the curd was kneaded again for 5 min to distribute the salt uniformly throughout the curd. The salted curd was transferred to straw mats where it was left for 2–3 days, turning them over daily until the crust had hardened. After which the esparto was removed, and were left to ripen on wood shelves in rooms or raised granaries for a total of 60 days. The environmental temperatures and relative humidity (RH) varied according to the time of year. In autumn, the minimum and maximum temperatures were around 5 and 11 °C respectively, and the RH fluctuated between the minimum values of 50% to maximum ones of 75–80%. The temperatures in the spring–summer period were 12 °C minimum and 22 °C maximum and the RH varied between minimum values of 52% to maximum ones of 60%.

After ripening for 30 days the cheeses were characterized by presenting a reel shaped, semihard whitish-yellowish mass, wrinkled crust and weighing about 500–600 g. The cheeses presented a flavour profile characterized by intense acidity, a smell of yeast, aromatic herbs and butter. The texture was crumbly, sticky and harsh on the palate. At the end of the ripening period (60 days) the mass became harder and very crumbly and the crust was lightly mildewed, the weight reducing to about 300–400 g.

Milk and 2, 7, 15, 30, 45 and 60 day old cheese samples were taken from each batch. Each sample was made up of one whole cheese. The cheese and milk samples were taken to the laboratory under refrigeration (below 5 °C) and analyzed on arrival.

2.2. Microbiological analysis

Fifty grams of each sample were homogenized with 200 ml of a sterile solution of 2% (w/v) sodium citrate (Panreac, Barcelona, Spain) at 40–45 °C for 1 min in a Masticator (IUL instruments, Barcelona, Spain), thus making a 1/5 dilution. Decimal dilution were prepared by mixing 10 ml with 90 ml of 0.1% (w/v) sterile peptone water (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK), ac-

cording to International Dairy Federation (IDF) standard 122B (1992).

Aerobic mesophilic bacteria were enumerated on a standard plate count agar (PCA) (Oxoid), after incubation at 30 °C for 48 h (APHA, 1978), aerobia psychrotrophic bacteria on standard PCA (Oxoid) after incubation at 7 °C for 10 days (APHA, 1978), lactic acid bacteria were ascertained on three media: M17 agar (Biokar, Beauvais, France), that is the medium for counting and isolating of lactococci (Terzagui & Sandine, 1975) after incubation at 30 °C for 18–24 h, MSE agar (Biokar), used for counting and isolating *Leuconostoc* (Mayeux, Sandine, & Elliker, 1962) after incubation at 22 °C for 4 days, and ROGOSA agar (Oxoid), selective medium for counting and isolating of lactobacilli (Rogosa, Mitchell, & Wiseman, 1951) after incubation at 30 °C for 5 days. *Micrococcaceae* were determined on mannitol salt agar (MSA) (Chapman, 1945) (Oxoid) incubated for 48 h at 30 °C, enterococci on kanamycin aesculin azide (KAA) agar (Mossel, Blijker, & Eeldering, 1978) (Oxoid) incubated for 24 h at 37 °C, *Enterobacteriaceae* on violet red bile glucose agar (VRBGA) (Mossel, Mengerik, & Scholts, 1962) (Oxoid) incubated for 18 to 24 h at 37 °C, and moulds and yeast on oxytetracycline glucose yeast extract (OGYE) agar (Mossel, Kleynen-Semmeling, & Vicente, 1970) (Oxoid) incubated for 5 days at 22 °C.

In standard PCA, ROGOSA agar, KAA agar, VRBGA and OGYE agar, one ml volume of each dilution was depth-inoculated, in duplicate, and mixed before solidification. Plates of ROGOSA agar and VRBGA were covered with a layer of the same medium before incubation. In M17 agar, MSE agar and MSA, 0.1 ml volumes of each dilution were surface plates in duplicate.

2.3. Physico-chemical analysis

The pH of the milk was measured directly with a pHmeter Micro pH 2002 (Crison, Barcelona, Spain) and the titratable acidity (TA) of the milk was measured following the method described by the AOAC standard 947.05 (Association of Official Analytical Chemists, 1990).

Moisture and NaCl contents in cheese were determined according to the IDF standard 4A (International Dairy Federation, 1982) and IDF standard 17A (International Dairy Federation, 1972), respectively. pH and TA of cheese were measured from samples homogenized with hot distilled water (45–50 °C), as described by the AOAC standard 14.022 (Association of Official Analytical Chemists, 1980a), and AOAC standard 16.247 (Association of Official Analytical Chemists, 1980b) respectively. Water activity (a_w) was determined instrumentally using a Aqua Lab CX-2 water activity system

(Decagon Devices, Pullman, USA). All analyses were carried out in duplicate.

2.4. Statistical analysis

Statistical correlation between log counts of the major microbial groups and physico-chemical parameters investigated were carried out by the Pearson's correlation coefficient, with the aid of the Statistic computer program version 5.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

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

The changes in the physico-chemical parameters obtained throughout the manufacture and ripening of Genestoso cheese are shown in Figs. 1–4.

The pH underwent a rapid fall during ripening of the cheeses, reaching values of about 4.00 in the 2 day old cheese (see Fig. 1). A similar decrease in pH was observed by De Giori, Font de Valdez, Pesce de Ruiz Holgado, and Oliver (1983) for Tafí cheese or by Tornadijo, Fresno, Bernardo, Martín Sarmiento, and Carballo (1995) for Armada cheese.

The acid sensitive flora does not survive at low pH (4.5–5.3). However, the real inhibitor is the undissociated form of the organic acids such as lactic acid, acetic acid and propionic acid (Beuchat & Golden, 1989). In general, lactic acid is the major inhibitor to the acid-sensitive microorganisms, because their proportion is higher than the other acids during coagulation and ripening of the cheeses.

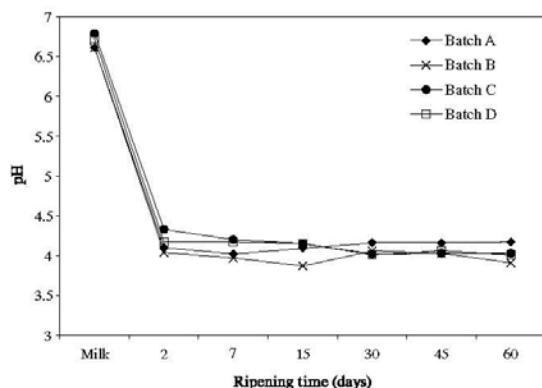


Fig. 1. Changes in pH values during manufacture and ripening of four batches of Genestoso cheese, two batches (A and B) ripened in autumn winter and the other two (C and D) ripened in spring summer.

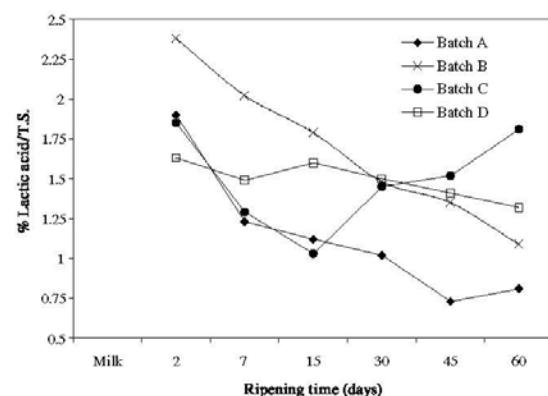


Fig. 2. Changes in TA (g lactic acid/100 g total solids) during manufacture and ripening of four batches of Genestoso cheese, two batches (A and B) ripened in autumn winter and the other two (C and D) ripened in spring summer.

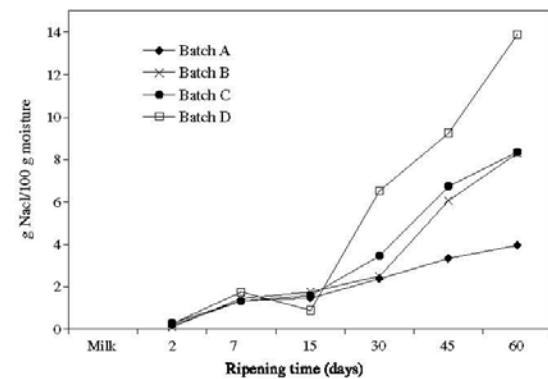


Fig. 3. Changes in salt/moisture (g NaCl/100 g H₂O) during manufacture and ripening of four batches of Genestoso cheese, two batches (A and B) ripened in autumn-winter and the other two (C and D) ripened in spring summer.

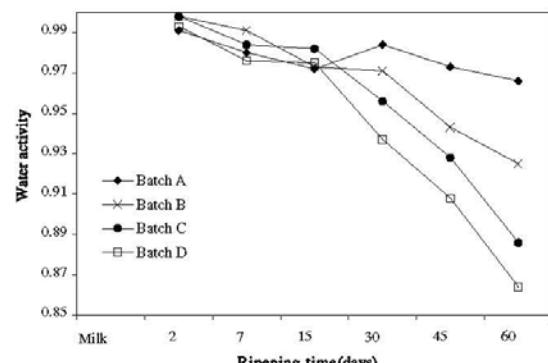


Fig. 4. Changes in a_w values during manufacture and ripening of four batches of Genestoso cheese, two batches (A and B) ripened in autumn winter and the other two (C and D) ripened in spring summer.

In Genestoso cheese the average values of TA, expressed as percentage of lactic acid equivalent over total solids (% lactic acid/TS), after 2 days of ripening, were around 1.75 and 2%, in the spring and autumn batches, respectively (Fig. 2). The differences in TA in the autumn cheeses in relation to the spring ones were accentuated after 15 days of ripening. The increase of the TA observed in batch C after 15 days of ripening (see Fig. 2) could be related to the increase of the counts on Rogosa (1–2 log units higher than the rest of the batches) (see Tables 1 and 2). Lactococci are very active metabolically, starting to fermenting the lactose and to proliferate in the beginning of manufacture of the cheeses. Residual sugar could be used by *Lactobacillus*. In general, this genus is more acid tolerant and produce a quantity of lactic acid superior than other lactic acid bacteria. The maximum acidity produced by lactococci corresponds with a pH between 4.3 and 4.5, about 0.5% (w/v) lactic acid. However, for the lactobacilli some

species can acidify until pH 3.0 to 3.5, almost 1.5% lactic acid (w/v) (Schmidt, Tourneur, & Lenoir, 1994).

The values obtained in the ratio salt/moisture in Genestoso cheese (Fig. 3) varied considerably between some batches, which is not surprising bearing in mind that the salting of these cheese was carried out totally at random. The maximum values of % NaCl/moisture obtained in the autumn–winter batches and in the spring–summer ones were 8.30% and 13.90%, respectively. The concentration of salt dissolved in the cheese moisture (% NaCl/moisture) rather than the concentration of salt, added by dry or brine salting of the cheese, determines the inhibitory effect of salt (Beresford, Fitzsimons, Brennan, & Cogan, 2001).

The combination of the added salt and the dehydration undergone by the cheese during the ripening is going to cause the decrease in a_w of the cheeses. This parameter is directly proportional to the moisture content of the cheese and inversely to the concentration of

Table 1
Changes in the microbial counts^a throughout manufacture and ripening of Genestoso cheese in the two batches (A and C)^b ripened in autumn winter and spring summer, respectively

	Milk	Cheese (days of ripening)					
		2	7	15	30	45	60
<i>PCAm^c</i>							
Autumn	6.91	9.84	8.40	8.18	8.09	8.23	8.10
Spring	6.95	9.78	9.44	8.97	8.99	8.70	8.56
<i>PCAp^c</i>							
Autumn	6.45	9.79	7.80	7.85	7.75	7.49	7.57
Spring	6.77	9.58	9.10	7.68	8.12	7.69	6.69
<i>M17</i>							
Autumn	4.49	7.81	6.30	6.12	3.87	5.32	4.85
Spring	4.49	7.56	6.89	6.61	5.12	4.22	4.19
<i>MSE</i>							
Autumn	3.39	7.65	5.85	5.68	5.63	5.11	5.28
Spring	3.17	6.78	6.01	5.58	5.89	6.00	5.49
<i>Rogosa</i>							
Autumn	4.44	6.03	6.68	6.76	6.94	7.54	7.07
Spring	5.48	6.90	7.40	7.98	9.27	8.93	8.67
<i>KAA</i>							
Autumn	4.98	6.48	7.69	7.53	7.48	7.70	6.63
Spring	5.10	7.67	7.82	7.49	6.59	5.83	5.40
<i>VRBG_A</i>							
Autumn	3.84	7.07	6.16	5.06	4.79	3.10	2.30
Spring	4.39	7.91	6.64	5.96			
<i>MSA</i>							
Autumn	1.40	1.67	0.97				
Spring							
<i>OGYE_A</i>							
Autumn	3.83	4.84	5.39	5.87	6.01	5.22	6.11
Spring	4.01	5.00	5.35	5.68	6.00	4.91	5.47

^aThe microbial counts are expressed as log CFU/g.

^bThe batches A and C were manufactured by the same cheesemaker.

^cAerobic mesophilic bacteria counts (*PCAm*). Aerobic psychrotrophic bacteria counts (*PCAp*).

Table 2

Changes in the microbial counts^a throughout manufacture and ripening of Genestoso cheese in the two batches (B and D)^b ripened in autumn, winter and spring, summer, respectively

	Milk	Cheese (days of ripening)					
		2	7	15	30	45	60
<i>PCAm^c</i>							
Autumn	7.04	10.12	8.15	8.20	8.08	8.16	8.04
Spring	6.04	10.22	8.44	8.14	8.51	8.02	8.14
<i>PCAp^c</i>							
Autumn	6.93	8.52	8.02	8.06	7.98	7.47	7.35
Spring	4.92	8.12	6.90	7.90	8.01	6.37	6.73
<i>M17</i>							
Autumn	5.06	8.02	5.24	5.47	5.78	3.17	2.29
Spring	3.70	7.57	5.74	4.93	3.15	5.39	5.10
<i>MSE</i>							
Autumn	4.35	7.63	5.40	5.25	5.36	5.35	5.07
Spring	1.84	7.09	5.49	5.31	6.13	5.94	5.97
<i>Rogosa</i>							
Autumn	4.85	7.43	7.35	7.55	7.57	7.47	7.53
Spring	2.84	6.60	7.06	7.22	8.34	8.19	8.01
<i>KAA</i>							
Autumn	2.35	4.80	2.98	3.57	2.94	2.87	2.40
Spring	1.02	4.32	3.76	2.99			
<i>VRBGA</i>							
Autumn	3.21	4.01					
Spring	1.63	3.98	2.59	2.31			
<i>MSA</i>							
Autumn	2.08	1.52	1.47				
Spring	1.46	2.29					
<i>OGYEAs</i>							
Autumn	3.97	6.09	6.63	6.95	6.84	6.94	6.86
Spring	3.85	5.22	6.36	6.68	8.04	7.36	7.30

^aThe microbial counts are expressed as log CFU/g.

^bThe batches B and D were manufactured by the same cheesemaker.

^cAerobic mesophilic bacteria counts (*PCAm*). Aerobic psychrotrophic bacteria counts (*PCAp*).

NaCl and other low molecular weight compounds (Esteban & Marcos, 1989).

The a_w values, differed considerably in the batches studied. In the batches manufactured in the autumn fluctuated between 0.966 and 0.925 at the end of ripening, while in the spring–summer ones were in the range of 0.886–0.864 (Fig. 4). This effect could be due not only to the influence of the time of year, through the water loss by evaporation, but also to the differences in the ratio salt/moisture. In fact, the coefficients of correlation between a_w values and the ratio salt/moisture were significant ($P < 0.01$) in the batches ripened in autumn ($r = -0.96$) and in spring ($r = -0.98$).

3.2. Changes in the microbial group counts during ripening

We could consider cheese as an ecosystem in continuous change in which some species are succeeded by others, depending on the physico-chemical conditions

which, in turn, are modified by their own microbial metabolism. High densities of microorganisms are present in cheese throughout ripening and they play a significant role in the ripening process (Cogan, 2000). Among the microorganisms interactive associations are being formed such as that resulting from the degradation of proteins and carbohydrates by some species to originate simple substrates and the production of vitamins or the growing factors which assist the growth of other species (Boddy & Wimpenny, 1992).

The evolution of the different microbial group counts throughout the manufacture and ripening of Genestoso cheese are shown in Tables 1 and 2.

The aerobic mesophilic flora counts, obtained on PCA from the raw milk used in the manufacture of Genestoso cheese, were high (log counts 6–7 CFU/g). These counts were similar to those obtained from cow's milk destined to the manufacture of several cheeses, such as Arzúa cheese (Centeno, Rodríguez Otero, & Cepeda, 1994), León cheese (Rodríguez

Medina, Tornadijo, Carballo, & Martín Sarmiento, 1995) and San Simón cheese (García Fontán, Franco, Prieto, Tornadijo, & Carballo, 2001). The counts of aerobic mesophilic flora reached the higher values in 2 day old cheese (log counts 9–10 CFU/g). This increase of 3–4 logarithmic units could be due to the physical entrapment of bacteria in the curd and above all to the microbial multiplication during coagulation (24 h) and draining period (a further 48 h).

The evolution undergone by the aerobic mesophilic bacteria during manufacture and ripening of Genestoso cheese reflects that experienced by the majority of microbial groups and especially the lactic flora. However, lactobacilli and fungic flora showed a different development with respect to the other groups.

In general, the counts of the aerobic psychrotrophic bacteria were approximately 1–2 log units inferior to those of the total aerobic mesophilic bacteria during ripening.

Lactic acid bacteria were the predominant flora during manufacture and ripening of Genestoso cheese. The counts were taken on different culture media: M17 agar and MSE agar, which are non-selective media but favouring the growth of lactococci and leuconostocs, respectively, and Rogosa agar which is a selective medium for isolating lactobacilli. The counts of the lactic acid bacteria developed in different ways in each of the media used.

Lactococci multiplied in the initial stages of the ripening process, degrading lactose and producing lactic acid. In fact, the production of lactic acid by lactococci is going to condition the growth of the different microbial groups and the ripening process. Marshall and Tamime (1997) reported the advantage of a quick fermentation and a sufficient production of lactic acid, bacteriocins and other antagonists in order to prevent the growth of spoilage and pathogenic bacteria.

The highest counts on M17 agar and MSE agar were obtained in the 2 day old cheeses (see Tables 1 and 2). These values were inferior to those obtained for the Arzúa cheese (Centeno et al., 1994), Cebreiro cheese (Centeno, Menéndez, & Rodríguez Otero, 1996), San Simón cheese (García Fontán et al., 2001) or some acid-curd goat's cheese (Tornadijo et al., 1995; Zárate, Belda, Pérez, & Cardell, 1997).

Delay in salting the cheeses (72 h from the start of the coagulation) could favour the rapid increase of the counts in M17 and the consequent decrease of pH observed at the start of the ripening of the cheeses, since lactococci have a great acidifying capacity. From the second day of ripening the counts on M17 decreased gradually till its end, while the counts on MSE decreased in 1–2 logarithmic units in the first week of ripening and afterwards remaining more or less constant until the end. Decreases in lactococci counts were also observed by other authors in different cheese varieties. Even a

total disappearance of lactococci in the early stages of the ripening of the cheeses was detected on some occasions (Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Tzanetakis & Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

Lactobacilli include secondary flora which generally play a significant role during ripening (Beresford et al., 2001). This microbial group increases the concentration of small peptides, free amino acids and free fatty acids (Albenzio et al., 2001).

The slower metabolism of lactobacilli and their capacity to adapt to adverse conditions (acidity, low values of a_w and higher concentrations of NaCl than for the rest of lactic acid bacteria), could contribute to their predominance in the last stage of ripening. The negative correlation between a_w values and Rogosa counts ($r = -0.62$) ($P < 0.01$) suggest, as well as the positive correlation of these counts with the ratio of NaCl/moisture ($r = 0.58$) ($P < 0.01$), the adaptation of lactobacilli to adverse conditions.

The highest counts on Rogosa were obtained in the 30–45 old day cheeses (see Tables 1 and 2). These counts developed more quickly in the spring batches and were about 1 logarithmic unit higher than those in the autumn ones. In the spring batches a high negative correlation between Rogosa counts and pH ($r = -0.81$) ($P < 0.01$) were obtained. The counts in the spring ones were similar to those obtained in MRS agar (acidified to pH 5.5 to favour the growth of lactobacilli) in the Arzúa cheese (Centeno et al., 1994) and differed to those obtained in San Simón cheese (García Fontán et al., 2001) in which the counts in Rogosa cheese increased during ripening.

As well as the lactic flora there is an adventitious flora which can also contribute to the ripening of cheeses (Stanley, 1998). They can include a complex mixture of wild bacteria, yeast and mould. These organisms are contaminants that arrive to the milk from the surrounding air during milking or cheesemaking, with the proteolytic enzymes added or by contact with equipment and, when the conditions within the curd become favourable, they initiate the growth.

Enterococci (counts on KAA) are included (with other bacteria such as lactobacilli, leuconostoc and *Pediococcus*) in the non-starter lactic acid bacteria. The technological significance of this microbial group is connected to its acidifying capacity and proteolytic and lipolytic activity (Menéndez, Centeno, Godínez, & Rodríguez-Otero, 1998) and could, therefore, contribute to the ripening.

The counts of enterococci differed between the batches. These differences could be due to the random arrival of enterococci in cheeses, normally by contamination during cheesemaking. On the other hand, the enterococci are halotolerant microorganisms, which can grow in concentrations relatively high in salt (Poulet, Huertas, Sánchez, Cáceres, & Larriba, 1993), but the

concurrence of other factors (season and changes in the physico-chemical parameters) could condition the evolution in each batch. Batches A and C showed counts higher in the milk which increased in 2 logarithmic units during coagulation and draining of cheeses (see Table 1). In the batch A the counts raised to about 1 logarithmic unit until the first week of ripening and maintained more or less constant values until 45 days of ripening. However, in the cheeses of batch C (spring) the enterococci counts dropped after 7 days of ripening. Batches B and D showed low counts of enterococci in the milk (see Table 2). In batch B (autumn) such counts continued to be low during the whole ripening process, while in the spring (D) were not detected from 15 day old cheeses.

Enterobacteriaceae (counts on VRBGA) were detected in the highest counts in the 2 day old cheese (Tables 1 and 2), though they showed a different development according to the time of the year and the manufacture batch. In the spring batches (C and D) they were not detected from the fifteenth and second day of ripening, respectively. In one of the autumn batches (A) they decreased gradually without disappearing in the 60 days of ripening, with final counts around 2 (log counts CFU/g), while in the other autumn batch (B) they were not detected after 2 days of ripening. In fact, both batches differed in the changes showed by the acidity, a_w and salt/moisture content (Figs. 1–4). Buffa, Guamis, Royo, and Trujillo (2001) reported that the quick disappearance of *Enterobacteriaceae* could be due to the development of unfavourable growth conditions during cheese ripening.

Food environment rarely presents a single factor, and microbial flora may be simultaneously affected by several inherent factors (low pH, high NaCl concentration or low a_w). These combined stress factors can exert a synergistic effect on the growth and survival of the population of *Enterobacteriaceae*. The significant correlation ($P < 0.05$) obtained between *Enterobacteriaceae* counts and pH ($r = 0.69$), a_w ($r = 0.65$) and salt/moisture content ($r = -0.60$) support this hypothesis.

Such quick decreases in the counts of VRBGA have only been observed in cheeses of lactic coagulation such as Tafí cheese (De Giori et al., 1983), León cow cheese (Rodríguez Medina et al., 1995) and in some goat cheeses, such as Gredos cheese (Medina, Gaya, & Núñez, 1992), Armada cheese (Tornadijo, Fresno, Carballo, & Martín Sarmiento, 1993), Cendrat del Montsec cheese (Mor-Mur, Carretero, Pla, & Guamis, 1994) and in a tested raw goat milk cheese (Buffa et al., 2001).

Bearing in mind the results obtained and that the optimum time for the consumption of these cheeses is about the 30th day of ripening, at present the hygienic-sanitary quality of these cheeses cannot be guaranteed.

Micrococcaceae can participate in the ripening of the cheeses since they can develop proteolytic, lipolytic and esterolytic activities (Bowmik & Marth, 1990). Besides, though the micrococci decrease quickly with ripening their extracellular lipase remain active (Ortiz de Apodaca, Selgas, & Ordóñez, 1993).

The counts obtained on MSA (medium for counting and isolating *Micrococcaceae*) were very low, disappearing in the early stages of cheese ripening. In one of the spring batches it was impossible to count in the milk (see Table 1). It is not usual to find counts so low in MSA nor that they can disappear so quickly during ripening, not even in cheeses of acid coagulation or predominantly acid one. The low counts of *Micrococcaceae* obtained in milk and the quick decrease of pH, combined with other factors, could influence the inhibition of the growth of this microbial group and its rapid disappearance. Gaya, Medina, Bautista, and Núñez (1988) and Steccini, Sarais, and Bertoldi (1991) point out the negative influence of the acid lactic flora, from raw milk or from the added starter, on the population of micrococci and staphylococci.

The counts on OGYEA increased until 30 days of cheese ripening, the time in which in general maximum counts were reached. These counts develop similarly in the spring batches and in the autumn ones, though in one of the spring batches (batch D) the counts on OGYEA obtained after 30 days of ripening were of the order of 2 logarithmic units higher than in the remaining batches (see Table 2). Microscopic examination showed the predominance of *Geotrichum candidum* strains in batches A and C, while in the batches B and D yeast was predominant. However, *G. candidum* was increased in the final stages of ripening of the batch D.

The evolution of pH, a_w and ratio salt/moisture possibly encouraged the growth of the fungic flora in respect to the other microbial groups. In the fact, the correlation obtained between the counts in OGYEA and the evolution of pH ($r = -0.51$), NaCl/moisture content ($r = 0.50$) and a_w ($r = -0.42$) was significant ($P < 0.05$).

With this work it has been pointed out that in Genestoso cheese, lactococci and leuconostocs underwent a rapid increase during the first days of ripening which accompanied by a large decrease of pH. The counts of lactobacilli and fungal flora increased with the ripening of the cheeses.

If it is kept in mind that these cheeses are eaten after fewer than 30 days of ripening, pasteurization of the milk intended for their manufacture can be seen to be essential in order to guarantee the health and safety quality of such cheeses. The specific changes in physical and chemical parameters (pH, a_w , salt-to-moisture ratio) might tend to produce the rapid disappearance of pathogens from Genestoso cheese, but cannot guarantee it. In fact, *Enterobacteriaceae* were not detected after thirty days' ripening in most of the cheeses, but were

encountered in the cheeses from one batch right up to the end of ripening. *Enterobacteriaceae* as such may not be considered significant pathogens but their presence might indicate a potential for contamination by more dangerous organisms.

The pasteurization of the milk means the reduction of the indigenous milk microflora, and can have repercussions in the biochemical changes which occur in cheese during ripening (Albenzio et al., 2001). Therefore, the next aim of this project will be the identification and technological characterization of the strains isolated from Genestoso cheese in order to obtain a specific starter created for cheesemaking from pasteurized milk, so that it keep the typicity of artisanal cheeses.

Acknowledgements

The authors wish to thank the cheesemakers of Genestoso for their contribution to this work and the Agencia de Desarrollo Local Agrícola y Ganadero del Ayuntamiento de Cangas del Narcea for their promise to help in the characterization and manufacture of Genestoso cheese.

References

- Albenzio, M., Corbo, M. R., Rehman, S. U., Fox, P. F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., & Gobbetti, M. (2001). Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 35–48.
- American Public Health Association (APHA) (1978). *Standard methods for the examination of dairy products* (14th ed.). Washington: APHA Inc.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1980a). Hydrogen Ion activity (pH). Potentiometric method. 14022 Method. In W. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis* (13th ed.) (p. 213). Washington: AOAC.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1980b). Acidity. 16247 Method. In W. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis* (13th ed.) (p. 266). Washington: AOAC.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Acidity of milk. 947.05 Method. In K. Helrich (Ed.), *Official methods of analysis* (p. 805). Arlington: AOAC.
- Berresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Beuchat, L. R., & Golden, D. A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43, 134–142.
- Boddy, L., & Wimpenny, J. W. T. (1992). Ecological concepts in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, 73 (Supplement), 23S–38S.
- Bowmik, T., & Marth, E. H. (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* in cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science*, 73, 859–866.
- Buffa, M., Guamis, B., Royo, C., & Trujillo, A. J. (2001). Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. *Food Microbiology*, 18, 45–51.
- Centeno, J. A., Rodríguez Otero, J. L., & Cepeda, A. (1994). Microbiological study of Arzúa cheese (NW Spain) through cheesemaking and ripening. *Journal of Food Safety*, 14, 229–241.
- Centeno, J. A., Menéndez, S., & Rodríguez Otero, J. L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 33, 307–313.
- Chapman, G. H. (1945). The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*, 50, 201–203.
- Cogan, T. M. (2000). Cheese microbiology. In P. F. Fox, T. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- De Giuri, G., Font de Valdez, G., Pesce de Ruiz Holgado, A., & Oliver, C. (1983). Microflora of Tafí cheese: changes during manufacture and maturation. *Journal of Food Protection*, 46, 518–521.
- Esteban, M. A., & Marcos, A. (1989). Chemical prediction of water activity in processed cheese. *Journal of Dairy Research*, 56, 665–668.
- García Fontán, M. C., Franco, I., Prieto, B., Tornadijo, M. E., & Carballo, J. (2001). Microbiological changes in San Simón cheese throughout ripening and its relationship with physicochemical parameters. *Food Microbiology*, 18, 25–33.
- Gaya, P., Medina, M., Bautista, L., & Núñez, M. (1988). Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 249–257.
- International Dairy Federation (IDF) (1972). *Determination of the salt content of cheese*. (IDF Standard 17A). Brussels: IDF.
- International Dairy Federation (IDF) (1982). *Cheese and processed cheese. Determination of total solids content*. (IDF Standard 4A). Brussels: IDF.
- International Dairy Federation (IDF) (1992). *Milk and milk products. Preparation of test samples and dilutions for microbiological examination*. (IDF Standard 122B). Brussels: IDF.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. (1990). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *Journal of Food Science*, 55, 111–113.
- Marshall, V. M. E., & Tamime, A. Y. (1997). Physiology and biochemistry of fermented milks. In B. A. Law (Ed.), *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* (pp. 153–192). London: Blackie Academic and Professional.
- Mayeux, J. V., Sandine, W. E., & Elliker, P. R. (1962). A selective medium for detecting leuconostoc organism in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 45, 655–656.
- Medina, M., Gaya, P., & Núñez, M. (1992). Gredos goat's 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). Some technological properties and enzymatic activities of strains of *Enterococcus faecalis* isolated from Cebreiro cheese. *Alimentaria*, 26, 59–64.
- 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.
- Mossel, D. A. A., Bijkker, P. G. H., & Eeldering, J. (1978). Stretokokken der Lancefield gruppe D in Lebensmittel und trinkwasser. Die bedentung, erfassung und bekämpfung. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 29, 121–127.
- Mossel, D. A. A., Kleynen-Semmelming, A. M. C., & Vicente, H. M. (1970). Oxytetracycline-glucosa-yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *Journal of Applied Bacteriology*, 33, 454–457.
- Mossel, D. A. A., Mengerik, W. H. J., & Scholts, H. H. (1962). Use of a modified Mc Conkey agar medium for the selective growth and enumeration of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology*, 84, 381.
- Ortíz de Apodaca, M. J., Selgas, M. D., & Ordóñez, J. A. (1993). Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food Research International*, 26, 319–325.

- Poulet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., & Larriba, G. (1993). Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *Journal of Dairy Research*, 60, 123–127.
- 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.
- Rogosa, M., Mitchell, J. A., & Wiseman, R. F. (1951). A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 62, 132–133.
- Schmidt, J. L., Tourneur, C., & Lenoir, J. (1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. In H. de Roissart, & F. M. Luquet (Eds.), *Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques: Vol. 2* (pp. 37–54). Uriage: Lorica.
- Stanley, G. (1998). Cheeses. In B. J. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods. Vol. 1* (2nd ed.) (pp. 263–307). London: Blackie Academic and Professional.
- Stecchini, M. L., Sarais, I., & Bertoldi, M. (1991). The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *International Journal of food Microbiology*, 14, 99–110.
- Terzagui, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807–813.
- Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Carballo, J., & Martín Sarmiento, R. (1993). Study of *Enterobacteriaceae* throughout the manufacturing and ripening of hard goats' cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 240–246.
- Tornadijo, 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.
- Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (1992). Changes in numbers and kind of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two Greek cheeses from ewes' milk. *Journal of Dairy Science*, 75, 1389–1393.
- 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.

Artículo II



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.

Available online at www.sciencedirect.com

Food Control 18 (2007) 716–722

FOOD
CONTROLwww.elsevier.com/locate/foodcont

Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity

L. González ^a, H. Sandoval ^b, N. Sacristán ^a, J.M. Castro ^b, J.M. Fresno ^a, M.E. Tornadijo ^{a,*}^a Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, 24071 León, Spain^b Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, 24007 León, Spain

Received 10 January 2006; received in revised form 8 March 2006; accepted 20 March 2006

Abstract

The aim of this work was to study the antimicrobial activity of 395 strains of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout manufacture and ripening. These were: *Lactobacillus* (137 strains), *Lactococcus* (125 strains), *Leuconostoc* (58 strains) and *Enterococcus* (75 strains). After the extract had been neutralized and treated with catalase to exclude the action of hydrogen peroxide, 13 lactococci, three lactobacilli, three leuconostocs and five enterococci continued to show antimicrobial activity against one or more of the reference varieties used as indicator strains (*Enterococcus faecalis* CECT 481, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 and *Listeria monocytogenes* CECT 4031). The 24 strains of lactic acid bacteria showing antimicrobial activity after excluding the action of hydrogen peroxide were identified at species level by genetic methods. The majority of these strains were isolated from the batch ripened in autumn (37.5% of strains) and the batch ripened in spring (29.2% of 15 strains) manufactured by the same cheesemaker and mainly during manufacture and the first days of ripening.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Genestoso cheese; Lactic acid bacteria; Antimicrobial activity; Autochthonous starter

1. Introduction

Genestoso cheese is an acid-curd cheese ripened over a short period. It takes its name from the town where it is made, in the district of Cangas del Narcea, in the Principality of Asturias, in north-western Spain. This variety was first produced with goat's milk, then with a mixture of goat's milk, cow's milk and sheep's milk and currently is made from raw cow's milk from the "Asturiana de los Valles" breed of cattle. It is produced on a purely craft basis and output is very limited.

One of the main problems arising in distributing this cheese is the difficulty of ensuring an adequate level of hygiene. This is because the cheese is made from raw milk and reaches its optimal sensory characteristics in fewer than

60 days of ripening. A further problem is the lack of consistency between batches. Mass production of Genestoso cheese would require pasteurization of the milk and the adding to it of a starter culture. Hence, the use of autochthonous starters, made up of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese with proven technological capabilities might guarantee the hygienic standard of this variety while simultaneously preserving the characteristics that define the identity of Genestoso cheese.

If the strains of lactic acid bacteria (LAB) not only had the required technological characteristics but also the ability to produce bacteriocins active against micro-organisms that are pathogenic or lead to spoiling, then the resulting cultures of these lactic acid bacteria would have major applications for mass production (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001; Daeschel, 1989; Schillinger, Geissen, & Holzapfel, 1996; Silva, Carvalho, Teixeira, & Gibbs, 2002).

* Corresponding author. Tel.: +34 987 291850; fax: +34 987 291284.
E-mail address: dhtmet@unileon.es (M.E. Tornadijo).

The object of the work being reported here was to identify at the level of genus the lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese on the three media Rogosa agar, M17 agar and MSE agar, to find strains producing bacteriocins and to identify these strains at the species level by biochemical and genetic tests.

2. Material and methods

2.1. Cheese manufacture and sampling

Four batches of Genestoso cheese, two ripened in the autumn and winter, and the other two in the spring and summer, were manufactured by two cheese-makers in accordance with traditional methods. Each of these produced two batches, one batch of six cheeses in the autumn and winter, and another, also of six cheeses, in the spring and summer, so between them 24 cheeses were made in total.

The cheeses were produced from raw, full-cream milk from cows of the "Asturiana de los Valles" breed by means of the traditional methods reported by Arenas, González, Bernardo, Fresno, and Tornadijo (2004). Coagulation is induced by adding 5–10 ml of commercially available calf rennet (1:10,000 strength) to each 100 l of milk. The milk is allowed to curdle at room temperature (20–25 °C) for 24 h. After this, the curd is transferred to pierced plastic moulds where the whey is drained from it. After 24 h, two radial cuts are made in the curd, which is left for a further 24 h, allowing more whey to drain off. Thereafter, the curd is kneaded by hand for 5 min so as to homogenize the whole mass. Salting is carried out by adding dry salt (0.5% w/w). The salted curd is transferred onto straw mats made from esparto grass, where it is left for 2–3 days, being turned over daily until the crust has hardened. At this point the mats are removed. The ripening process takes place in small barns under the natural climatic conditions characteristic of this area. In the autumn and winter period, the minimum and maximum temperatures varied between 5 °C and 11 °C and the relative humidity was between 50% and 80%. In the spring and summer period, temperatures ranged from 12 °C to 22 °C and RH was between 52% and 60%.

For each of the batches, samples were taken of the milk together with cheese at 2, 7, 15, 30, 45 and 60 days from the start of ripening. The samples of cheese were one whole cheese each. These cheese and milk samples were taken to the laboratory under refrigeration, being kept below 5 °C, and were analysed on arrival.

2.2. Counting and isolation of strains

Fifty grams of each sample were homogenized with 200 ml of a sterile solution of 2% (w/v) sodium citrate (Panreac, Barcelona, Spain) at a temperature of 40–45 °C for 1 min in a Masticator (JUL instruments, Barcelona, Spain), thus making a 1/5 dilution. Decimal dilutions were pre-

pared by mixing 10 ml with 90 ml of 0.1% (w/v) sterile peptone water (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK), according to the International Dairy Federation (IDF) standard 122B (1992).

Lactic acid bacteria were determined on three media: M17 agar (Biokar, Beauvais, France), a non-selective medium for counting and isolating lactococci (Terzagui & Sandine, 1975) after incubation at 30 °C for 18–24 h; MSE agar (Biokar), a non-selective medium for counting and isolating leuconostocs (Mayeux, Sandine, & Elliker, 1962) after incubation at 22 °C for 4 days; and ROGOSA agar (Oxoid), selective medium for counting and isolating lactobacilli (Rogosa, Mitchell, & Wiseman, 1951) after incubation at 30 °C for 5 days.

On the MSE agar and M17 agar, 0.1 ml volumes of each dilution were surface plated in duplicate. For the Rogosa agar, 1 ml volumes of each dilution were inoculated into molten cooled agar in duplicate, mixed and poured into Petri dishes before solidification and covered with a layer of the same medium before incubation.

From M17 agar, MSE agar and Rogosa agar, five colonies were randomly taken from each batch of the four and at each sampling stage (milk, together with cheese after 2, 7, 15, 30, 45 and 60 days). Hence, a total of 140 colonies were gathered from each medium.

Tests were carried out on each isolate. These were the following: Gram and morphology, catalase, gas production from glucose, hydrolysis of arginine, growth in 4 and 6.5% NaCl broth, dextran production, growth at pH 9.6 and in 40% bile (cocci) and growth at 10 and 45 °C.

Gram-positive, homofermentative, catalase-negative cocci which were capable of growing at 10 and 40 °C, but not at 45 °C or at a level of 6.5% of salt or at a pH of 9.6, were deemed to be lactococci. Gram-positive, homofermentative, catalase-negative cocci, grouped in pairs or short chains, which grew at 10 °C, 37 °C, 40 °C and usually at 45 °C, generally survived heating at 60 °C for 30 min, grew with a 6.5% salt concentration, at a pH of 9.6 and in 40% bile, forming red or pink colonies normally with a yellowish halo on KF Streptococcus agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), were considered to be enterococci. Gram-positive, heterofermentative, catalase negative cocci which did not hydrolyse arginine and did not grow at 45 °C were taken to be leuconostoc. Gram-positive, catalase-negative rods, whether homofermentative or heterofermentative, which were capable of growing at 15 °C and/or 45 °C were considered to be lactobacilli.

An API 50 CHL system was used to test for the utilization of carbohydrates. A description at species level of strains showing antimicrobial activity against the reference strains was carried out using the data base of the API 50 CHL and by genotypic methods.

2.3. Detection of antimicrobial activity

Agar spot tests and agar well diffusion assays were used to study the antibacterial activity of the LAB strains isolated

on M17, MSE and Rogosa agar from Genestoso cheese. For this purpose, five reference strains were used to check sensitivity to the antimicrobial substances produced by the LAB, these being *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011, *Enterococcus faecalis* CECT 481, and *Staphylococcus aureus* CECT 240, as described by Schillinger and Lücke (1989), Casla, Requena, and Gómez (1996) Çon, Gökalp, and Kaya (2001).

LAB strains isolated from Genestoso cheese and the reference varieties used as indicator strains, that is *Lactobacillus plantarum* CECT 748 and *Enterococcus faecalis* CECT 481 were grown in MRS broth (Oxoid, Basingstoke, UK) at 30 °C for 24 h, *Listeria 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, *Staphylococcus aureus* CECT 240 was grown in TSB and *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 in Bryant-Burkey Broth (BBB, Merck, Darmstadt, Germany), both at 37 °C for 24 h.

For the agar spot test, volumes of 5 µl of overnight cultures of LAB strains isolated from Genestoso cheese were spotted onto the surface of MRS agar (Oxoid) plates and incubated at 30 °C for 24 h to allow the development of colonies. Volumes of 1 ml of the indicator strains, with a total approximately 5×10^5 cfu ml⁻¹ were inoculated into 7 ml of semi-solid MRS agar, TSA or BBA (broth plus 0.7% bacteriological agar), depending on the micro-organism under study, kept at a temperature of 45 °C, then after agitation were poured over the plates of MRS agar on which the strain under test had grown. The plates were incubated at 30 °C for 24 h and checked for inhibition zones. Inhibition was considered positive when the inhibition halo of the indicator strain above the LAB colonies was more than 2 mm.

Antibacterial activity may often be due to the production of organic acids, with a consequent reduction in pH, or to the production of hydrogen peroxide. It may also be due to the production of bacteriocins or bacteriocin-like compounds. Hence, antimicrobial activity was checked by a well diffusion assay after excluding inhibition due to organic acids and hydrogen peroxide.

One millilitre of the indicator strain (with approximately 5×10^5 cfu ml⁻¹), cultured in MRS broth (*Lb. plantarum* and *E. faecalis*), TSB broth (*L. monocytogenes* and *S. aureus*) and BBB broth (*Cl. tyrobutyricum*) for 24 h at 30 °C, was inoculated into 15 ml of molten cooled MRS agar, TSA and BBA (broth plus 0.7% bacteriological agar), respectively and kept at 45 °C. 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 for antibacterial activity, obtained as indicated below, was added to each well. The plates were kept at 3–4 °C for 4 h to ensure diffusion of the fluid into the agar and examined for inhibition after incubation at either 30 °C or 37 °C for 24 h. If inhibition was found present when this was done, it was

deemed to be due to the production of bacteriocins or bacteriocin-like compounds.

LAB strains for testing were cultured overnight in MRS broth. Cells were then removed by centrifuging at 14,000 g for 5 min. The supernatant fluid was filtered through a 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. The possible inhibitory action of hydrogen peroxide was eliminated by adding a sterile solution of catalase (1 mg ml⁻¹) and leaving at 25 °C for 30 min. This extract was placed into the wells.

2.4. Genetic characterization of the strains showing antimicrobial activity

Different genotyping techniques may be applied to LAB as tools either to identify species or to differentiate strains. Polymerase chain reaction (PCR) amplification and DNA sequence analysis were performed with a view to confirming identifications obtained by means of classic methods. PCR was carried out in a volume of 50 µl, containing 14 ng µl⁻¹ of bacterial genomic DNA, 200 µM of deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1.5 mM of MgCl₂, 1 µM of primer obtained from Pharmacia Biotech, and 1 unit of Taq polymerase (Promega). All amplification reactions were performed in a Hybaid PCR Sprint temperature cycling system using the following amplification conditions: 35 cycles of 94 °C for 2 min, 65 °C for 30 s and 72 °C for 4 min. The first cycle was preceded by incubation for 5 min at 95 °C. Ten microlitre of the PCR products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and were subsequently visualized by UV illumination after staining with ethidium bromide. The oligonucleotide primers used in this study were as specified below. Forward primer 515 FPL: 5'GCG GAT CCT CTA GAC TGC AGT GCC AGC AGC CGC GGT AA 3', Reverse primer 13B: 5' CGG GAT CCC AGG CCCGGG AAC GTA TTC AC 3', yielding a product of 904 base pairs (bp). Forward primer 91E: 5' GGA ATT CAA AKG AAT TGA CGG GGG C 3' and Reverse primer 13B giving a product of 475 bp. These were obtained from Pharmacia and are described by Relman (1993). The PCR fragments of the 16S were purified with Montage PCR centrifugal filter devices from Millipore and then sequenced directly for the PCR fragments. The ABI PRISM 7000 quantitative DNA sequencer using PCR from Applied Biosystems was utilized. Sequences were analysed with the sequencing software Chromas (version 2.23) from Technelysium that opens chromatogram files produced by the Applied Biosystems equipment and exports sequences in plain text, formatted with base numbering, FASTA format or EMBL format. The sequences obtained were sent to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to be analysed for the nucleotide–nucleotide BLAST database in FASTA format (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) and 16S ribosomal database (<http://rdd.cme.msu.edu/>).

3. Results and discussion

3.1. Identification of strains isolated during the ripening of Genestoso cheese

A total of 140 strains were isolated in each culture medium (M17 agar, MSE agar and Rogosa agar), although in the end three additional strains were included, these coming from the purification of mixed cultures (1 in M17 agar and 2 in Rogosa agar). From the 423 isolates, 409 were identified as lactic acid bacteria (Table 1).

Of the strains isolated on M17 agar, 55.32% were assigned to the genus *Lactococcus*, as were 35% of those isolated on MSE agar. A total of 83.10% of those isolated on Rogosa agar, 5.67% from M17 and 14.28% from MSE agar were ascribed to the genus *Lactobacillus*. The genus *Leuconostoc* was assigned 26.43% of the strains isolated on MSE agar, 7.80% of those from M17 agar and 8.45% of those isolated on Rogosa agar. Finally, 22.86% of the strains isolated on MSE agar, 27.66% from M17 and 3.52% from Rogosa agar were deemed to belong to the genus *Enterococcus* (see Table 1).

On the basis of the counts obtained, M17 agar can be seen to have behaved as a medium that was not very selective for isolating *Lactococcus*, since it permitted the growth

of other micro-organisms, which taken together added up to 44.68% of the total of strains isolated on this medium. MSE agar also proved not to be selective for isolating *Leuconostoc*, as 73.57% of the strains obtained from this medium did not belong to that genus. In contrast, Rogosa agar was shown to be highly selective for isolating *Lactobacillus*.

3.2. Antimicrobial activity

The agar well diffusion assay was used to study antimicrobial activity of the 395 strains of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese (from the 409 lactic acid bacteria strains, 14 did not grow in successive attempts at culturing). In all, these comprised 137 lactobacilli, 125 lactococci, 58 leuconostocs and 75 enterococci.

The antimicrobial activity of these lactic acid bacteria may be due to a number of factors. Among these are decreased pH levels, competition for substrata and the production of substances with a bactericidal or bacteriostatic action, including bacteriocins (Parente & Ricciardi, 1999). In fact, the drop in pH arising from the production of lactic acid can be enough to inhibit certain strains. This is because the non-dissociated form of lactic acid triggers a lowering of the internal pH of the cell that causes a collapse in the

Table 1
Strains isolated on M17 agar, MSE agar and Rogosa agar throughout manufacture and ripening of Genestoso cheese in the two batches (A and B)^a ripened in autumn–winter and the other two (C and D)^b ripened in spring–summer

Microbial group	Batch	Ripening time (days)							
		Milk	Curd	7	15	30	45	60	
Lactococci	A	4	6.7%	9	15%	5	8.4%	4	6.7%
	B	7	11.7%	7	11.7%	1	1.7%	4	6.7%
	C	8	13.3%	8	13.3%	5	8.4%	10	16.7%
	D	6	10%	6	10%	7	11.7%	4	6.7%
Homofermentative lactobacilli	A	1	1.7%	2	3.4%	3	5%	3	5%
	B	5	8.4%	5	8.4%	2	3.4%	5	8.4%
	C	5	8.4%	4	6.7%	6	10%	5	8.4%
	D	5	8.4%	2	3.4%	5	8.4%	4	6.7%
Heterofermentative lactobacilli	A	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	1	1.7%
	C	—	—	—	—	—	—	—	—
	D	4	6.7%	—	—	3	5%	4	6.7%
Leuconostocs	A	5	8.4%	3	5%	1	1.7%	5	8.4%
	B	1	1.7%	—	—	6	10%	4	6.7%
	C	—	—	—	—	—	—	3	5%
	D	—	—	1	1.7%	—	—	1	1.7%
Enterococci	A	6	10%	—	—	4	6.7%	4	6.7%
	B	—	—	3	5%	4	6.7%	—	—
	C	2	3.4%	3	5%	4	6.7%	—	—
	D	—	—	7	11.7%	—	—	1	1.7%
Yeasts	A	1	1.7%	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	2	3.4%	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	—
	D	—	—	—	—	1	1.7%	—	—
Total of isolated strains		60	60	60	60	60	60	60	60

^a The batches A and C were manufactured by the cheesemaker 1.

^b The batches B and D were manufactured by the cheesemaker 2.

electrochemical proton gradient in sensitive bacteria, hence having a bacteriostatic or bactericidal effect (O'Keeffe & Hill, 1999).

Almost all the lactobacilli strains inhibited the reference strains *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011, *Enterococcus faecalis* CECT 481 and *Staphylococcus aureus* CECT 240 when the method used was agar spot test. The exceptions were 31 strains that did not inhibit *Lactobacillus plantarum* CECT 748 and one that did not have an inhibitory effect on *Listeria monocytogenes* CECT 4031.

None of the strains tested was active against *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 or *Staphylococcus aureus* CECT 240 when the agar well diffusion method was used. This involved neutralizing the extract and treating it with catalase so as to exclude any action arising from organic acids and from hydrogen peroxide, respectively. Just three strains isolated on Rogosa agar continued to show antimicrobial activity and only against the reference strain *Enterococcus faecalis* CECT 481 and one strain inhibited *Lactobacillus plantarum* CECT 748. In consequence, the inhibitory effect that these strains demonstrated might be due to the presence of bacteriocins or metabolites similar to them. Although bacteriocin production among the lactobacilli isolated from Genestoso cheese was detected in just a few strains, some authors have reported that production of bacteriocins by lactobacilli is relatively common. This fact may contribute to their colonization of habitats and their competitive edge over other bacteria (Garriga, Hugas, Aymerich, & Monfort, 1993). It must also be kept in mind that the production and extraction of bacteriocins may be affected by a range of factors. Among these it is possible to cite the composition of the culture medium, including carbon, nitrogen and sources of phosphates, cations, surfactant and inhibiting agents, the optimum pH, aeration and growth temperature (Carolissen-Mckay, Arendse, & Mastings, 1997; Daba, Lacroix, Huang, & Simard, 1993; Parente & Ricciardi, 1999; Tagg, Dajani, & Wannamaker, 1976). Generally, for the maximum production of bacteriocins it is necessary to have a complex medium whose pH does not usually coincide with the optimum pH for bacteriocin action (Daba et al., 1993). In addition, further factors may have an influence, such as the adsorption of bacteriocins on the cell wall of the producing micro-organisms. This effect may well be the prime mechanism causing a decline in bacteriocin activity, followed by hydrolysis of proteins (Bhunia, Jonson, Ray, & Kalchayanand, 1991; Parente & Ricciardi, 1999).

When the agar spot test was used, all the lactococci strains but two, inhibited *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 and *Staphylococcus aureus* CECT 240. Similarly, all the strains under trial, except one, inhibited *Enterococcus faecalis* CECT 481 and all except six had this effect on *Listeria monocytogenes* CECT 4031. In contrast, only 24 strains had an inhibitory effect on *Lactobacillus*

plantarum CECT 748. With the well diffusion method, 13 strains produced inhibition of the growth of the indicator strains. Seven out of the 13 strains of *Lactococcus* inhibited *E. faecalis*, *S. aureus* and *Lb. plantarum*. One inhibited *E. faecalis* and *Lb. plantarum*, one *S. aureus* and *Lb. plantarum*, one *L. monocytogenes* and *Lb. plantarum*, one *Lb. plantarum*, one *E. faecalis* and one *Cl. tyrobutyricum* (see Table 2).

In fact, the capacity of the genus *Lactococcus* to produce substances with an inhibitory effect on the growth of microbes is well known. Among these, there are bacteriocins. Some of the bacteriocins produced by certain strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* have been in use since the 1950s as food additives. An instance of this is nisin, which has bactericidal powers against Gram-positive micro-organisms and is able to inhibit the germination of spores of *Clostridium* and *Bacillus*.

When the agar spot test was used, all the leuconostoc strains bar one, inhibited the reference strains of *L. monocytogenes*, *Cl. tyrobutyricum*, *E. faecalis* and *S. aureus*. However, only ten strains inhibited the *Lb. plantarum* reference variety. When an agar well diffusion assay was used, with the extract being neutralized and treated with catalase to exclude any action arising from organic acids or hydrogen peroxide, just three strains of leuconostoc isolated on Rogosa agar continued to demonstrate antimicrobial activity against the reference variety of *E. faecalis*. Hence, the inhibitory effect shown by these strains may be due to the presence of bacteriocins or metabolites similar to bacteriocins.

The five enterococci isolated in Rogosa agar inhibited the five reference strains when an agar spot test was used. However, none of the five strains isolated on Rogosa agar retained this activity against the reference strains when the extract was neutralized and treated with catalase. All the strains of enterococci isolated on MSE and M17 agar (70 strains) inhibited *E. faecalis* and *S. aureus*, while only five strains isolated on MSE agar, were active against *Lb. plantarum*. All the strains but five inhibited *L. monocytogenes* and all but one had this effect on *Cl. tyrobutyricum*.

Five strains continued to show inhibitory activity against the reference strains when the extract was neutralized and treated with catalase. Of these strains, two were active against *Cl. tyrobutyricum* and *L. monocytogenes*, two against *Cl. tyrobutyricum*, and one against *L. monocytogenes* (Table 2).

It is well known that the enterococci are able to produce bacteriocins, some of which have a broad spectrum of activity. There have also been reports by other authors (Giraffa, 1995) of presence of bacteriocin activity by enterococci against the species to which the reference strains used in this research belong. More recent work has concentrated on the activity against *Listeria* by enterococci. This has led to consideration of the enterococci as potential candidates with probiotic and antimicrobial properties that could be used for preventing the development of *Listeria* in food-stuffs (Ennahar, Assobhei, & Hasselmann, 1998).

Table 2
Antimicrobial activity^a of the 24 strains of lactic acid bacteria identified at species level isolated from Genestoso cheese against the five reference varieties used as indicator strains

Strain	Sampling point	Batch	<i>Enterococcus faecalis</i> CECT 481	<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 240	<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 748	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> CECT 4011	<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>							
GE 11	Curd	A	+	+	+	–	–
GE 12	Curd	A	+	+	+	–	–
GE 13	Curd	A	+	+	+	–	–
GE 18	Curd	B	+	–	+	–	–
GE 44	30 days	A	+	+	+	–	–
GE 61	60 days	A	+	+	+	–	–
GE 102	15 days	C	+	+	+	–	–
GE 103	15 days	C	+	+	+	–	–
GE 115	30 days	C	–	–	+	–	–
GE 118	30 days	D	–	+	+	–	–
GE 2363	60 days	A	–	–	+	–	+
GE 2375	Milk	C	–	–	–	+	–
GE 2379	Milk	D	+	–	–	–	–
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>							
GE 2002	Milk	A	+	–	–	–	–
GE 2003	Milk	A	+	–	–	–	–
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>							
GE 2068	60 days	B	+	–	–	–	–
<i>Lactobacillus paracasei</i>							
GE 2036	15 days	B	+	–	–	–	–
GE 2071	Milk	C	+	–	–	–	–
<i>Lactobacillus plantarum</i>							
GE 2077	Milk	D	+	–	–	–	–
<i>Enterococcus faecalis</i>							
GE 26	7 days	B	–	–	–	–	+
GE 35	15 days	A	–	–	–	+	+
GE 2320	Curd	B	–	–	–	+	–
GE 2371	Milk	C	–	–	–	+	–
GE 2381	Curd	C	–	–	–	+	+

^a The antimicrobial activity was tested by the agar well diffusion assay.

3.3. Genetic characterization of the strains that produced bacteriocins

Twenty-four strains that produced bacteriocins or metabolites similar to bacteriocins were classified by both classical and genetic methods. Identification at species level and the possible bacteriocin activity of these strains against the reference strains is shown in Table 2. Five of the strains were classified as *E. faecalis*. Hence, before any definitive consideration of these strains for use in a starter culture, they should be carefully evaluated for the presence of all known virulence factors in order to determine what potential risk might be involved in their use.

Acknowledgement

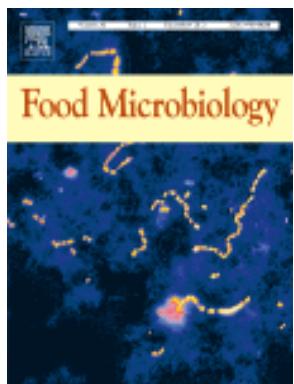
The financial support for this work was provided by the University of León (Spain) (Project ULE2003-19).

References

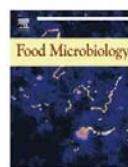
- Arenas, R., González, L., Bernardo, A., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2004). Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*, *15*, 271–279.
- Bhunia, A. K., Jonson, M. C., Ray, B., & Kalchayanand, N. (1991). Mode of action of pediocin ACh from *Pediococcus acidilactici* on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, *70*, 25–30.
- Carolissen-Mckay, V., Arendse, G., & Mastings, J. W. (1997). Review article. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*, *34*, 1–16.
- 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. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*, 35–41.
- 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.
- Çon, A. H., Gökalp, H. Y., & Kaya, M. (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* of bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, *59*, 437–441.
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., & Simard, R. E. (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocine 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *39*, 166–173.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, *43*, 164–166.
- Ennahar, S., Assobhei, O., & Hasselmann, C. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum*

- WHE 92, a pediocin AcH producer. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 97–111.
- Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., & Monfort, J. M. (1993). Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 14–148.
- Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti *Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiology*, 12, 291–299.
- IDF (1992). *Milk and milk products – Preparation of test samples and dilutions for microbiological examination*. IDF Standard 122B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Mayeux, J. V., Sandine, W. E., & Elliker, P. R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 45, 655–656.
- O'Keefe, T. & Hill, C. (1999). Bacteriocins. Potential in food preservation. Available from <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/bacteriocins.doc>.
- Parente, E., & Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purifications of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 628–638.
- Relman, D. A. (1993). Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In D. H. Pershing, T. F. Smith, F. C. Tenover, & T. J. White (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Rogosa, M., Mitchell, J. A., & Wiseman, R. F. (1951). A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 62, 132–133.
- Schillinger, U., Geissen, R., & Holzapfel, W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 158–164.
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901–1906.
- Silva, J., Carvalho, A. S., Teixeira, P., & Gibbs, P. A. (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 77–81.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 722–726.
- Terzagui, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved médium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807–813.

Artículo III



González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2010. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiology* 27, 592-597.



Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese

Leticia González, Noelia Sacristán, Ricardo Arenas, José M. Fresno, M. Eugenia Tornadijo*

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2009

Received in revised form

19 January 2010

Accepted 20 January 2010

Available online 25 January 2010

Keywords:

Technological characterization

Raw milk cheese

Acidifying capacity

Lactic acid bacteria

Proteolytic activity

Esterase

ABSTRACT

Twenty-four strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from a traditional Spanish cheese (Genestoso cheese) were evaluated for their enzymatic activities (acidifying and proteolytic abilities and carboxypeptidase, aminopeptidase, dipeptidase, caseinolytic and esterase activities), in order to select indigenous strains of technical interest for the manufacture of cheese. These strains were selected on the basis of their antimicrobial activity relative to five reference strains and were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (thirteen strains), *Leuconostoc mesenteroides* (two strains), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (one strain), *Lactobacillus paracasei* (two strains), *Lactobacillus plantarum* (one strain) and *Enterococcus faecalis* (five strains).

Lactococcus strains were those that showed the greatest degree of acidifying and proteolytic activity. The cell-free extracts (CFE) of *L. paracasei* exhibited the highest level of aminopeptidase activity. The highest level of caseinolytic activity was shown by the CFE of one strain of *L. lactis*. High values were also obtained with the CFE of *Lactobacillus* and of several *Leuconostoc*. The highest level of dipeptidase activity was found amongst the strains of *L. lactis*. Carboxypeptidase activity was generally very low or undetectable for the majority of strains. The greatest degree of esterolytic activity was detected for *Enterococcus*.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The specific characteristics of taste and aroma of craft, or traditionally made, cheese varieties may be attributed to the type of milk, its microbiological quality, the degree of acidification of the curds when moulded, the manufacturing technology or the ripening conditions. If the fact that lactic flora are crucial in liberating the specific compounds involved in the aroma and flavour of cheeses is kept in mind, there is good cause for the interest shown by cheese-makers in the type of starter cultures that must be employed. The use of indigenous lactic cultures, obtained from microorganisms isolated from craft cheeses allows the organoleptic (taste and smell) characteristics of cheese made with pasteurized milk to be brought closer to those of traditional varieties. The enzymatic potential of the strains used in the cheese-making process influences the development of the texture, aroma and flavour characteristics of cheeses. Consequently, there is an increasing interest in the design of specific

indigenous starter cultures in large-scale manufacturing of traditional-type cheeses, such that they will not change the fundamental properties of the product (Pérez et al., 2003).

Proteolysis and lipolysis are biochemical events in flavour development that occur during ripening of most varieties of cheese. There is a lack of detailed information on the peptidolytic enzymes produced by non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) (Williams et al., 1998). Moreover, only sparse information is available about the contribution of lactic acid bacteria (LAB) to lipolysis during the ripening of cheeses.

LAB strains were isolated from Genestoso cheese, a traditional cheese from the North of Spain. These strains showed antimicrobial activity in a previous study (González et al., 2007) relative to five reference strains: *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Enterococcus faecalis* CECT 481, *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 and *Staphylococcus aureus* CECT 240.

The aim of this study was to evaluate the enzymatic activities (acidifying and proteolytic capacities and aminopeptidase, dipeptidase, carboxypeptidase, esterase and caseinolytic activities) of twenty-four strains of LAB in order to select strains of technological interest that might be used as starters in the manufacture of cheeses.

* Corresponding author.

E-mail address: metorr@unileon.es (M. Eugenia Tornadijo).

2. Material and methods

2.1. Strains

The strains tested were selected from the LAB isolated over the course of the manufacturing and ripening processes of four batches of Genestoso cheese (Arenas et al., 2004). A total of 420 strains were isolated from different sampling points and different culture media, being identified at genus level by means of physiological and biochemical tests. Twenty-four strains were chosen on the basis of their antimicrobial activity relative to five reference strains. They were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (13 strains), *Leuconostoc mesenteroides* (2 strains), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1 strain), *Lactobacillus paracasei* (2 strains), *L. plantarum* (1 strain) and *E. faecalis* (5 strains) by API tests and genetic tests based on polymerase chain reaction amplification and DNA sequence analysis (González et al., 2007). The strains were frozen at -30°C in MRS broth with 20% glycerol. They were cultured in the same medium at 30°C for 16–24 h before the various assays were performed.

2.2. Enzymatic activities of whole cells

The enzymatic activities of the strains were tested using the API-ZYM test as a preliminary screening (Sacristán et al., 2006).

Extracellular quantitative proteolytic activity was determined by the o-phthalaldehyde (OPA) method (Church et al., 1983). The results were calculated from a calibration curve obtained from the dilution of glycine in distilled water and were expressed in mM glycine L⁻¹ of milk.

The acidifying activity of the strains was determined in 10% reconstituted skimmed milk powder inoculated at a level of 1% (v/v) with bacterial suspensions revitalised in MRS broth at 30°C containing 10^9 cfu mL⁻¹. After incubation at 30°C for 6, 12 and 24 h, pH and titratable acidity were measured in accordance with the International Dairy Federation (IDF) standard 306 (IDF, 1995). Titratable acidity was expressed as g lactic acid mL⁻¹ of milk.

2.3. Preparation of cell fractions

Endocellular enzymatic activities (caseinolytic, aminopeptidase, dipeptidase, carboxypeptidase and esterase activities) were tested in a cell-free extract (CFE) obtained through disrupting cells by using lysozyme.

Strains were grown in 25 mL of MRS broth (1% inoculum) at 30°C for 16–24 h until they had reached the stationary phase. For cells grown in MRS broth up-regulation was associated with the stationary phase because aminoacids and peptide depletion would result in a removal of repression on peptidase biosynthesis leading to higher specific activities (Kenny et al., 2003).

The cultures were then centrifuged at 8160 g for 10 min at a temperature $\leq 4^{\circ}\text{C}$. The sediments once dissolved in 4 mL of TRIS-HCl buffer (50 mM, pH 7.00), were incubated at 30°C for 1 h, in order to liberate the proteinases bound to the cell wall, and afterwards centrifuged at 5,000 g for 20 min in accordance with the method proposed by Requena et al. (1993). The supernatants were frozen.

Finally the sediments were dissolved in 20 mL of TRIS-HCl buffer containing lysozyme at a concentration of 30 mg/mL and incubated for 1 h at 37°C in order to solubilize the cells' walls. Thereafter, as recommended by Casla et al. (1996), the cells were centrifuged at 4000 g for 14 min to obtain two fractions. One of these corresponded to the supernatant or endocellular fraction, the other to the sediment made up of cellular membranes and the cell walls. The possibility of contamination between the fractions

should not be excluded, so the supernatants were filtered trough 0.22 μm syringe filters (Millipore Corporation, Bedford, U.S.A.) to obtain the CFE which were stored in frozen form until their enzyme activities were determined.

The Lowry method was used to analyse the protein concentration in the CFE (Lowry et al., 1951).

2.4. Enzymatic activity of CFE

Caseinolytic activity was measured by the method of Gómez et al. (1988) using bovine casein at a concentration of 2% in phosphate buffer (50 mM, pH 7.00) as substrate. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme required to give an increase in absorbance of 0.01 units after a hydrolysis period of 1 h. Results were expressed as units of caseinolytic activity per mg of protein in the CFE.

Aminopeptidase activity of the CFE was determined as described by Requena et al. (1993) using p-nitroanilides (pNA) substrates such as Ala-pNA, Leu-pNA, Lys-pNA and Pro-pNA. One unit of aminopeptidase activity was defined as the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.001 units. Aminopeptidase activity was expressed as the number of activity units per mg of protein in the CFE per min.

Dipeptidase activity was determined by a modification of the cadmium–ninhydrin method (Doi et al., 1981), using the following dipeptides as substrates: Leu-Leu, Tyr-Leu, Ala-Ala, Leu-Gly, Ala-Phe, Lys-Leu and Phe-Ala. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that produced an increase in absorbance of 0.1 units at 507 nm. The results were expressed as the number of enzymatic activity units per mg of protein in the CFE per min.

Carboxypeptidase activity of CFE was measured by spectrophotometric method of El Soda and Desmazeaud, 1982 using N-carbobenzyloxy-L-Leu as substrate. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that produced an increase in absorbance at 570 nm of 0.01 units. The results were expressed as enzymatic units per mg of protein in the CFE per min.

The esterase activity of the cell-free extracts (CFE) was determined as described by Castillo et al. (1999) using the following β -naphthyl substrates: β -naphthyl butyrate (C4), β -naphthyl caprylate (C8), β -naphthyl myristate (C14) and β -naphthyl stearate (C18). This method is based on the spectrophotometric measurement at room temperature of hydrolysis rates of β -naphthyl derivatives. Esterase activity was expressed as μmoles of β -naphthol released per min and per mg of protein in the CFE at 560 nm.

2.5. 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 different bacterial strains of the same genus 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.

3. Results and discussion

3.1. Enzymatic activity of whole cells

3.1.1. Acidifying activity

Table 1 shows the acidifying activity of the 24 strains of LAB isolated from Genestoso cheese, selected on the basis of their antimicrobial activity. The lactococci showed a greater acidifying activity than leuconostoc and lactobacilli, with some strains reaching values around 0.7–0.8 g 100 mL⁻¹ of lactic acid after 24 h

Table 1
Acidifying activity of 24 strains of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese.^a

Strain	Incubation time					
	6 h		12 h		24 h	
GE ^b	pH	Titratable acidity ^c	pH	Titratable acidity ^c	pH	Titratable acidity ^c
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>						
GE 11	5.86 ^e	0.29 ^f	4.44 ^d	0.57 ^g	4.08 ^d	0.72 ^h
GE 12	5.89 ^e	0.29 ^f	5.19 ^e	0.35 ^g	4.76 ^b	0.47 ^{g,f}
GE 13	5.93 ^e	0.22 ^e	5.60 ^f	0.30 ^g	4.96 ^b	0.44 ^e
GE 18	5.74 ^d	0.26 ^f	5.02 ^e	0.37 ^g	4.31 ^b	0.60 ^g
GE 44	6.46 ^h	0.13 ^d	5.15 ^e	0.40 ^g	4.33 ^f	0.80 ⁱ
GE 61	6.47 ^h	0.19 ^e	6.09 ^{g,h}	0.22 ^d	5.77 ⁱ	0.29 ^d
GE 102	6.45 ^h	0.19 ^e	6.17 ^h	0.24 ^d	4.66 ^b	0.50 ^f
GE 103	6.41 ^{g,h}	0.18 ^e	6.20 ^h	0.24 ^d	4.52 ^b	0.63 ^g
GE 115	6.33 ^g	0.19 ^e	6.08 ^g	0.23 ^d	4.60 ^b	0.60 ^g
GE 118	6.19 ^f	0.18 ^e	5.56 ^f	0.37 ^g	4.43 ^b	0.72 ^h
GE 2363	6.26 ^{g,f}	0.19 ^e	5.73 ^{f,g}	0.26 ^d	4.22 ^b	0.68 ^{h,b}
GE 2375	6.33 ^g	0.19 ^e	5.97 ^g	0.22 ^d	5.17 ^b	0.40 ^g
GE 2379	6.16 ^f	0.22 ^e	4.98 ^g	0.44 ^f	4.14 ^d	0.76 ⁱ
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>						
GE 2002	6.41 ^d	0.18 ^d	6.40 ^d	0.17 ^d	6.28 ^d	0.17 ^d
GE 2003	6.50 ^d	0.16 ^d	6.47 ^d	0.16 ^d	6.31 ^d	0.18 ^d
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>						
GE 2068	6.55 ^d	0.17 ^d	6.37 ^d	0.18 ^d	5.98 ^e	0.21 ^d
<i>Lactobacillus paracasei</i>						
GE 2036	6.48	0.18	6.38	0.18	5.89	0.23
GE 2071	6.50	0.16	6.43	0.20	6.09	0.20
<i>Lactobacillus plantarum</i>						
GE 2077	6.55	0.17	6.43	0.16	6.29	0.17
<i>Enterococcus faecalis</i>						
GE 26	5.95 ^d	0.24 ^e	5.23 ^e	0.35 ^g	4.58 ^e	0.61 ^f
GE 35	5.96 ^d	0.22 ^e	5.08 ^d	0.31 ^d	4.32 ^d	0.60 ^f
GE 2320	6.47 ^e	0.18 ^d	5.85 ^f	0.29 ^d	5.23 ^d	0.43 ^d
GE 2371	6.14 ^d	0.25 ^e	5.82 ^f	0.23 ^d	4.40 ^d	0.64 ^f
GE 2381	6.32 ^e	0.18 ^d	5.02 ^d	0.37 ^g	4.75 ^b	0.51 ^g

^aValues presented are means of two replicates evaluations for each bacterial strain.

^bStrains of Genestoso cheese.

^cTitratable acidity expressed as g 100 mL⁻¹ lactic acid.

^{d–h}Values corresponding to different bacterial strains of the same genus not showing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

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

of incubation. The differences presented by strains in their acidifying capacity were evident after 12 h of incubation and after 24 h had grown significantly. The enterococci showed an acidifying activity similar to that of lactococci. The strains belonging to the genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc* presented the lowest values for rate of acidification, as would be expected, owing to their lower ability to metabolize lactose. These results were similar than those described by other authors (Herreros et al., 2003; Badis et al., 2004).

3.1.2. Proteolytic activity

Proteolytic activity, determined using the o-phthalialdehyde (OPA) spectrophotometric assay, showed significant differences between the genera of LAB, as also between strains of the same genus. Several strains of the genus *Lactococcus* presented greater proteolytic activity than lactobacilli. These results agree with those obtained by Pérez et al. (2003) and Herreros et al. (2003) in studies about the technological characterization of lactic acid bacteria isolated from craft cheeses.

Strains GE 61 and GE 2363 of *L. lactis* subsp. *lactis* were those showing the highest release of amino groups (expressed as mM Gly L⁻¹ of milk), giving values greater than 5.0 mM Gly L⁻¹ after 24 h of incubation. Seven of the thirteen strains of *L. lactis*

subsp. *lactis* showed values between 2.0 and 3.5 mM Gly L⁻¹. These values are even higher than those reported by other authors (Mayo et al., 1990; Centeno et al., 1996; Herreros et al., 2003). The strains of *L. mesenteroides* GE 2002 and GE 2068 showed the lowest and the highest level of proteolytic activity, respectively. Two of the three strains of *Lactobacillus* (GE 2071 and GE 2077) presented a high level of proteolytic activity (4.782 and 3.146 mM Gly L⁻¹, respectively). Within the genus *Enterococcus*, except of one strain (GE 2320), all strains had values for proteolytic activity between 3 and 5 mM Gly L⁻¹ after 24 h.

The production of high levels of free amino acid by the majority of enterococci strains is in conformity with their strongly proteolytic nature.

3.2. Enzymatic activity of cell-free extract (CFE)

3.2.1. Carboxypeptidase activity

Carboxypeptidase activity is in general low or absent in lactic acid bacteria. Some authors suggest that carboxypeptidase activity is an atypical property of *Lactococcus* spp. in commercial starter cultures (Tan et al., 1993). The carboxypeptidase activity of the cell-free extracts examined was for the most part nil or very low, except for two strains of *E. faecalis* (GE 2320 and GE 2381), and two of *L. lactis* subsp. *lactis* (GE 2363 and GE 2379), which showed comparatively high levels (see Table 2).

3.2.2. Caseinolytic activity

If it is kept in mind that some strains have a considerable caseinolytic capacity, it is likely that lactobacilli can play a crucial role in the ripening of cheeses (Broome et al., 1991). In fact, the CFE of *L. paracasei* (GE 2036, GE 2071) and *L. plantarum* (GE 2077) isolated from Genestoso cheese showed strong caseinolytic activity. High values were also obtained for the CFE of *L. mesenteroides* (GE 2002 and GE 2003). The caseinolytic activities of the CFE of strains of enterococci and lactococci were lower in comparison, except for the GE 2363 strain of *L. lactis* subsp. *lactis* and the GE 2320 strain of *E. faecalis* (see Table 2). Herreros et al. (2003) similarly found high values for caseinolytic activity in strains of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolated from craft cheeses (Table 3).

3.2.3. Aminopeptidase activity

The CFE of *L. paracasei* in general showed the highest level of aminopeptidase activity. The CFE of strains exhibited the greatest degree of aminopeptidase activity towards the substrates Lys-pNA and Leu-pNA derivates. This activity was also observed by Morea et al. (2007) in strains of *Lactobacillus*. A moderate degree of activity towards these same substrates was likewise detected for the CFE of strains of *L. mesenteroides*. Macedo et al. (2000) and Herreros et al. (2003) detected considerable aminopeptidase activity in the CFE of strains of *L. mesenteroides*.

Aminopeptidase activity in the majority of the CFE of the strains of *Lactococcus* tested using the substrates Ala-pNA, Lys-pNA, Pro-pNA and Leu-pNA was generally low or even undetectable. An exception was the CFE of *L. lactis* strain GE 2363, which exhibited some aminopeptidase activity for the substrates Lys-pNA, Pro-pNA and Leu-pNA. Slighter activity was detected in the CFE of strain GE 2379 using these substrates. In the CFE of *L. lactis* strains GE 44, GE 61 and GE 2375 aminopeptidase activity was detected for some of the substrates. Other authors similarly did not detect (or detected only very slight) aminopeptidase activity in CFE of *Lactococcus* when these substrates were used (Pérez et al., 2003; Herreros et al., 2003). The strains of *E. faecalis* mostly showed low values for aminopeptidase activity. Taking into account that several factors such as growth phase and the culture medium affect enzyme activities, aminopeptidase activity in LAB strains could be affected

Table 2
Proteolytic, carboxypeptidase, and caseinolytic activity of 24 strains of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese.^a

Strains	Proteolytic activity ^b	Carboxypeptidase activity ^c	Caseinolytic activity ^d
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			
GE 11	2.84 ^b	ND ^e	15.61 ^e
GE 12	2.39 ^{b,g}	ND ^e	149.86 ^f
GE 13	1.71 ^{b,f}	ND ^e	208.14 ^f
GE 18	0.68 ^e	ND ^e	3.11 ^e
GE 44	2.91 ^{b,g}	ND ^e	21.48 ^e
GE 61	5.38 ⁱ	ND ^e	75.06 ^{b,f}
GE 102	1.43 ^{f,e}	ND ^e	122.00 ^f
GE 103	2.02 ^{b,g}	ND ^e	126.35 ^f
GE 115	2.79 ^{b,g}	ND ^e	95.09 ^f
GE 118	2.17 ^{b,g}	ND ^e	130.09 ^f
GE 2363	5.98 ⁱ	16.93 ^f	1589.27
GE 2375	3.52 ^{b,g}	ND ^e	29.21 ^e
GE 2379	2.03 ^{b,g}	29.27 ^f	25.71 ^e
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
GE 2002	0.91 ^e	8.73 ^f	442.09 ^g
GE 2003	1.09 ^e	ND ^e	271.43 ^f
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>			
GE 2068	5.00 ^f	ND ^e	15.67 ^e
<i>Lactobacillus paracasei</i>			
GE 2036	1.27 ^e	1.07 ^f	422.80 ^g
GE 2071	4.78 ^g	ND ^e	505.85 ^f
<i>Lactobacillus plantarum</i>			
GE 2077	3.15 ^f	ND ^e	917.28 ^g
<i>Enterococcus faecalis</i>			
GE 26	2.94 ^f	ND ^e	16.38 ^g
GE 35	4.23 ^{f,g}	ND ^e	27.06 ^g
GE 2320	0.95 ^e	37.13 ^f	914.76 ^h
GE 2371	4.93 ^g	ND ^e	295.00 ^g
GE 2381	3.58 ^f	29.07 ^f	58.10 ^f

^aValues presented are means of three replicate evaluations for each strain.

^bProteolytic activity measured using the o-phthalaldehyde (OPA) spectrophotometric assay and expressed as mM Gly L⁻¹ of milk, after a 24 h period of incubation of the strains in the milk.

^cCarboxypeptidase activity expressed as units of enzymatic activity mg⁻¹ protein min⁻¹. One unit of carboxypeptidase activity was the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.01 units at 570 nm in 1 min.

^dCaseinolytic activity expressed as units of enzymatic activity 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.

^{e–i} Values corresponding to different bacterial strains of the same genus not showing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

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

by the nature of the nitrogen source in the growth medium. In MRS (a peptide-rich medium) peptidase biosynthesis would be repressed as there is a high availability of peptides and aminoacids (Kenny et al., 2003).

3.2.4. Dipeptidase activity

Each CFE of the lactic acid bacteria strains analysed exhibited a different dipeptidase activity (see Table 4). The greatest degree of dipeptidase activity was obtained for the CFE of *L. lactis* (GE 2363) in respect of most of the dipeptides tested and overall towards Leu-Leu, Tyr-Leu and Phe-Ala. Herreros et al. (2003) obtained the same results for *L. lactis*. The GE 2071 strain of *L. paracasei* showed high levels of dipeptidase activity, principally towards the dipeptide Phe-Ala. The GE 2077 strain of *L. plantarum* was the second most active in relation to the dipeptide Leu-Leu. Previous studies on the peptidase system of *Lactobacillus* showed a high level of dipeptidase activity in the CFE of these microorganisms (Martínez-Cuesta et al., 2001; Zotta et al., 2007). Dipeptidase activity was also high for the CFE of *E. faecalis* (GE 2320) with regard to most of the dipeptides tested.

Table 3
Aminopeptidase activity^b of 24 strains of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese.^a

Strains	Substrates pNA			
	Ala-pNA	Lys-pNA	Pro-pNA	Leu-pNA
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>				
GE 11	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 12	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 13	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 18	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 44	ND ^c	14.85 ^g	ND ^c	1.06 ^d
GE 61	2.74 ^d	ND ^c	3.01 ^e	1.92 ^d
GE 102	ND ^c	4.07 ^e	2.03 ^{d,e}	3.49 ^e
GE 103	ND ^c	2.44 ^d	1.83 ^d	1.53 ^d
GE 115	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 118	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 2363	ND ^c	15.89 ^g	21.19 ^g	52.98 ^g
GE 2375	7.70 ^g	5.53 ^g	ND ^c	ND ^c
GE 2379	ND ^c	11.63 ^f	9.80 ^f	12.22 ^f
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
GE 2002	ND ^c	6.41 ^d	ND ^c	12.81 ^g
GE 2003	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>				
GE 2068	ND ^c	ND ^c	ND ^c	1.44 ^d
<i>Lactobacillus paracasei</i>				
GE 2036	41.98 ^e	91.58 ^f	ND ^c	143.48 ^f
GE 2071	ND ^c	17.44 ^d	27.41 ^{d,e}	27.41 ^{d,e}
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
GE 2077	ND ^c	ND ^c	ND ^c	18.074 ^d
<i>Enterococcus faecalis</i>				
GE 26	ND ^c	ND ^c	ND ^c	1.36 ^d
GE 35	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 2320	15.68 ^g	18.30 ^g	ND ^c	ND ^c
GE 2371	17.89 ^g	ND ^c	ND ^c	12.59 ^g
GE 2381	ND ^c	ND ^c	5.21 ^{d,e}	8.19 ^{e,f}

^aValues presented are means of two replicate evaluations for each strain.

^bAminopeptidase activity expressed as units of enzymatic activity mg⁻¹ protein. One unit of aminopeptidase activity was the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.001 units at 410 nm in 1 min.

^{c–g} Values corresponding to different bacterial strains of the same genus not showing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

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

In general, the dipeptidase activity of the CFE of the strains tested was stronger in respect of the Leu-Leu, Tyr-Leu and Phe-Ala substrates.

3.2.5. Esterolytic activity

Esterolytic activity of the CFE derived from the lactococci and leuconostoc isolated was slight or absent, as might be expected. However, low levels of lipolytic activity in starter strains may be of importance in the development of the aroma of cheese. This is due to the low detection threshold for the compounds produced by lipolytic action and the long process of ripening required by some cheeses. The majority of strains of *L. lactis* and strains of *Lactobacillus* exhibited esterolytic activity directed primarily at β-naphthyl caprylate and myristate. Most of the strains of LAB tested showed no activity in respect of β-naphthyl stearate, apart from a few strains of *Lactococcus* and *Leuconostoc*. This state of affairs had already been noted by other authors who have reported stronger activity by strains of lactic acid bacteria on short-chain fatty acids (Williams and Banks, 1997). *Enterococci* showed considerable enzymatic activity towards all the substrates tested except the β-naphthyl stearate mentioned above. (Table 5)

This investigation of the enzymatic activity of twenty-four strains of LAB isolated from Genestoso cheese constitutes a preliminary study with a view to the selection of strains that

Table 4

Dipeptidase activity^b of 24 strains of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese.^a

Strain	Leu-Leu	Tyr-Leu	Phe-Ala	Ala-Ala	Lys-Leu	Leu-Gly	Ala-Phe
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>							
GE 11	9.97 ^d	ND ^c	5.65 ^{c,d}	0.74 ^c	4.43 ^d	ND ^c	ND ^c
GE 12	77.63 ^f	48.08 ^d	49.60 ^e	35.18 ^e	14.07 ^e	ND ^c	15.24 ^d
GE 13	83.46 ^f	314.55 ^b	298.38 ^{a,b}	36.52 ^e	52.17 ^b	ND ^c	ND ^c
GE 18	1.55 ^c	5.90 ^c	8.20 ^d	ND ^c	4.66 ^d	ND ^c	2.64 ^c
GE 44	57.29 ^e	43.32 ^d	64.72 ^{c,f}	ND ^c	8.84 ^{d,e}	ND ^c	ND ^c
GE 61	46.75 ^e	82.92 ^e	80.36 ^e	ND ^c	5.48 ^d	ND ^c	ND ^c
GE 102	36.41 ^e	89.47 ^e	46.09 ^f	54.80 ^f	17.43 ^e	ND ^c	ND ^c
GE 103	49.24 ^e	101.94 ^{e,f}	62.06 ^{e,f}	64.09 ^f	30.52 ^e	ND ^c	ND ^c
GE 115	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	12.19 ^e	ND ^c	ND ^c
GE 118	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	21.79 ^d
GE 2363	1711.11 ^b	928.84 ^c	5249.89 ^b	508.57 ^d	176.59 ^b	321.39 ^c	353.17 ^c
GE 2375	231.60 ^c	133.22 ^c	247.49 ^c	46.12 ^{e,f}	ND ^c	75.32 ^c	86.85 ^c
GE 2379	87.34 ^f	34.29 ^d	326.32 ^b	8.16 ^d	36.73 ^f	29.39 ^d	ND ^c
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>							
GE 2002	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 2003	102.95 ^d	ND ^c	ND ^c	38.37 ^d	ND ^c	ND ^c	ND ^c
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>							
GE 2068	16.47 ^d	ND ^c	ND ^c	3.19 ^c	3.71 ^d	ND ^c	
<i>Lactobacillus paracasei</i>							
GE 2036	29.51 ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	15.26 ^e	ND ^c	ND ^c
GE 2071	256.66 ^d	99.67 ^d	817.33 ^e	ND ^c	33.23 ^d	ND ^c	137.05 ^d
<i>Lactobacillus plantarum</i>							
GE 2077	739.55 ^c	176.23 ^e	405.17 ^d	ND ^c	ND ^c	ND ^c	162.67 ^c
<i>Enterococcus faecalis</i>							
GE 26	21.13 ^c	7.46 ^d	13.91 ^c	ND ^c	0.65 ^c	ND ^c	ND ^c
GE 35	18.26 ^c	6.51 ^d	21.86 ^c	ND ^c	1.12 ^c	ND ^c	ND ^c
GE 2320	708.27 ^f	397.27 ^f	525.33 ^e	ND ^c	282.27 ^e	ND ^c	52.27 ^d
GE 2371	154.70 ^e	164.59 ^e	128.91 ^d	48.57 ^e	ND ^c	53.96 ^d	44.97 ^d
GE 2381	90.87 ^d	ND ^c	120.66 ^d	29.79 ^d	134.07 ^d	ND ^c	

^aValues presented are means of two replicate evaluations for each strain.

^bDipeptidase activity expressed as units of enzymatic activity mg⁻¹ protein. One unit of dipeptidase activity was the amount of enzyme giving an absorbance increase of 0.1 units at 507 nm in 1 min.

^{c-f}Values corresponding to different bacterial strains of the same genus not showing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

ND: not detected in 6 min at 30 °C by using a cell-free extracts which contained a certain amount of protein.

might be included in a starter culture intended for use in making traditional cheeses. On the basis of the results obtained in this work, it is possible to suggest for this purpose the GE 11, GE 12 and GE 2363 strains of *L. lactis* subsp. *lactis* and the GE 2036 strain of *L. paracasei*. However, compatibility studies and phage resistance of selected strains need to be conducted before trying the mix cultures.

The strains of *L. lactis* were selected thanks to their acidifying and proteolytic and/or caseinolytic capacities. The proteinase and peptidase activities of starter and non-starter bacteria play a key role during cheese ripening. This is through the release of amino-acids, decreasing bitterness by hydrolysing bitter peptides, changing the texture and increasing the pH and water binding capacity (Lawrence et al., 1987; Fox, 1989; Tan et al., 1993).

The third of these strains (GE 2363) also stands out by reason of its strong esterase activity. In view of their considerable caseinolytic activity it would also be possible to suggest the strains of *L. plantarum* and *L. paracasei*. The GE 2036 strain of *L. paracasei* may be of interest, owing to its strong caseinolytic and aminopeptidase action. Since aminopeptidases play an important role in the hydrolysis of bitter peptides and in amino acid liberation, the presence of lactobacilli in large numbers should play an important role in the enhancement of the flavour of cheeses (Tan et al., 1993; Sasaki et al., 1993). Thus, the addition of selected strains with high

Table 5

Esterase activity^b of 24 strains of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese.^a

Strains	Substrates			
	Naphthylbutyrate	Naphthylcaprylate	Naphthylmyristate	Naphthylesterate
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>				
GE 11	1.89 ^d	2.65 ^d	1.90 ^d	4.31 ^d
GE 12	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 13	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 18	1.84 ^d	2.34 ^d	2.15 ^d	1.77 ^c
GE 44	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 61	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 102	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 103	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 115	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 118	0.96 ^{c,d}	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 2363	51.06 ^f	78.40 ^f	309.38 ^f	ND ^c
GE 2375	5.76 ^e	7.94 ^e	43.46 ^e	ND ^c
GE 2379	6.32 ^e	8.21 ^e	31.90 ^e	ND ^c
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
GE 2002	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 2003	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>				
GE 2068	2.55 ^d	2.72 ^d	1.68 ^d	3.45 ^d
<i>Lactobacillus paracasei</i>				
GE 2036	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 2071	ND ^c	1.28 ^d	1.84 ^d	ND ^c
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
GE 2077	ND ^c	4.66 ^e	ND ^c	ND ^c
<i>Enterococcus faecalis</i>				
GE 26	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
GE 35	ND ^c	0.06 ^c	1.58 ^c	ND ^c
GE 2320	11.69 ^e	16.17 ^d	166.16 ^f	ND ^c
GE 2371	ND ^c	6.18 ^c	62.50 ^c	ND ^c
GE 2381	2.69 ^d	2.81 ^d	41.84 ^d	ND ^c

^aValues presented are means of two replicate evaluations for each strain.

^bEsterase activity expressed as μmoles of β-naphthol released per min mg⁻¹ protein of cell-free extract.

^{c-g}Values corresponding to different bacterial strains of the same genus not showing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

ND: not detected in 240 min at 37 °C by using a cell-free extracts which contained a certain amount of protein.

aminopeptidase activity as starters would increase proteolysis and might improve the flavour of cheeses.

The GE 2320 strain of *E. faecalis* might be included in certain starters because of its high level of caseinolytic and dipeptidase activity, once it has been established that it is not pathogenic. The detection of enterotoxins and the screening for virulence factors of the *Enterococcus* strains is necessary to ensure their safety (Tompkins et al., 2008).

References

- 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.
- Badis, A., Guetarti, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E., Kihal, M., 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiol. 21, 579–588.
- Broome, M.C., Hickey, M.W., Briggs, D.R., Jones, G.P., 1991. Peptidase activity of non-starter lactobacilli. Aust. J. Dairy Technol. 46, 19–23.
- 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* IFPL105. J. Appl. Bacteriol. 81, 35–41.
- Centeno, J.A., Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L., 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). Int. J. Food Microbiol. 33, 307–313.
- 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. J. Dairy Sci. 66, 1219–1227.

- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T., 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* 118, 173–184.
- 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. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1181–1188.
- Fox, P.F., 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72, 1379–1400.
- Gómez, R., Peláez, C., Martín-Hernández, M.C., 1988. Enzyme activity in Spanish goat's cheeses. *Food Chem.* 28, 159–165.
- 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.
- 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). *Int. Dairy J.* 13, 469–479.
- IDF, 1995. IDF Guideline Determination of Acidifying Activity of Dairy Cultures. Bulletin IDF 306. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, pp. 34–36.
- Kenny, O., FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K., 2003. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.* 13, 509–516.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J., 1987. Symposium: cheese ripening technology. Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 70, 1748–1760.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Macedo, A., Vieira, M., Pocas, R., Malcata, F.X., 2000. Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *Int. Dairy J.* 10, 769–774.
- Martínez-Cuesta, M.C., Fernández de Palencia, P., Requena, T., Peláez, C., 2001. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese. *Int. Dairy J.* 11, 577–585.
- Mayo, B., Hardisson, C., Braña, A.F., 1990. Characterization of wild strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Cabrales cheese. *J. Dairy Res.* 57, 125–134.
- Morea, M., Matarante, A., Di Cagno, R., Baruzzi, F., Minervini, F., 2007. Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese. *Int. Dairy J.* 17, 525–534.
- Pérez, G., Cardell, E., Zárate, V., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Int. J. Food Sci. Tech.* 38, 537–546.
- Requena, T., Peláez, C., Fox, P., 1993. Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Lebensmittel Unters. Forsch.* 196, 351–355.
- Sacristán, N., González, L., Arenas, R., Sandoval, H., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., 2006. Aptitud tecnológica de cepas de bacterias lácticas con capacidad antimicrobiana, aisladas del queso de Genestoso. P-38. XV Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Orense, Spain.
- Sasaki, S., Bosman, B.W., Tan, P.S.T., 1995. Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *J. Dairy Res.* 62, 604–610.
- Tan, P.S.T., Poolman, B., Komings, W.N., 1993. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* 60, 269–286.
- Tompkins, T.A., Hagen, K.E., Wallace, T.D., Fillion-Forté, V., 2008. Safety evaluation of two bacterial strains used in asian probiotic products. *Can. J. Microbiol.* 54, 391–400.
- 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. *Int. Dairy J.* 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. *Int. Dairy J.* 8, 255–266.
- Zotta, T., Ricciardi, A., Parente, E., 2007. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 165–172.

Artículo IV



González, L., Fernández, D., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E.
2013. Enzymatic activity, surface hydrophobicity and biogenic amines production in lactic acid bacteria isolated from an artisanal Spanish cheese. *African Journal of Microbiology Research* 7, 2114-2118.

Full Length Research Paper

Enzymatic activity, surface hydrophobicity and biogenic amines production in lactic acid bacteria isolated from an artisanal Spanish cheese

L. González Arias, D. Fernández, N. Sacristán, R. Arenas, J.M. Fresno, E. Tornadijo*

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria,
 Universidad de León, 24071 León, Spain.

Accepted 19 April, 2013

The enzymatic activities of 24 lactic acid bacteria strains have been studied. Lactobacilli strains exhibited the highest β -galactosidase and aminopeptidase activities. Acid phosphatase activity was high in lactobacilli and lactococci strains. Esterase activity was observed for leuconostoc and lactobacilli strains. The hydrophobicity test and the biogenic amines detection were also tested in some strains selected for their use as autochthonous starters in cheese manufacture. In general, all strains showed degrees of hydrophobicity greater than 70%, and were poor former of histamine and cadaverine and medium putrescine former. Tyramine production was medium in three strains and low in two strains of *Lactococcus*.

Key words: Autochthonous starters, cheese, lactic acid bacteria, biogenic amines, enzymatic activity.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) with interesting technological and probiotic properties are used as starters in the manufacture of fermented dairy products, such as milk drinks and yoghurts, and their use in cheese production is a common practice nowadays (Mäkeläinen et al., 2009). The cheese constitutes an adequate habitat for the probiotic bacteria in respect to the other fermented products, contributing to their survival also in the human intestinal tract (Bergamini et al., 2009).

Enzyme substrates are powerful tools used extensively in microbiology to study metabolic pathways of microorganisms and to enumerate and identify microorganisms. The hydrophobicity cellular is a necessary characteristic to aggregation and adhesion of the cells to intestinal epithelium and constitutes a requisite in the probiotic strains (Pérez et al., 1998; Del

Re et al., 2000). LAB with decarboxylase activity of amino acids could produce biogenic amines (BA) in fermented foods, as is the cheese. Then, the presence of BA is often inevitable in these products, although it could be conditioned by hygienic and technological aspects (Martuscelli et al., 2005; Curiel et al., 2011). Several authors have reported the presence of putrescine, cadaverine, histamine and tyramine in products in which LAB grow (Arena and Manca de Nadra, 2001; Martuscelli et al., 2005). In the fact, tyramine and histamine are the main biogenic amines in cheese (Burdychova and Komprda, 2007).

The aim of this preliminary study was to evaluate several functional and technological characteristics of LAB strains, isolated from artisanal Genestoso cheese. The enzymatic activities screening by rapid methods

*Corresponding author. E-mail: metorr@unileon.es. Tel: +34-987291184 Fax: +34-987291284.

Abbreviations: BA, Biogenic amines; MRS, Man-Rogosa Sharpe; HPLC, high performance liquid chromatography.

(API-ZYM system), the ability to produce biogenic amines, the hydrophobicity index and the incompatibility among the strains, were analysed in order to provide information on their approach as adjuncts or starters.

MATERIALS AND METHODS

Lactic acid bacteria strains

Twenty-four strains were chosen on the basis of their antimicrobial activity against four Gram-positive reference strains from 420 strains isolated from Genestoso cheese, an artisanal Spanish raw cow's milk cheese, to study their technological aptitude (González et al., 2007; 2010). In the present work, enzymatic activities using the semi quantitative API-ZYM system were tested for these strains. The hydrophobicity test, the biogenic amines detection and the incompatibility of growth were also tested in five selected strains by their technological aptitude. The strains were cultured in Man-Rogosa Sharpe (MRS) broth at 30°C for 18-24 h before been tested by the following assays.

Enzymatic activity

The enzymatic activity of the LAB strains was evaluated using the API-ZYM system (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). This activity was measured by comparing the colour developed within five minutes with the API-ZYM colour reaction chart (Durlu-Ozkaya et al., 2001) and the results expressed as nmol of substrate hydrolysed.

Surface hydrophobicity assay

The characteristic of the cell surface was determined following the recommendations of several authors (Pérez et al., 1998; Nostro et al., 2004; Dewan and Tamang, 2007). The cell surface hydrophobicity (H%) was calculated according to Nostro et al. (2004).

Fresh cultures of strains selected as starter culture from Genestoso cheese, were grown in MRS broth at 30°C for 24 h and then centrifuged at 8000 g for 5 min. The pellet was washed three times with 9 mL of Ringer solution and thoroughly mixed. 1 mL of the suspension was taken and the absorbance at 580 nm was measured. Equal volumes of suspension and n-hexadecane were mixed in duplicates and mixed thoroughly. The phases were allowed to separate by decantation for 30 min at room temperature. The aqueous phase was carefully removed and the absorbance at 580 nm was measured. The decrease in the absorbance of the aqueous phase was taken as a measure of the cell surface hydrophobicity (H%), which was calculated according to Nostro et al. (2004), which consider "hydrophobic" a percentage hydrophobicity index greater than 70%.

Biogenic amines production

Production of biogenic amines was tested by qualitative and quantitative methods. Qualitative analysis was performed in a different amino acid decarboxylase media described by Bover-Cid and Holzapfel (1999). The media were supplemented with the corresponding precursor amino acids (L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride, L-lysine monohydrochloride and tyrosine disodium salt) at 1% final concentration. The production of at least one biogenic amine was recorded by the formation of a purple colour in the decarboxylase broth, according to Curiel et al. (2011). Biogenic amine production

was confirmed by analytical quantitative methods, such as high performance liquid chromatography (HPLC). The samples were prepared following the procedures reported by Bover-Cid and Holzapfel (1999) and Burdychova and Komprda (2007). Samples were derivatized by dansyl chloride solution and the analysis were performed according to the methods of Eerola et al. (1993) and Martuscelli et al. (2005).

Detection of incompatibility of the strains

Agar spot test assay was used to study the incompatibility among the lactic acid bacteria, as described by Casla et al. (1996).

RESULTS AND DISCUSSION

None of the 24 strains showed α -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase and α -fucosidase activities (Table 1). LAB strains without β -glucuronidase activity could be considered probiotic flora for human. Lactobacilli and one strain of leuconostoc showed high β -galactosidase activity (≥ 40 nmol substrate hydrolysed). These results agree with those obtained by Mathara et al. (2004) and Dewan and Tamang (2007), who reported that the β -galactosidase is the main enzyme by which homofermentative lactobacilli transform lactose into lactic acid. β -galactosidase contributes to the acidification of dairy products, reduces the intolerance to lactose found in certain human populations and can stimulate the growth and colonization of bifidobacteria with a probiotic effect in the human intestine (Zárate and López-Leiva, 1990). In fact, this enzyme is included in the "Probiotic Active Substance", a concept, introduced by Naidu et al. (1999).

The absence of α -glucosidase activity in lactococci strains concurs with previous studies (Herreros et al., 2003) and may be due to the fact that phospho- β -galactohydrolase is the predominant carbohydratase in *Lactococcus* (Marshall and Law, 1984). This activity was low or not detected in enterococci strains. Alkaline phosphatase activity was very low or not detected for all strains, which agrees with other authors (Herreros et al., 2003). In contrast, acid phosphatase activity was generally high for several strains of lactococci and lactobacilli tested.

Most strains showed an esterase or esterase-lipase activity on short-chain fatty acids, so lipase (C14) activity was not detected or was very low. These results agree with those reported by Ballesteros et al. (2006) and Arenas (2007), who concludes that in this artisanal cheese, the short-chain fatty acids predominate during the first stages of ripening, when LAB reached higher presence in the cheese. The low level of protease activity, the high peptidase activity and the low levels of esterase-lipase (C4 and C8) activity among the LAB strains tested could be desirable traits for flavour and texture development during cheese ripening.

All the 24 strains tested showed Leu-arylamidase activity, reaching high values for some strains.

Table 1. Enzymatic activity^a detected using API-ZYM system, of whole cells of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese.

Species	Strain	Enzyme tested ^b																	
		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>	GE 11	-	-	-	-	0.5	-	-	-	0.5	-	40	5	-	-	-	-	-	
	GE 12	-	-	-	-	20	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	
	GE 13	-	-	-	-	20	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	
	GE 18	-	-	-	-	20	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	
	GE 44	-	-	-	-	0.5	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	
	GE 61	-	0.5	0.5	-	40	0.5	0.5	-	-	40	5	-	-	-	-	-	-	
	GE 102	-	-	-	-	20	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	
	GE 103	-	-	-	-	20	0.5	0.5	-	-	5	5	-	-	-	-	-	-	
	GE 115	-	-	-	-	40	0.5	0.5	-	-	20	10	-	-	-	-	-	-	
	GE 118	0.5	5	0.5	0.5	40	-	5	-	-	40	0.5	-	-	-	-	-	-	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Ln. pseudomesenteroides</i>	GE 2363	-	-	-	-	40	5	-	-	-	40	20	-	-	-	-	-	-	-
	GE 2379	-	-	-	-	10	-	-	-	-	30	5	-	-	-	-	-	-	-
	GE 2375	-	10	5	-	0.5	-	-	-	-	0.5	30	-	-	-	-	-	-	-
	GE 2002	-	20	0.5	-	0.5	0.5	0.5	-	-	0.5	5	-	-	-	-	-	-	-
	GE 2003	-	20	0.5	-	0.5	-	-	-	-	0.5	5	-	-	-	-	-	-	-
	GE 2068	-	10	-	-	5	-	-	-	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-
	GE 2036	-	10	10	0.5	30	30	5	0.5	5	10	30-40	-	≥40	-	10	0.5	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lb. plantarum</i>	GE 2071	0.5	10-20	5-10	0.5	≥40	≥40	20	-	0.5	≥40	≥40	-	≥40	-	≥40	5	0.5	-
	GE 2077	-	-	-	-	≥40	≥40	-	-	-	≥40	10	-	≥40	-	-	≥40	30	-
	GE 26	-	20	10	-	20	-	0.5	0.5	5	5	5	-	-	5	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	GE 35	-	10	5	-	20	0.5	5	-	0.5	0.5	0.5	-	0.5	-	10	-	-	-
	GE 2320	-	10	10	-	5	-	-	-	-	0.5	10	20	-	-	5	-	-	-
	GE 2371	-	-	-	-	10	-	-	-	-	30	5	-	-	-	5	-	-	-
	GE 2381	-	5-10	5	-	20	-	0.5	-	0.5	5	-	-	0.5	-	5	-	-	-
	GE 2381	-	5-10	5	-	20	-	0.5	-	0.5	5	-	-	0.5	-	5	-	-	-

^aEnzymatic activity expressed as nmol of substrate hydrolysed. ^bEnzymes tested: 1.- Alkaline phosphatase; 2. esterase (C4); 3. esterase lipase (C8); 4. lipase (C14); 5. leucine arylamidase; 6. valine arylamidase; 7. cysteine arylamidase; 8. trypsin; 9. α -chymotrypsin; 10. acid phosphatase; 11. naphthol-AS-Bi-phosphorylase; 12. α -galactosidase; 13. β -galactosidase; 14. β -glucuronidase; 15. α -glucosidase; 16. β -glucosidase; 17. N-acetyl (-glucosaminidase); 18. α -mannosidase; 19. α -fucosidase.

Lactobacillus strains showed the highest aminopeptidase activity and similar behaviour was observed in this genus by other authors (Herreros et al., 2006). All the strains tested showed degrees of hydrophobicity greater than 70%, except

et al., 2003; Mathara et al., 2004; Ballesteros et al., 2006). All the strains tested showed degrees of hydrophobicity greater than 70%, except

Enterococcus strain GE 2320 that showed only 69% (Table 2). *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains showed the highest hydrophobicity

Table 2. Hydrophobicity (%) and biogenic amines production by the lactic acid bacteria strains isolated from Genestoso cheese^a.

Species	Strain ^b	% Hydrophobicity	Biogenic amines production ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^c			
			Putrescine	Histamine	Cadaverine	Tyramine
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Ge 11	77.93	22.16	7.56	8.40	3.16
	Ge 12	90.09	23.22	n.d.	7.86	2.26
	Ge 2363	85.68	34.54	7.9	6.84	89.26
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Ge 2036	87.34	52.42	n.d.	9.02	33.74
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ge 2320	69.05	14.48	6.32	8.16	79.20

^aValues presented are means of two replicates evaluations for each bacterial strain; ^bstrains of Genestoso cheese; ^cbiogenic amines production in a medium supplemented with the corresponding precursor amino acid; n.d. not detected.

results agreed with other authors who studied hydrophobicity of LAB strains isolated from fermented milk products and its correlation with the adhesion ability (Pérez et al., 1998; Dewan and Tamang, 2007). In fact, the adherence is important in the selection of probiotic bacteria (Shah, 2001; Kos et al., 2003). All the strains tested were positive for tyrosine decarboxylase activity using the procedure described by Bover-Cid and Holzapfel (1999) and all the strains, except *Lactobacillus paracasei* Ge 2036, were also positives for histamine. The determination of the amino acid-decarboxylase activity of LAB may result in numerous false negative responses due to the acid production by LAB (Bover-Cid et al., 2001) or to an insufficient growth of the strains. False-positive results could be obtained too in some strains (Curiel et al., 2011). Consequently, the biogenic amines production evaluated by rapid screening methods using the decarboxylase medium was confirmed by HPLC. According to Özogul and Özogul (2007) three categories are defined based in the amine production capacity: "Good amine former" ($100\text{-}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), "medium amine former" ($10\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$) and "poor amine former" ($< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$). The results are presented in Table 2.

The production of amines was different among the bacterial species of the same family and even within strains of the same bacterial species, as reported by Özogul and Özogul (2007). The strains tested accumulated little amount of histamine from histidine. However, the strain *Enterococcus faecalis* (Ge 2320) was good histamine and tyramine former but in the enriched broth with other amino acids. Özogul and Özogul (2007) reported that other biogenic amines, more than the amine formed from the amino acid added to the decarboxylase broth, could be produced by the strains, because the medium composition. *Lactobacillus paracasei* Ge 2036, *Enterococcus faecalis* Ge 2320 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Ge 2363 are medium tyramine former from tyrosine. The accumulation of histamine and tyramine in some specific cheeses or other fermented products has been associated with the presence of LAB (Silla-Santos, 1996; Bover-Cid et al., 2001; Martuscelli et al., 2005). Putrescine and cadaverine have also been detected in

large quantities in mature cheeses (Moret et al., 1992). The results of this research work in addition to results obtained in other studies carried out on enzymatic characterization of LAB isolated from Genestoso cheese (González et al., 2010) constitute an essential tool to select LAB strains with interesting characteristics from a technological point of view.

Conclusions

L. lactis subsp. *lactis* Ge 12 and Ge 11 show interesting characteristics from a technological point of view. Consequently, these strains could be tested later in the manufacture of several batches of cheese under controlled conditions in order to design autochthonous starters for the industrial manufacture of artisanal cheeses. There is no doubt that non-starter LAB are essential to the development of the desirable flavours in cheese. Thus, selected strains of non-starter LAB, as *L. paracasei* Ge 2036 strain, selected by their high peptidase activity, could be added as starters or adjuncts in the cheese making process. However, this strain was a medium biogenic amines former for putrescine and tyramine. Its behaviour could be studied in this cheese and, if it would be necessary, other lactobacilli strains could be tested too.

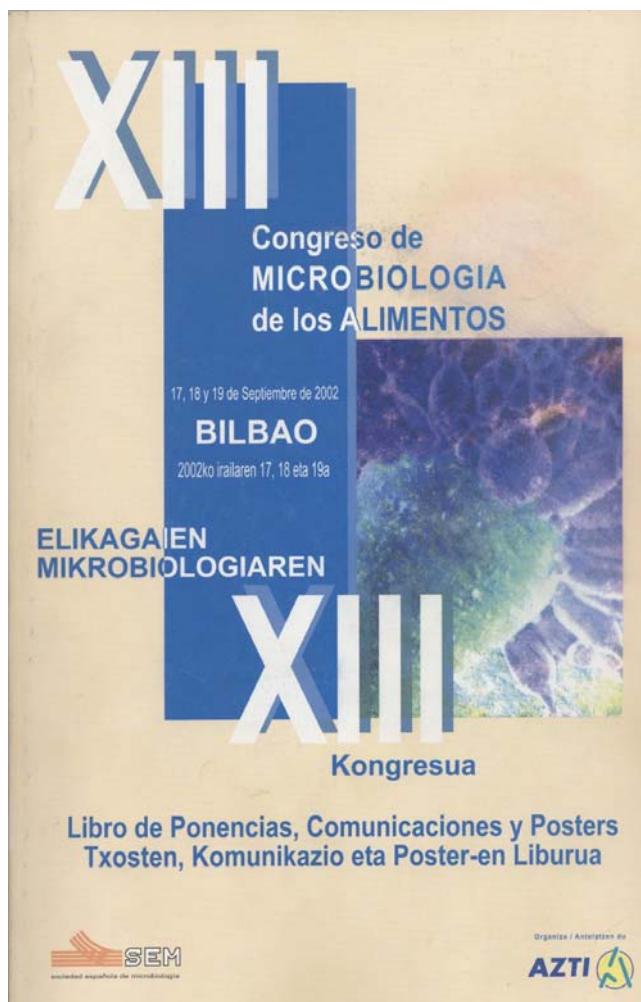
REFERENCES

- Arena ME, Manca de Nadra MC (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90:158-162.
- Arenas R (2007). Caracterización del queso Genestoso durante su maduración: estudio microbiológico, físico-químico, bioquímico y reológico. Tesis Doctoral Universidad de León, Spain.
- Ballesteros C, Poveda JM, González-Viñas MA, Cabezas L (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control* 17:249-255.
- Bergamini CV, Hynes ER, Palma SB, Sabbag NG, Zalacar CA (2009). Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *Int. Dairy J.* 19:467-475.
- Bover-Cid S, Holzapfel WH (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. Food Microbiol.* 53:33-41.
- Bover-Cid S, Hugas M, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC (2001).

- Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. Food Microbiol.* 66:185-189.
- Burdychova R, Komprda T (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 276:149-155.
- 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.
- Curiel JA, Ruiz-Capillas C, de Las Rivas, Carrascosa AV, Jiménez-Colmenero F, Muñoz R (2011). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Sci.* 88:368-373.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl. Microbiol.* 31:438-442.
- Dewan S, Tamang JP (2007). Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. *Antonie van Leeuwenhoek* 92:343-352.
- 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. *J. Appl. Microbiol.* 91:861-870.
- Eröla S, Hinkkanen R, Lindfors E, Hirvi T (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. AOAC Int.* 76:575-577.
- González L, Sandoval H, Sacristán N, Castro JM, Fresno JM, Tornadijo ME (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control* 18:716-722.
- González L, Sacristán N, Arenas R, Fresno JM, Tornadijo ME (2010). Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiol.* 27:592-597.
- Herreros MA, Fresno JM, González Prieto MJ, Tornadijo ME (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Int. Dairy J.* 13:469-479.
- Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94:981-987.
- Mäkeläinen H, Forssten S, Olli K, Granlund L, Rautonen N, Ouwehand AC (2009). Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 19:675-683.
- Marshall JM, Law BA (1984). The physiology and growth of dairy lactic acid. In Davies FL, Law BA (Eds.). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, pp 67-98. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Martuscelli M, Gardini F, Torriani S, Mastrocòla D, Serio A, Chaves-López C, Schirone M, and Suzzi G. (2005). Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J.* 15:571-578.
- Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SM, Holzapfel WH (2004). Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of kule naoto: the Masai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94:269-278.
- Moret S, Bortolomeazzi R, Feruglio M, Lercker G (1992). Determination of biogenic amines in Italian cheeses. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 43:187-198.
- Naidu AS, Bidlack WRA, Clemens RA (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 38:13-126.
- Nistro A, Cannatelli MA, Crisafi G, Musolino AD, Procopio F, Alonza V (2004). Modification of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:423-427.
- Özogul F, Özogul Y (2007). The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *Eur. Food Res. Technol.* 225:385-394.
- Pérez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni G (1998). Surface properties of Bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:21-26.
- Shah NP (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technol.* 55:46-53.
- Silla-Santos MH (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29:213-231.
- Zárate S, López-Leiva MH (1990). Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *J. Food Protection*. 53:262-268.

Comunicación a Congreso I

Evolución de la flora microbiana durante la elaboración y maduración del queso de
Genestoso



POSTERS**EVOLUCIÓN DE LA FLORA MICROBIANA DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE GENESTOSO**

Arenas, R.*, González, L., González, J., Tornadijo, E. y Fresno, J.M.
 Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León. 24071 León.
 e-mail: dhtrac@unileon.es

INTRODUCCIÓN

El queso de Genestoso se elabora de modo artesanal en la localidad de Genestoso, situada al N.O. de Asturias, en el concejo de Cangas del Narcea. Este queso se elabora en la actualidad a partir de leche de vaca, si bien originariamente la materia prima empleada era leche de cabra o mezcla de leche de cabra, vaca y oveja. Es un queso de coagulación láctica para cuya elaboración se parte de leche cruda de vaca recién ordeñada que se deja coagular a temperatura ambiente después de añadir 10 a 20 ml de cuajo de fuerza 1:10.000. Transcurridas 24 horas se transfiere la cuajada a un escurridero donde permanece desuerando durante otras 24 horas. La cuajada se salazona y una vez trabajada se transfiere a moldes de esparto donde se deja orear durante 1 a 2 días. Transcurrido este tiempo se retira del esparto y se madura durante unos 15 a 30 días en función de la época del año y de las condiciones climatológicas. Los quesos adquieren la forma que les confiere el cincho y a los 30 días pesan en torno a 1 Kg.

METODOLOGÍA

Para la realización de este estudio artesanos de la zona elaboraron 4 partidas de queso de Genestoso, dos en el periodo de otoño-invierno y otros dos en el de primavera-verano. De cada lote se tomaron muestras de leche, cuajada y queso de 7, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. En cada una de las muestras se investigó la evolución seguida por los siguientes grupos microbianos: flora aerobia mesófila total (PCA, 30°C, 48 horas), flora aerobia psicrotrofa total (PCA, 7°C, 10 días), flora acidoláctica (M17, 30°C, 18-24 h; Rogosa, 30°C, 5 días; MSE, 22°C, 4 días), enterobacteriáceas (VRBGA, 37°C, 18 a 24 h), enterococos (KAA, 37°C, 24 h), micrococáceas (MSA, 30°C, 48 h) y mohos y levaduras (OGYE, 22-25°C, 5 días).

RESULTADOS

En PCA, M17 y MSE los recuentos más elevados se obtuvieron en la cuajada, con valores (log ufc/g) de 9 a 10, 7 a 8 y 7 a 6, respectivamente. En Rogosa los recuentos más altos se alcanzaron a los 30 días de maduración en los lotes de otoño (log ufc/g: 6-7) y en los de primavera (log ufc/g: 8 a 9), en los que se mantuvieron hasta los 60 días de la maduración. Los recuentos en MSA fueron bajos en todos los lotes, (log ufc/g: 1-2 en cuajada), no pudiéndose detectar a partir de los 15 días en los lotes de otoño y a partir de los 7 días, e incluso antes, en los lotes de primavera. En OGYEA se obtuvieron los máximos recuentos a los 15 y 30 días de la maduración en los lotes de otoño y a los 30 días en los de primavera, con recuentos (log ufc/g) entre 6 y 8. En KAA los máximos recuentos (log ufc/g) fluctuaron entre 7 y 3, según lotes. Los máximos recuentos en VRBGA se alcanzaron en la cuajada en todos los lotes. En uno de los lotes de otoño y en los dos de primavera no se pudo detectar crecimiento en este medio a los 7 y 30 días de la maduración, respectivamente.

CONCLUSIONES

Los recuentos de la flora aerobia mesófila total tuvieron una evolución similar en los lotes de otoño y de primavera. Los recuentos en M17 y en MSE evolucionaron de modo más paulatino en los lotes del otoño, siendo más irregular en los de primavera. En Rogosa los recuentos en los lotes de otoño fueron, por lo general de 1 a 2 unidades logarítmicas más bajos que los de primavera. Los recuentos en KAA y VRBGA difirieron considerablemente dependiendo de los lotes y la época del año.

Comunicación a Congreso II

Identificación de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso



XIX CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

Santiago de Compostela (España)

21 - 25 Septiembre de 2003

Organizado por

Sociedad Española de Microbiología
Universidade de Santiago de Compostela
Universidade da Coruña
Universidade de Vigo
Fundación Ramón Areces

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO DE GENESTOSO

El queso de Genestoso se elabora de modo artesanal en Genestoso, localidad

situada al N.O. de Asturias, en el concejo de Cangas del Narcea. Este queso se elaboraba originalmente a partir de leche de cabra o mezcla de leche de cabra, vaca

y oveja. En la actualidad se emplea leche de vaca de la raza Asturiana de los Valles,

la cual se caracteriza por su gran riqueza en proteína y materia grasa. Se trata de un

queso de coagulación predominantemente láctica, con un período de maduración

que no suele superar los 30 días.

El objetivo de este trabajo fue identificar a nivel de género la población de bacterias

lácticas aisladas del queso de Genestoso, elaborado por procedimientos artesanales.

Para la realización de este estudio artesanos de la zona elaboraron cuatro partidas de

queso de Genestoso, dos en primavera-verano y otras dos en otoño-invierno. En

cada lote se tomaron muestras de leche, cuajada, y queso de 7, 15, 30, 45 y 60 días

de maduración, reuniendo un total de 28 muestras.

Los medios de recuento y aislamiento de la flora láctica fueron agar MSE, agar M17

y agar ROGOSA. En cada medio se aislaron 10 cepas por lote y punto de muestreo.

Para la adscripción a género de las cepas aisladas se realizaron las siguientes

pruebas: Gram y morfología, catalasa, producción de CO₂ a partir de la glucosa,

desaminación de la arginina, crecimiento a 10°C y a 45°C, crecimiento en MRS con

un 6,5% de NaCl y fermentación de diversos carbohidratos.

El 42,86% de las cepas aisladas en agar M17 y el 37,86% de las cepas aisladas en

agar MSE fueron adscritas al género *Lactococcus*. El 83,57% de las cepas aisladas en

en agar Rogosa, el 6,42% de las aisladas en agar M17 y el 10% de las aisladas en

agar MSE fueron adscritas al género *Lactobacillus*, mostrando el agar Rogosa

elevada selectividad para el aislamiento de lactobacilos. El 26,43% de las cepas

aisladas en agar MSE, el 10,71% de las aisladas en agar M17 y el 8,57% de las

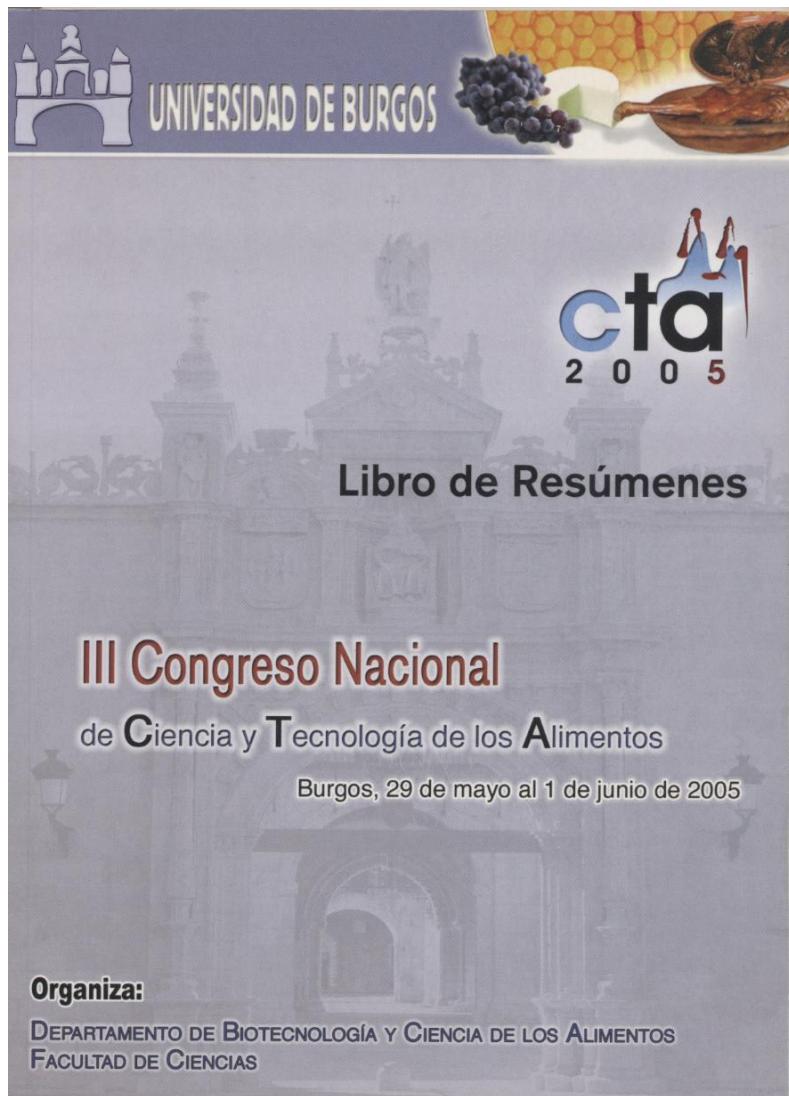
aisladas en agar ROGOSA fueron adscritas al género *Leuconostoc*. Por último, se

consideraron *Enterococcus* el 25,71% de las cepas aisladas en agar MSE y el

29,29% de las aisladas en agar M17.

Comunicación a Congreso III

Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias lácticas aisladas del queso
de Genestoso durante su maduración



COMUNICACIONES

MIC-P-12 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO DE GENESTOSO DURANTE SU MADURACIÓN

González Arias, L.; Arenas, R.; Sacristán, N.; González Prieto, J.; Fresno, J.M. y Tornadijo, M.E.

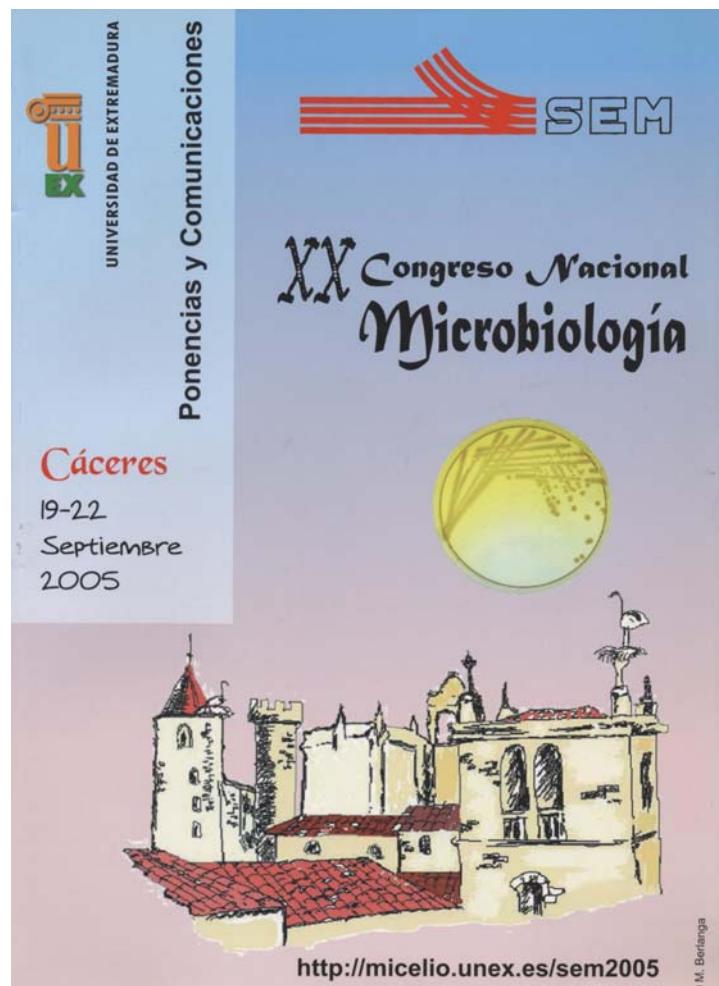
Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad antimicrobiana de 127 cepas aisladas en agar Rogosa durante la elaboración y maduración del queso de Genestoso, frente a las cepas de referencia: *Lactobacillus plantarum* (CECT 748), *Listeria monocytogenes* (CECT 4031), *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011), *Enterococcus faecalis* (CECT 481) y *Staphylococcus aureus* (CECT 240). *Lactobacillus plantarum* (CECT 748) y *Enterococcus faecalis* (CECT 481) fueron cultivadas en caldo MRS (Oxoid) a 30°C durante 24 h. *Listeria monocytogenes* (CECT 4031) fue cultivada en Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) con 0.6% Yeast Extract supplement (TSBYE, Oxoid) a 30°C durante 24 h. *Staphylococcus aureus* (CECT 240) en TSB y *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011) en Tyrobutyricum Broth Base (Oxoid), ambas cepas incubadas a 37°C durante 24 h. La actividad antimicrobiana de las cepas se determinó mediante el "método de siembra de gota en superficie" y el "método de difusión en placa". Todas las cepas ensayadas inhibieron a las cepas de referencia *Lactobacillus plantarum* (CECT 748), *Listeria monocytogenes* (CECT 4031), *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011), *Enterococcus faecalis* (CECT 481) y *Staphylococcus aureus* (CECT 240) cuando se ensayó el método de siembra de gota en superficie, excepto 15 cepas, 8 pertenecientes al género *Leuconostoc* y 7 al género *Lactobacillus*, que no inhibieron a *Lactobacillus plantarum* CECT 748. Ninguna de las cepas ensayadas fue activa frente a *Lactobacillus plantarum* (CECT 1539), *Listeria monocytogenes* (CECT 4031), *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011) y *Staphylococcus aureus* (CECT 240), cuando se empleó el método de difusión en placa, después de neutralizar y tratar el extracto con catalasa para excluir la acción debida a los ácidos orgánicos y al peróxido de hidrógeno. Sólo 6 cepas, 3 leuconostocs y 3 lactobacilos homofermentativos, continuaron mostrando actividad antimicrobiana y únicamente frente a la cepa de referencia *Enterococcus faecalis* (CECT 481). Por consiguiente, el efecto inhibitorio que muestran estas 6 cepas podría deberse a la presencia de bacteriocinas o metabolitos similares a las bacteriocinas.

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad de León (Proyecto ULE2003-19, Modalidad 2)

Comunicación a Congreso IV

Bacterias lácticas (lactococos) aisladas del queso de Genestoso durante su maduración:
actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia





A - 158

Potencial del plásmido criptico pRS4 de *Pediococcus pentosaceus* como vector de clonación de bacterias lácticas

Alegre, M.T.^a, Rodríguez, M.C.^b y Mesas, J.M.^c

^aDepartamento de Microbiología y Parasitología, ^bDepartamento de Fisiología Vegetal, ^cDepartamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología (Tecnología de Alimentos). Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, 27002-Lugo. E-mail: mtalegre@lugo.usc.es

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son útiles para la industria alimentaria por su contribución a las propiedades organolépticas de alimentos fermentados y por su capacidad de producir bacteriocinas [1]. Los esfuerzos encaminados a aumentar la disponibilidad de vehículos de clonación plasmídicos para las BAL, suponen un incremento en las posibilidades de manipulación genética de las mismas. Los plásmidos pRS4C1, pRS4C2 y pRS4C3 [2, 3], construidos con pRS4, pUC19 y el gen de resistencia a cloranfenicol procedente de pLP825, se introdujeron por electroporación en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* en donde se mantienen establemente lo que, hasta el presente [1], convierte a pRS4 en el primer plásmido de *P. pentosaceus*, replicativo por círculo rodante, que ha sido empleado como vector de clonación en BAL. Los infructuosos intentos de electrotransformación de *Enterococcus faecalis* con los derivados de pRS4 bajo las mismas condiciones en las que otros plásmidos de Gram-positivas (pCU1 y pBT2 [2]) transforman y se mantienen de forma estable en *E. faecalis*, sugieren que pRS4 funciona selectivamente en algunas

especies de BAL concretamente en el super-cluster de los Lactobacilos pero no en todas las BAL. Estos resultados parecen indicar que las construcciones derivadas de pRS4 podrían servir como vehículos de clonación selectivos para determinadas BAL alimentarias sin riesgo de transferencia horizontal a otras bacterias como *E. faecalis*, que es considerada patógena o cuando menos indeseable y que potencialmente puede estar presente en algunos productos alimenticios.

Los autores agradecen a La XUNTA de Galicia (PGIDIT02BTF29101) la financiación del presente trabajo.

[1] Shareck, J., Choi, Y., Lee, B. and Miguez, C.B. (2004) Cloning vectors based in cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology. Crit. Rev. Biotechnol. 24: 155-208.

[2] Alegré, M.T., Rodríguez, M.C. and Mesas, J.M. (2004) Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with *in vitro* modified plasmid DNA. FEMS Microbiol. Lett. 241, 73-77.

[3] Alegré, M.T., Rodríguez, M.C. and Mesas, J.M. (2005) Nucleotide sequence, structural organization and host range of pRS4, a small cryptic *Pediococcus pentosaceus* plasmid that contains two cassettes commonly found in other lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. (Enviado).

A - 163

Bacterias lácticas (lactococos) aisladas del queso de Genestoso durante su maduración: actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia

González Arias, L., Arenas, R., Sacristán, N., González Prieto, J., Fresno, J.M. y Tomadijo, M.E.
Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León, 24071-León. E-mail: dhtmet@unileon.es

El queso de Genestoso recibe su nombre del municipio en el que se elabora, perteneciente al concejo de Cangas de Narcea, localizado en el Principado de Asturias. Su elaboración se lleva a cabo de forma exclusivamente artesanal a partir de leche cruda y la producción es muy limitada. Uno de los principales problemas que plantea la distribución de este queso es la ausencia de garantías de calidad higiénica y la falta de homogeneidad. Estos problemas podrían paliarse pasteurizando la leche y adicionando fermentos integrados por bacterias lácticas con aptitud tecnológica demostrada y con capacidad para producir bacteriocinas.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la actividad antimicrobiana de las cepas de bacterias lácticas aisladas en agar MSE durante la elaboración y maduración del queso de Genestoso frente a 5 cepas de referencia, algunas de las cuales tienen carácter patógeno o pueden actuar como agentes alterantes de los alimentos.

Durante la elaboración y maduración el queso de Genestoso se aislaron en agar MSE un total de 140 cepas, de las cuales 138 fueron identificadas como bacterias lácticas. Se comprobó la actividad antimicrobiana de 133 cepas de bacterias lácticas (5 cepas no crecieron en cultivos sucesivos). Las cepas indicadoras empleadas para ensayar la actividad antimicrobiana fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT) (Universidad de

Valencia): *Listeria monocytogenes* (CECT 4031), *Staphylococcus aureus* (CECT 240), *Enterococcus faecalis* (CECT 481) y *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011). Además, se comprobó la actividad inhibidora frente a una cepa de referencia *Lactobacillus plantarum* (CECT 748).

Para detectar la actividad antimicrobiana de las cepas se empleó el "método de siembra de gota en superficie" y el "método de difusión en placa" para detectar las cepas productoras de bacteriocinas, tras obtener por centrifugación el extracto libre de células que contiene la actividad antimicrobiana.

Se detectaron 6 cepas como posibles productoras de bacteriocinas, una de las cuales pertenece al género *Lactococcus* y produjo inhibición frente a *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011); las cinco restantes pertenecen al género *Enterococcus* y produjeron inhibición frente a *Clostridium tyrobutyricum* (CECT 4011), *Listeria monocytogenes* (CECT 4031), *Enterococcus faecalis* (CECT 481) y *Lactobacillus plantarum* (CECT 748).

El efecto inhibitorio que presentan estas seis cepas podría deberse a la producción de bacteriocinas o metabolitos similares a ellas. El paso siguiente será comprobar su naturaleza proteica y proceder, en su caso, a la purificación y caracterización de las bacteriocinas detectadas.

Comunicación a Congreso V

Aptitud tecnológica de cepas de bacterias lácticas con capacidad antimicrobiana,
aisladas del queso de Genestoso

LIBRO DE RESÚMENES

XV
Congreso Nacional
de Microbiología
de los Alimentos

Ourense, 11-13 de septiembre de 2006



UNIVERSIDADE DE VIGO



P-38 APTITUD TECNOLÓGICA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA, AISLADAS DEL QUESO DE GENESTOSO

N. Sacristán, L. González, R. Arenas, H. Sandoval, J. M. Fresno
y M. E. Tornadijo*

*Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 24071-
León. dhtnsv@unileon.es*

Las bacterias lácticas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de las características organolépticas de los quesos. La capacidad acidificante es probablemente la propiedad más importante de las bacterias lácticas al contribuir a la coagulación y al desarrollo de la textura de los quesos. La utilización de cultivos iniciadores, constituidos por bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales y seleccionadas en base a su aptitud tecnológica y a la capacidad de producir compuestos antimicrobianos frente a microorganismos patógenos, puede tener interés en la elaboración de quesos con leche cruda, al contribuir a la salubridad del producto y a conservar las características tradicionales de los quesos.

Se estudió la aptitud tecnológica de 24 cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso, seleccionadas por su capacidad de producir bacteriocinas. Estas cepas fueron clasificadas a nivel de género por métodos clásicos y se adscribieron a especie mediante técnicas genéticas (PCR). Se determinó la actividad acidificante de las cepas después 6, 12 y 24 h. de incubación a 30°C, así como su capacidad proteolítica y lipolítica evaluadas cualitativamente. La capacidad caseinolítica se comprobó en agar leche y la capacidad de lipólisis de la tributirina en agar tributirina. Se determinó también la actividad enzimática general mediante el sistema API ZYM.

Las 24 cepas de bacterias lácticas fueron adscritas a las siguientes especies: *Enterococcus faecalis* (5 cepas), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (13 cepas), *Leuconostoc mesenteroides* (2 cepas), *Lactobacillus paracasei* (2 cepas), *Leuconostoc paramesenteroides* (1 cepa) y *Lactobacillus plantarum* (1 cepa).

Los lactococos mostraron mayor capacidad acidificante que los lactobacilos, con valores en torno a 0,70 g. ácido láctico/100 mL⁻¹ a las 24 horas de incubación. Los enterococos mostraron una capacidad acidificante similar a la de los lactococos, así como la mayor capacidad para hidrolizar la caseína. Sin embargo, ninguna de las cepas mostró actividad lipolítica.

Ninguna de las 24 cepas mostró actividad α-fucosidasa, α-manosidasa, β-glucuronidasa ni α-galactosidasa. Solamente algunas cepas mostraron actividad fosfatasa alcalina, α-quimotripsina, α-glucosidasa, β-glucosidasa y N-acetyl-β-glucosaminidasa. Las dos cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y una cepa de *Lactococcus* presentaron actividad lipasa con valores bajos. Para la actividad esterase se presentaron valores entre 10 y 20 nmol de sustrato hidrolizado, en las cepas de lactobacilos, tres leuconostocs, dos enterococos y dos lactococos. La actividad β-glucosidasa alcanzó valores ≥ 40 nmol para las cuatro cepas que la mostraron. Las actividades leu-arylamidasa, fosfatasa ácida y naftol-fosfohidrolasa se detectaron para todas las cepas ensayadas, con valores que oscilaron entre 5 y 40 o más nmol de sustrato hidrolizado.

Estos resultados junto con los que se deriven de posteriores estudios que tengan como objetivo determinar la actividad enzimática endocelular de las cepas, permitirá seleccionar aquellas con mejores aptitudes tecnológicas para su uso como cultivo iniciador, favoreciendo así la industrialización del queso de Genestoso.

Comunicación a Congreso VI

Estudio de la actividad proteolítica de *Geotrichum candidum* y bacterias lácticas aisladas
de quesos artesanales





Estudio de la actividad proteolítica de *Geotrichum candidum* y bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales

N. Sacristán*, L. González, H. Sandoval, J. M. Fresno y M.E. Tornadijo
Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León

La reacción de los grupos α -amino liberados por la hidrólisis de la caseína con el O-phthaldialdehído y el β -mercaptoetanol da lugar a complejos que absorben fuertemente a 340 nm. Este test de derivatización nos permite conocer de una forma cuantitativa la actividad proteolítica de microorganismos aislados a partir de quesos artesanales. Dicha capacidad tiene interés tecnológico en la fabricación de quesos.

El objetivo de este estudio fue cuantificar la actividad proteolítica de cepas de bacterias lácticas y de *Geotrichum candidum* aisladas durante la elaboración y maduración de dos quesos artesanales.

Para llevar a cabo este estudio se eligieron: 24 cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso seleccionadas previamente en base a su actividad antimicrobiana frente a patógenos conocidos y microorganismos alterantes de la calidad del producto final y 41 cepas pertenecientes a la especie *Geotrichum candidum* aisladas del queso de Armada.

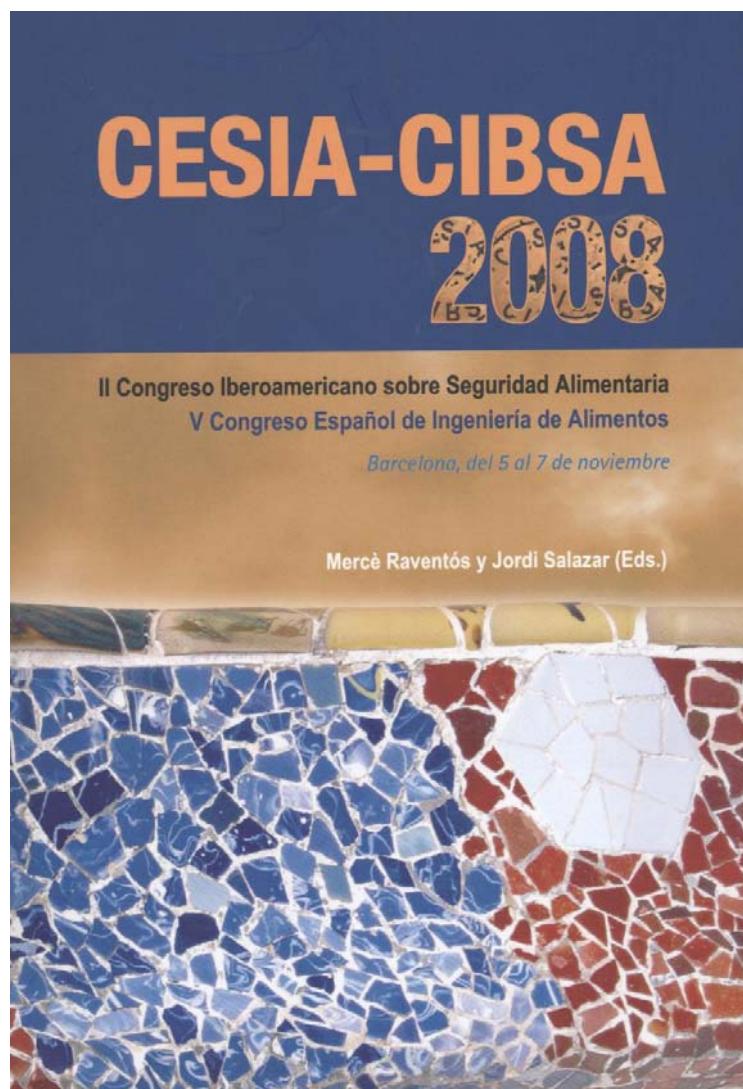
Las cepas de bacterias lácticas fueron incubadas en leche desnatada en polvo, reconstituida al 10%, durante un período de 24 h a 30°C. Las cepas de *Geotrichum candidum* fueron incubadas en el mismo medio durante 48 h a 25 °C. Tras la incubación se efectuó el test de derivatización del O-phthaldialdehído. Los resultados fueron calculados en base a una curva de calibración con diferentes diluciones de glicina en agua destilada y expresados en mM de glicina por L de leche.

De las 24 cepas de bacterias lácticas sometidas a estudio, las que han mostrado una mayor capacidad proteolítica son dos pertenecientes al género *Enterococcus*. Las tres cepas de *Lactobacillus* sobre las que se realizó el test mostraron unos valores de proteolisis medios similares a los mostrados por las cepas de lactococos, si bien en éstas fueron ligeramente superiores. De las tres cepas de *Leuconostoc* sometidas al test, dos mostraron los valores más bajos de capacidad proteolítica.

Diez cepas de *Geotrichum candidum* mostraron actividad proteolítica. Los valores obtenidos oscilaron entre 1.209 y 4.685 mM/L, superando la mayoría de las cepas la concentración de 3 mM/L. Este comportamiento homogéneo en cuanto a la actividad proteolítica parece indicar una cercanía entre cepas basárdonos en lo apuntado por Boutrou (2004 y 2005) en cuanto a que la actividad enzimática de *Geotrichum candidum* depende fundamentalmente del tipo de cepa y también del tipo de queso a partir del cual han sido aisladas las cepas.

Comunicación a Congreso VII

Estudio de la aptitud tecnológica de cepas de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos tradicionales como criterio de selección para uso comercial en starters



II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria
V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos
Barcelona, 5 a 7 de Noviembre de 2008
© CIMNE, España 2008

**ESTUDIO DE LA APTITUD TECNOLÓGICA DE CEPAS DE
BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS
TRADICIONALES COMO CRITERIO DE SELECCIÓN PARA USO
COMERCIAL EN "STARTERS"**

Leticia González, Noelia Sacristán* y María Eugenia Tornadijo

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de León
Campus de Vegaízana s/n 24071 LEÓN
e-mail: nsacv@unileon.es

Palabras clave: Bacterias lácticas, aptitud tecnológica, "starters".

Resumen. Se estudió la aptitud tecnológica de veinticuatro bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales y seleccionadas en base a su capacidad para producir compuestos antimicrobianos frente a microorganismos patógenos, por su interés en la elaboración de quesos con leche cruda, al contribuir a la salubridad del producto y a conservar las características tradicionales de los quesos.

Para determinar la actividad aminopeptidasa se utilizaron como sustratos las paranitroanilidas de los L-aminoácidos: alanina, leucina, lisina y prolina, y se siguió un método espectrofotométrico. La actividad carboxipeptidasa se determinó sobre los productos de la reacción de hidrólisis del aminoácido aromático N-Carbobenzoyloxy-L-Leucina que son detectados por espectrofotometría.

1. INTRODUCCIÓN

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 de quesos a nivel industrial. La pasterización de 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 pasterizada 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* ssp. *lactis*, *Lactococcus*

Leticia González, Noelia Sacristán y María Eugenia Tornadijo

lactis ssp. *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 "non starter" 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.

Se investiga por lo tanto la posibilidad de emplear bacterias lácticas aisladas de quesos tradicionales como cultivos iniciadores autóctonos o "starters" autóctonos en la elaboración industrial de quesos tradicionales. Estos cultivos iniciadores autóctonos contarian con la ventaja respecto a los comerciales de contribuir a la maduración aportando diversidad a los 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 cepas en función de su capacidad acidificante, proteolítica y lipolítica y también de su capacidad antimicrobiana frente a posibles microorganismos patógenos o alterantes de los quesos.

El trabajo que nos ocupa se planteó con la finalidad de estudiar las actividades aminopeptidasa y carboxipeptidasa como parte del estudio de aptitud tecnológica de las bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales que puedan ser utilizadas como cultivos iniciadores en la fabricación industrial de variedades tradicionales de quesos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Las pruebas de aptitud tecnológica se llevaron a cabo empleando extractos libres de células preparados a partir de 24 cepas de bacterias lácticas incubadas en 25 mL de caldo MRS inoculado al 1% durante 16-24 horas a la temperatura de 30°C, considerando que en ese tiempo han alcanzado la fase estacionaria. Dichas cepas habían sido aisladas con anterioridad de un queso artesanal y seleccionadas en función de su capacidad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y cepas de referencia. Después de dos lavados con tampón tris-HCl 50 mM se resuspendieron los sedimentos con 20 mL de solución de lisozima (30 mg/mL) en el mismo tampón y se incubaron durante una hora a 37°C para conseguir la lisis celular.

2.1. Actividad aminopeptidasa

Para determinar la actividad aminopeptidasa se siguió el método empleado por Requena [1] usando como sustratos las paranitroanilidas de los L-aminoácidos: alanina, leucina, lisina y prolina. Se midió la absorbancia a 410 nm a intervalos de un minuto durante un periodo de 15 minutos. Se expresó el resultado como unidades de actividad enzimática por mg de proteína total y por minuto. Se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce un aumento de 0,001 unidades en la absorbancia.

Leticia González, Noelia Sacristán y María Eugenia Tornadijo

2.2. Actividad carboxipeptidasa

Los productos de la reacción de hidrólisis del aminoácido aromático N-Carbobenzyloxy-L-Leucina incubado a 37° C durante 15 minutos con los extractos libres de células son detectados por espectrofotometría a 570 nm, según el método descrito por El Soda [2]. Así fue detectada la actividad carboxipeptidasa de las cepas seleccionadas. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un aumento en la absorbancia de 0,01 unidades. El resultado se expresó como unidades de actividad enzimática por mg de proteína total por minuto.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas de *Lactobacillus paracasei* mostraron en general la mayor actividad aminopeptidasa. Y también se detectó elevada actividad Leu- y Lys- aminopeptidasa para cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, Macedo [3] y Herreros [4] también detectaron alta actividad peptidasa para este tipo de cepas. La actividad aminopeptidasa en la mayoría de los extractos libres de células de las cepas de *Lactococcus* ensayadas usando los sustratos Ala-, Lys-, Pro- y Leu-p-nitroanilida (pNA) resultó con valores bajos o incluso no se detectó actividad; a excepción de cepas como GE 115 que mostró valores de actividad altos para los cuatro sustratos y GE 118, GE 2363, GE 2375, GE 2379, GE 12 y GE 13 que mostraron altos valores de actividad para alguno de los sustratos. Otros autores tampoco detectan (o en su caso es muy baja) actividad aminopeptidasa en los extractos libres de células de *Lactococcus* empleando dichos sustratos [4]. Las cepas ensayadas pertenecientes a *Enterococcus faecalis* mostraron en su mayoría valores bajos de actividad aminopeptidasa.

La actividad carboxipeptidasa es por lo general baja o ausente en las bacterias acidolácticas. Algunos autores sugieren que la actividad carboxipeptidasa es una propiedad atípica de *Lactococcus* spp. en los cultivos iniciadores comerciales [5]. La actividad carboxipeptidasa de los extractos libres de células examinados fue mayoritariamente nula o muy baja a excepción de cuatro cepas: GE 2320 y GE 2381 (*Enterococcus faecalis*) y GE 2362 y GE 2379 (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) que mostraron valores elevados, seguidas por GE 2002 y GE 2003 (*Leuconostoc mesenteroides*) con valores medios.

4. TABLAS

En las páginas siguientes se muestran las tablas que expresan los resultados obtenidos.

Leticia González, Noelia Sacristán y María Eugenia Tornadijo

Cepas	Sustrato p-NA			
	Ala p-NA	Lys p-NA	Pro p-NA	Leu p-NA
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>				
GE 11	ND	0,221	ND	0,443
GE 12	9,146	7,036	ND	ND
GE 13	17,214	9,390	14,084	ND
GE 18	2,701	1,397	1,025	ND
GE 44	ND	14,853	ND	1,061
GE 61	2,739	1,918	3,013	1,918
GE 102	2,614	4,067	2,034	3,486
GE 103	3,357	2,442	1,831	1,526
GE 115	18,287	8,534	6,400	6,400
GE 118	9,805	7,191	26,148	ND
GE 2363	ND	15,893	21,190	52,976
GE 2375	7,699	5,536	ND	ND
GE 2379	20,816	ND	15,918	4,898
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
GE 2002	2,136	6,407	ND	12,814
GE 2003	15,346	25,896	5,755	34,528
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>				
GE 2068	0,598	0,957	0,478	1,435
<i>Lactobacillus paracasei</i>				
GE 2036	13,991	91,581	3,053	143,477
GE 2071	ND	17,443	27,410	27,410
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
GE 2077	ND	ND	ND	18,074
<i>Enterococcus faecalis</i>				
GE 26	0,678	0,581	0,872	1,357
GE 35	1,235	1,347	0,786	1,179
GE 2320	15,682	18,295	ND	ND
GE 2371	17,089	ND	ND	12,592
GE 2381	2,234	ND	5,214	8,193

Tabla 1. Actividad aminopeptidasa de los extractos libres de células de las bacterias seleccionadas, expresadas como U.E./ mg proteína. min. ND: no se ha detectado actividad

Leticia González, Noelia Sacristán y María Eugenia Tornadijo

Cepas	Actividad carboxipeptidasa
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	
GE 11	ND
GE 12	4,503
GE 13	ND
GE 18	ND
GE 44	ND
GE 61	ND
GE 102	ND
GE 103	ND
GE 115	ND
GE 118	ND
GE 2363	16,952
GE 2375	ND
GE 2379	29,264
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
GE 2002	8,756
GE 2003	3,069
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	
GE 2068	ND
<i>Lactobacillus paracasei</i>	
GE 2036	1,068
GE 2071	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
GE 2077	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>	
GE 26	ND
GE 35	ND
GE 2320	37,113
GE 2371	ND
GE 2381	29,048

Tabla 2. Actividad carboxypeptidasa de los extractos libres de células de las bacterias seleccionadas, expresadas como U.E./ mg proteína. min. ND: no se ha detectado actividad

Leticia González, Noelia Sacristán y María Eugenia Tomadijo

12. CONCLUSIONES

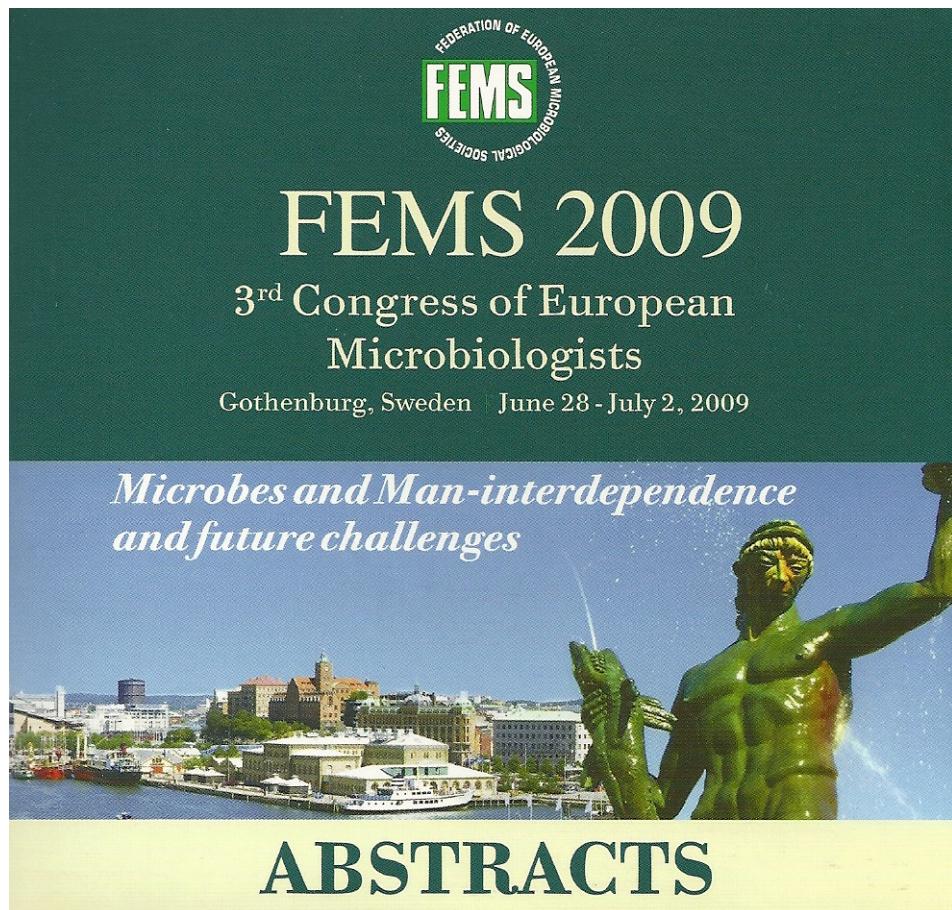
- Las cepas pertenecientes a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* presentan, para las actividades ensayadas, valores superiores a los observados por otros autores para cepas del género *Lactococcus* de "starters" comerciales, con lo cual podrían ser cepas "non starter" que aportaran características propias a los quesos artesanales en sus propiedades tecnológicas y organolépticas. Esto quedaría pendiente de confirmación mediante otros estudios enzimáticos de aptitud tecnológica.
- Algunas cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* ensayadas deberían ser objeto de otros ensayos enzimáticos que confirmaran su valor como cultivos mixtos iniciadores en la elaboración de quesos artesanales a nivel industrial.

REFERENCIAS

- [1] T. Requena, C. Peláez y P.F. Fox, "Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*", *Lebensm Unters Forsch*, Vol. 196, pp. 351-355, (1993).
- [2] M. El Soda y M.J. Desmazeaud, "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*", *Can J Microbiol*, Vol. 28(10), pp. 1181-1188, (1982).
- [3] A. C. Macedo, M. Vieira, R. Poças y F. X. Malcata, "Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra de Estrela cheese", *Int Dairy J*, Vol. 10, pp. 769-774, (2000).
- [4] M.A. Herreros, J.M. Fresno, M.J. González, M.E. Tomadijo, "Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese)", *Int Dairy J*, Vol. 13, pp. 469-479, (2003).
- [5] P.S.T., Tan, B. Poolman y W.N. Kominis, "Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*", *J Dairy Res*, Vol. 60(2), pp. 269-286, (1993).

Comunicación a Congreso VIII

Esterase activity of LAB isolated from an artisanal Spanish cheese



ESTERASE ACTIVITY OF LAB ISOLATED FROM AN ARTISANAL SPANISH CHEESE

N. Sacristán Vega, L. González, M.E. Tornadijo, J.M. Fresno

Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, Leon, Spain

Background: LAB transform the lactose present in the milk into lactic acid and small amounts of carbon dioxide, acetic acid, acetaldehyde, acetoin and diacetyl. Also they degrade proteins, fat and carbohydrate components of the curd, obtained in process of making cheeses. The use of starter cultures made up of strains of LAB coming from artisanal 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.

Objective: Determination of the esterase activity of LAB isolated from the artisanal Spanish cheese "Genestoso" in order to obtain an autochthonous starter culture.

Methods: Free-cell extracts obtained from 24 strains isolated of artisanal Spanish cheese were screening for their esterase activity by the method described by Castillo et al. (1999)¹.

Results:

1. The strains tested showed higher activity over short-chain substrates (butyrate and caprylate) than large-chain substrates (myristate and estearate).
2. The most hydrolyzed substrate was β -naphthyl-butyrate, which is the shortest-chain.
3. The β -naphthyl-estearate substrate was hydrolyzed only by three strains: two lactococci (GE11 and GE18) and one leuconostoc (GE2068); the other 21 strains tested didn't show activity against this substrate.
4. Enterococci were the strains with the highest esterase activity over all the substrates, except β -naphthyl-estearate; GE26 was the only enterococci without this capability.

Conclusions:

1. Esterase activity was higher over short-chain substrates.
2. The most hydrolyzed substrate was β -naphthyl-butyrate and β -naphthyl-estearate was the least one.
3. Enterococci strains showed the highest activity over all the substrates tested.

References: 1 Castillo et al. Isolation and characterization of an intracellular esterase from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731. *Journal of Applied Microbiology* (1999), 86 (4), 653-659.

5.-DISCUSIÓN GENERAL

5.1.- Identificación de las bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso durante su maduración

En el recuento y aislamiento de bacterias lácticas se utilizaron los de cultivo: agar M17, agar MSE y agar Rogosa. En cada lote y punto de muestreo (leche, cuajada, queso a los 7, 15, 30, 45 y 60 días de maduración) fueron aisladas cinco cepas. Un total de 140 cepas en cada medio. Si bien se incorporaron 3 cepas adicionales (1 en agar M17 y dos en agar ROGOSA) como resultado de las operaciones de purificación. De estas 423 cepas aisladas, 409 fueron identificadas y asignadas a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* o *Enterococcus*.

El 55,32% de las cepas aisladas en agar M17 y el 35% de las aisladas en agar MSE fueron adscritas al género *Lactococcus*. El 83,10% de las aisladas en agar ROGOSA, el 5,67% de las aisladas en M17 y el 14,28% de las cepas aisladas en agar MSE fueron adscritas al género *Lactobacillus*. El 26,43% de las cepas aisladas en agar MSE, el 7,80% de las aisladas en agar M17 y el 8,45% de las aisladas en agar ROGOSA fueron adscritas al género *Leuconostoc*. Por último, se adscribieron a *Enterococcus* el 22,86% de las cepas aisladas en agar MSE, el 27,66% de las aisladas en agar M17 y el 3,52% de las aisladas en agar ROGOSA. Estos resultados se muestran en la tabla I.

En base a los recuentos obtenidos, el agar M17 se comportó como un medio electivo para *Lactococcus* ya que permitió el crecimiento de otros microorganismos, que en conjunto constituyeron el 44,68% de las cepas aisladas en dicho medio. El agar MSE también se reveló como medio electivo para *Leuconostoc*, ya que más de un 70% de las cepas aisladas en este medio no fueron adscritas a este género. Por el contrario, el agar ROGOSA mostró una elevada selectividad para el aislamiento de *Lactobacillus*.

Los lactococos predominaron en leche, cuajada y durante la primera semana de maduración, momento a partir del cual fueron reemplazados por los lactobacilos. Los leuconostoc constituyeron el segundo grupo aislado en mayor proporción al término de la maduración. Nuestros resultados coincidieron con los descritos por otros autores para quesos de características similares (Alegría y col., 2009)

Tabla I.- Distribución, por medio de aislamiento, de los géneros de bacterias lácticas aisladas a partir de cuatro lotes de queso de Genestoso durante su elaboración y maduración.

	M17		MSE		ROGOSA	
	Nº de cepas	%	Nº de cepas	%	Nº de cepas	%
<i>Lactococos</i>	78	55,32	49	35	—	—
<i>Lactobacilos homofermentativos</i>	6	4,25	8	5,71	118	83,10
<i>Lactobacilos heterofermentativos.</i>	2	1,42	12	8,57	—	—
<i>Leuconostoc</i>	11	7,80	37	26,43	12	8,45
<i>Enterococos</i>	39	27,66	32	22,86	5	3,52
<i>Levaduras</i>	3	2,13	—	—	4	2,82
Cepas no identificadas	2	1,42	2	1,43	3	2,11
Cepas perdidas	5	—	7	—	8	
Total de cepas aisladas	141		140		142	

5.2.-Estudio de la actividad antimicrobiana de las cepas de bacterias lácticas aisladas durante la maduración del queso de Genestoso

La actividad antimicrobiana de las 409 cepas de bacterias lácticas fue ensayada frente a cinco cepas de referencia, pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Enterococcus faecalis* CECT 481, *Clostridium tyrobutiricum* CECT 4011 y *Staphylococcus aureus* CECT 240.

Las bacterias lácticas pueden desarrollar actividad antimicrobiana a través de diversos mecanismos (Parente y Ricciardi, 1999). De hecho, el descenso del pH debido a la producción de ácido láctico puede ser causa suficiente para inhibir el crecimiento microbiano (O'Keefe y Hill,

1999). La producción de otros ácidos orgánicos o de peróxido de hidrógeno tiene también un efecto bacteriostático, así como la producción de bacteriocinas o sustancias similares a ellas. La actividad antimicrobiana de las cepas fue ensayada mediante el test *agar spot*, que permitió observar la inhibición del crecimiento de las cepas de referencia por parte de las cepas estudiadas, y el test *agar well diffusion*, que supone la neutralización del extracto y un tratamiento con catalasa para excluir cualquier efecto debido a ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno, diferenciando así la inhibición debida a la presencia de bacteriocinas.

Con el test *agar spot* prácticamente todas las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* inhibieron a las cepas de referencia, a excepción de tres cepas que no inhibieron a *Lactobacillus plantarum* CECT 748 y una que no mostró efecto sobre *Listeria monocytogenes* CECT 4031. Después de utilizar el test *agar well diffusion* ningún lactobacilo tuvo capacidad para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Clostridium tyrobutiricum* CECT 4011 y *Staphylococcus aureus* CECT 240. Sólo tres cepas continuaron mostrando inhibición sobre *Enterococcus faecalis* CECT 481 y otra sobre *Lactobacillus plantarum* CECT 748, que podría ser atribuida a la presencia de bacteriocinas o metabolitos similares a ellas. Aunque la producción de bacteriocinas entre los lactobacilos aislados del queso de Genestoso ha sido detectada en pocas cepas, algunos autores afirman que es relativamente común en cepas de este género. Esta capacidad les permite mayor poder de colonización y aumenta su competitividad frente a otras bacterias (Garriga y col., 1993). Hay que tener en cuenta que la producción de bacteriocinas puede estar afectada por un amplio rango de factores como por ejemplo, la composición del medio, las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfatos, los agentes surfactantes, los agentes inhibitorios, el pH del medio, las condiciones de aireación y la temperatura óptima de crecimiento de las cepas. Además, para su producción generalmente se requiere un medio complejo cuyo pH no suele coincidir con el pH óptimo de la acción de la bacteriocina (Daba y col., 1993). Otros factores como la adsorción de la propia bacteriocina a la pared celular del microorganismo productor también condicionan su actividad (Bhunia y col., 1991).

Con respecto a las cepas de lactococos, todas, excepto dos, inhibieron el crecimiento de *Clostridium tyrobutiricum* CECT 4011 y *Staphylococcus aureus* CECT 240, de igual manera, todas las cepas, excepto una, inhibieron a *Enterococcus faecalis* CECT 481; y finalmente, *Listeria monocytogenes* CECT 4031 fue inhibido por la mayoría de cepas, exceptuando seis de ellas. En cambio, únicamente 24 cepas de lactococos tuvieron un efecto inhibitorio sobre *Lactobacillus plantarum* CECT 748. Cuando se procedió a la confirmación de tales resultados por el test de *agar well diffusion* sólo 13 cepas de lactococos produjeron inhibición sobre alguna de las cepas

indicadoras. La capacidad de producir sustancias inhibitorias por parte de lactococos es ampliamente referida en publicaciones científicas. De hecho algunas bacteriocinas se vienen utilizando desde hace tiempo como aditivos, tal es el caso de la nisin. Las cepas de lactococos productoras de sustancias activas frente a *Listeria monocytogenes* tienen una interesante proyección como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos (Liu y col., 2008; Dal Bello y col., 2012). Las bacteriocinas pueden además ser incorporadas en los alimentos en forma concentrada como aditivos, reduciendo así la adición de compuestos químicos y la aplicación de tratamientos tecnológicos que puedan menoscabar la calidad del producto. Además, pueden presentar efectos sinérgicos cuando se usan en combinación con otros agentes microbianos, limitando así el desarrollo de cepas resistentes (Gálvez y col., 2007; Gálvez y col., 2008)

Las cepas de leuconostoc estudiadas ejercieron efecto inhibitorio sobre todas las cepas de referencia con excepción de *Lactobacillus plantarum* CECT 748. Cuando se ensayaron con el test agar well diffusion sólo tres cepas mostraron efecto inhibitorio frente a *Enterococcus faecalis* CECT 48.

Todas las cepas de enterococos aisladas en los tres medios elegidos inhibieron a las cinco cepas de referencia. Sin embargo, sólo cinco cepas mantuvieron la acción inhibitoria cuando se neutralizó el extracto y se trató con catalasa. Dos fueron activas frente a *Clostridium tyrobutiricum* CECT 4011 y *Listeria monocytogenes* CECT 4031, otras dos inhibieron únicamente a *Clostridium tyrobutiricum* CECT 4011 y una mantuvo la actividad frente a *Listeria monocytogenes* CECT 4031.

La capacidad de los enterococos para producir bacteriocinas de amplio espectro ha sido demostrada en estudios similares (Giraffa, 1995). La caracterización de enterocinas y el estudio de su eficacia como agentes antimicrobianos frente a *Listeria monocytogenes* es objeto de numerosos trabajos encaminados a demostrar su potencial de aplicación en alimentos (Ennahar y col., 1998; Huang y col., 2013). La actividad listericida de las enterocinas abre la posibilidad de emplear cepas de *Enterococcus faecium* y/o *Enterococcus faecalis* productores de bacteriocinas como cultivos en la elaboración de quesos (Foulquié y col., 2003)

5.3.-Adscripción a nivel de especie de las cepas con actividad antimicrobiana

Se ha utilizado el criterio de actividad antimicrobiana para realizar una selección sobre las 409 cepas de bacterias lácticas identificadas a nivel de género. De la totalidad de las cepas hemos seleccionado las 24 que mostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas de referencia anteriormente citadas. Estas cepas fueron identificadas a nivel de especie por métodos genéticos.

De las 24 cepas, 13 fueron adscritas a la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Diez de ellas ya habían sido adscritas a esta especie usando el método API 50CH, mientras que dos fueron identificadas como *Enterococcus* mediante las pruebas bioquímicas tradicionales.

Dos cepas fueron identificadas como *Leuconostoc mesenteroides*, coincidiendo con la identificación bioquímica. No obstante, el método API 50 CH las identificó como *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *lactis* con una probabilidad mayor del 60%.

Una cepa fue adscrita por técnicas genéticas a la especie *Leuconostoc pseudomesenteroides* y otras dos a *Lactobacillus paracasei*, coincidiendo con los resultados obtenidos mediante el sistema API 50 CH y mediante las pruebas tradicionales.

Una cepa fue identificada como perteneciente a la especie *Lactobacillus plantarum* y cinco cepas a *Enterococcus faecalis*, empleando para la identificación tanto pruebas bioquímicas como genéticas, aunque las tiras API 50 CH las adscribieron como *Lactobacillus* con una probabilidad casi absoluta. Esto podría ser debido a que las pruebas API 50CH incluyen carbohidratos que preferentemente discriminan entre lactococos, lactobacilos y leuconostoc.

5.4.-Estudio de aptitud tecnológica de las cepas identificadas a nivel de especie

La utilización de cultivos iniciadores, constituidos por bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales y seleccionadas en base a su aptitud tecnológica y a la capacidad de producir compuestos antimicrobianos frente a la microbiota patógena, puede tener interés en la industrialización de quesos tradicionales artesanales. El empleo de cultivos autóctonos seleccionados puede garantizar no sólo la salubridad del producto sino también su originalidad y la conservación de las características tradicionales de los quesos.

5.4.1.-Actividad acidificante y actividad enzimática extracelular

Se determinó cualitativamente la actividad acidificante de las cepas de bacterias lácticas después de 6, 12 y 24 horas de incubación a 30°C.

Los lactococos mostraron en general mayor capacidad acidificante que los lactobacilos y leuconostoc, alcanzando valores de hasta 0,7-0,8 g 100 mL⁻¹ de leche a las 24 horas de incubación en algunas cepas. Las diferencias en la capacidad acidificante fueron evidentes después de las 12 horas de incubación, y al cabo de las 24 horas había aumentado significativamente. Los enterococos mostraron una capacidad acidificante similar a la de los lactococos. Las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* presentaron los valores más bajos, como era de esperar, debido a su menor capacidad para metabolizar la lactosa. Estos resultados fueron similares a los descritos por otros autores (Herreros y col., 2003; Badis y col., 2004).

La capacidad proteolítica y lipolítica de las cepas se evaluó también de forma cualitativa en cultivos de placa con medio agar leche y agar tributirina. Los enterococos mostraron la mayor capacidad para hidrolizar la caseína. Sin embargo, ninguna de las cepas mostró actividad lipolítica, evaluada a través de este método.

La actividad proteolítica extracelular se determinó de forma cuantitativa, usando el ensayo espectrofotométrico del O-phthalodialdehído (OPA) (Church y col. 1983), observándose diferencias significativas entre los distintos géneros y también entre cepas del mismo género. Algunas cepas del género *Lactococcus* mostraron mayor actividad proteolítica que los *Lactobacillus*, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Centeno y col., 1996; Herreros y col., 2003; Pérez y col., 2003). Las cepas *Lactococcus lactis* subsp *lactis* GE 61 y GE 2363 y la cepa *Leuconostoc pseudomesenteroides* GE 2068, mostraron la mayor capacidad proteinasa (≥ 5 mM Gly L⁻¹ de leche) seguidas por las cepas *Lactobacillus paracasei* GE 2071 y *Lactobacillus plantarum* 2077. *Enterococcus faecalis* GE 35 y GE 2371 exhibieron una actividad proteolítica comprendida entre 4 y 5 mM Gly L⁻¹ de leche.

Por último se realizó un screening semicuantitativo de las actividades enzimáticas de las cepas utilizando el método rápido API ZYM.

5.4.2.-Actividad enzimática de los extractos libres de células (Cell Free Extracts, CFE)

La proteólisis y la lipólisis son los fenómenos enzimáticos involucrados en el desarrollo del flavor que ocurren durante la maduración de los quesos. Las bacterias lácticas non-starter (NSLAB) poseen un amplio rango de enzimas hidrolíticas. Algunos estudios han descrito que las bacterias lácticas non-starter utilizan carbohidratos derivados de los glicomacropéptidos de la caseína y glicoproteínas derivadas de la membrana del góbulo graso. Las bacterias non-starter (NSLAB) heterofermentativas pueden metabolizar pentosas liberadas por el metabolismo de las bacterias que forman parte del cultivo iniciador (Fox y Cogan, 2004). La adición de lactobacilos a los cultivos iniciadores da lugar a un mayor contenido en ácidos grasos en los quesos fabricados con dichos cultivos, además de un incremento en la intensidad del flavor (Lane y Fox, 1996; Ur-Rehman y col., 2000).

La actividad enzimática endocelular (actividad caseinolítica, aminopeptidasa, dipeptidasa, carboxipeptidasa y esterasa) fue estudiada en los extractos libres de células, obtenidos por la lisis celular con lisozima.

Los CFE de los lactobacilos, en concreto de las cepas GE 2036, GE 2071 y GE 2077, fueron los que mostraron mayor capacidad para **hidrolizar la caseína**, por lo que es probable que puedan jugar un papel crucial en la maduración de los quesos (Broome y col., 1991). También se obtuvieron valores altos para las cepas de leuconostoc. En cambio, lactococos y enterococos mostraron, en comparación, valores más bajos excepto para GE 2320, coincidiendo con los resultados encontrados por otros autores en quesos similares (Herreros y col., 2003).

En general, la actividad **carboxipeptidasa** fue nula o muy baja en los CFE de las bacterias lácticas. Algunos autores sugieren que esta actividad es atípica en los lactococos que forman parte de los cultivos iniciadores convencionales (Tan y col., 1993). No obstante, dos cepas de enterococos (GE 2320 y GE 2381), y dos de lactococos (GE 2363 y GE 2379) mostraron niveles de actividad comparativamente altos.

Las **aminopeptidasas** son una importante herramienta en la liberación de aminoácidos que favorecen el desarrollo de sabores deseables en los quesos. Estas enzimas pueden también tener un efecto reductor del amargor durante la maduración del queso (El Soda y col., 1991). Los extractos libres de células de *Lactobacillus paracasei* GE 2036 fueron los que mostraron los mayores niveles de actividad aminopeptidasa, sobre todo cuando los sustratos fueron Lys-pNA y

Leu-pNA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos usando el método API-ZYM, en el cual las cepas de lactobacilos fueron las que mostraron los más altos valores para Leu-, Val- y Cys-arylamidasa. Los lactobacilos deficientes en aminopeptidasas han sido ensayados como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos, observándose que los quesos madurados obtenidos fueron menos elásticos y más amargos que los fabricados con cepas que presentaban mayor actividad arilamidasa (Prost y Chambra, 1994). La actividad aminopeptidasa sobre los sustratos Ala-pNA, Lys- pNA, Pro- pNA y Leu- pNA fue baja o indetectable en el resto de cepas. Este hecho ya ha sido constatado por otros investigadores (Pérez y col., 2003). No obstante, se detectó un moderado grado de actividad aminopeptidasa sobre estos mismos sustratos en la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* GE 2002 y en la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 2363, al igual que ha sido descrito por otros autores (Macedo y col., 2000; Herreros y col., 2003; Ballesteros y col., 2006; Morea y col., 2007).

Teniendo en cuenta que algunos factores como la fase de crecimiento y el medio de cultivo afectan a las actividades enzimáticas, la actividad aminopeptidasa de las bacterias lácticas estudiadas podría estar afectada por la naturaleza de la fuente de nitrógeno en el medio de crecimiento. En el medio de cultivo MRS la biosíntesis de peptidasa podría estar reprimida por la alta disponibilidad de péptidos y aminoácidos en el medio (Kenny y col., 2003).

En general, la actividad **dipeptidasa** de los CFE de las cepas fue elevada para los sustratos Leu-Leu, Tyr-Leu y Phe-Ala. Mención especial merece la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 2363 cuyo extracto mostró valores extraordinariamente elevados de esta actividad enzimática.

Las **esterasas y lipasas** incrementan la concentración de ácidos grasos libres en los quesos. Estas moléculas contribuyen a desarrollar el aroma de los quesos, sobre todo si están correctamente equilibradas con los productos de la proteólisis. Hay que tener en cuenta que la baja concentración de los mismos puede ser debida a la baja detección de los compuestos producidos en la lipólisis y al mayor tiempo requerido para su aparición a lo largo de la maduración en algunos quesos. En general, estas actividades fueron muy bajas o no detectadas para la mayoría de los CFE de las cepas de lactococos y leuconostoc, tal y como ha sido observado por otros autores (Requena y col., 1991; Menéndez y col., 2001; Herreros y col., 2003). La mayoría de los CFE mostraron mayor actividad frente a ácidos grasos de cadena corta, hecho ya constatado por Ballesteros y col. (2006) y Ghairi y col. (2008). Por último, los CFE de

algunas cepas de enterococos mostraron considerable actividad esterolítica frente a alguno de los sustratos probados con excepción de los de cadena larga.

Es bien conocido que las esterasas de las bacterias lácticas degradan preferentemente ácidos grasos de cadena corta. Parece probable que el papel de las bacterias lácticas en la hidrólisis de las grasas comienza después de que la grasa de la leche haya sido parcialmente degradada por la lipasa de la leche. En general, las enzimas lipolíticas son específicas para los ácidos grasos esterificados en posición sn-1 ó 2 de los triglicéridos. Inicialmente, los triglicéridos son hidrolizados a 1,2 y 2,3-diglicérido y posteriormente a 2-monoglicérido. Por consiguiente, el ácido butírico y otros ácidos grasos de cadena corta y media se localizan principalmente en las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos (Deeth y Touch, 2000). Nuestros resultados concuerdan con el estudio de Arenas (2007) para el queso de Genestoso, quien concluye que los ácidos grasos de cadena corta predominan durante las primeras fases de la maduración del queso, cuando las bacterias lácticas alcanzan mayores niveles de presencia en el queso.

5.5.-Estudio de la actividad enzimática probiótica de las cepas identificadas a nivel de especie

El queso constituye un vehículo adecuado para la incorporación de bacterias probióticas debido a su mayor pH, contenido en grasa y mayor consistencia sólida que otros productos lácteos (Özer y col., 2009). Además asegura una mayor supervivencia de estos microorganismos, no sólo en el producto en sí sino también a través del tránsito gastrointestinal humano (Bergamini y col., 2009).

Ninguna de las 24 cepas estudiadas mostró actividad α -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa. En el colon, la β -glucuronidasa hidroliza los conjugados producidos en el hígado a partir de compuestos tóxicos y carcinogénicos, incrementando la probabilidad de inducción de tumores. De hecho, dicha actividad enzimática ha sido incluida como marcador bioquímico en estrategias alternativas de estudios del cáncer. Por ello, las cepas de bacterias lácticas sin esta actividad enzimática podrían ser consideradas microbiota probiótica para humanos (Gil y Rowland, 2002).

Los lactobacilos mostraron alta actividad β -galactosidasa. Las actividades α -glucosidasa, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa alcanzaron valores entre 0 y 40 nmol de sustrato hidrolizado. Sólo una cepa de *Leuconostoc* mostró una actividad considerable de β -galactosidasa

(≥ 40 nmol de sustrato hidrolizado). Esta enzima es la herramienta principal con la que los lactobacilos transforman la lactosa en ácido láctico. Dicha enzima está incluida en los *Probiotic Active Substances*, concepto introducido por Naidu y col. (1999), para nombrar complejos celulares de bacterias lácticas que tengan capacidad para interactuar con la mucosa del tracto digestivo, modulando de forma beneficiosa el sistema inmune, independientemente de la viabilidad de las propias bacterias lácticas. La β -galactosidasa contribuye a la acidificación de los productos lácteos y, por consiguiente, ejerce una selección microbiana y un efecto protector frente al desarrollo de microorganismos patógenos. Además, también reduce la intolerancia a la lactosa encontrada en ciertas poblaciones humanas. Los galactooligosacáridos producidos por la acción de la β -galactosidasa sobre la lactosa pueden estimular el crecimiento de bifidobacterias en el intestino humano y favorecer así su colonización (Zárate y López-Leiva, 1990) contribuyendo al control de bacterias patógenas en el intestino (Mitsouka, 1990; Sako y col., 1999).

La α -glucosidasa participa en la hidrólisis de los $\alpha(1-4)$ glucanos que no pueden ser degradados por las glucosidasas humanas. Por lo tanto lactobacilos que muestren esta capacidad pueden ser interesantes como probióticos. Además, α -glucosidasa cataliza el paso final en la digestión de los carbohidratos y, por lo tanto, su ausencia retarda la asimilación de los carbohidratos de la dieta siendo usada para el tratamiento de pacientes diabéticos y obesos (Broadhurst y col., 2000; Cheng y Fantus, 2005). La ausencia de esta actividad en lactococos ya fue comprobada por otros autores y puede ser debida al hecho de que el enzima predominante en este género es la fosfo- β -galactohidrolasa (Marshall y Law, 1984). Entre los enterococos tampoco fue detectada actividad α -glucosidasa.

La falta de actividad α -quimotripsina y tripsina podrían ser consideradas como propiedades probióticas puesto que estas proteasas pueden estar involucradas en la patogenicidad de algunos microorganismos (Tanner y col., 1985). Algunos lactococos y sólo un leuconostoc, un lactobacilo y un enterococo mostraron una débil actividad tripsinasa. La actividad α -quimotripsina no fue detectada en lactococos y leuconostoc y pudo ser detectada en muy bajos niveles para lactobacilos y enterococos.

Otras actividades enzimáticas ensayadas fueron las fosfatases ácida y alcalina. Esta última fue muy baja o no detectada para todas las cepas lo cual coincide con otros estudios previos (Menéndez y col., 2001; Herreros y col., 2003). Por el contrario la fosfatasa ácida alcanzó valores en torno a 30-40 nmol de sustrato hidrolizado para algunas cepas de lactococos y

lactobacilos. Cepas de enterococos y leuconostoc también mostraron actividad fosfatasa ácida pero más baja. Estas enzimas son esenciales en la hidrólisis de los fosfolípidos.

Completado el estudio de la actividad enzimática de las 24 cepas inicialmente elegidas por su actividad antimicrobiana, 5 cepas fueron seleccionadas en virtud de su aptitud tecnológica: tres *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis*(GE 11, GE 12 y GE 2363), un *Lactobacillus paracasei* (GE 2036) y un *Enterococcus faecalis* (GE 2320). Estas cepas fueron sometidas a pruebas de hidrofobicidad, detección de la producción de aminas biógenas y pruebas de incompatibilidad de crecimiento.

5.6.-Estudio de las propiedades hidrofóbicas de las cepas identificadas a nivel de especie, seleccionadas por su aptitud tecnológica

Es bien sabido que la habilidad de las bacterias para adherirse al epitelio intestinal juega un papel importante en la colonización del tracto gastrointestinal, previniendo la eliminación de las bacterias a causa de los movimientos peristálticos y dotándolas de una ventaja competitiva en ese ecosistema (Johanson y col., 1993; Del Re y col., 2000).

Las características físico-químicas de la superficie celular tales como la hidrofobicidad pueden afectar tanto a la autoagregación celular como a la adhesión de las bacterias a diferentes superficies (Pérez y col., 1998; Del Re y col., 2000). La autoagregación celular de bacterias de cepas probióticas parece ser necesaria para su adhesión a las células epiteliales del intestino (Boris y col., 1997; Reid y col., 1998).

Los resultados de las pruebas de hidrofobicidad para todas las cepas ensayadas muestran índices mayores del 70%, excepto para *Enterococcus faecalis* (GE 2320) que alcanzó el 69%. Los índices de hidrofobicidad justifican las fuerzas atractivas que tienen lugar en los procesos de adherencia y autoaglutinación.

Nuestros resultados sugieren que estas cepas pueden tener buen potencial de adhesión a células epiteliales del intestino humano, reforzando la idea de su carácter probiótico y concordando con los resultados de otros autores en estudios de hidrofobicidad de cepas de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos fermentados (Wadstrom y col., 1987; Kos y col., 2003; Dewan y Tamang, 2007). De hecho, la adherencia es uno de los criterios más importantes para la selección de bacterias probióticas (Shah, 2001).

5.7.-Estudio de la capacidad de producción de aminas biógenas de las cepas identificadas a nivel de especie, seleccionadas por su aptitud tecnológica

Las principales aminas biógenas estudiadas en queso son tiramina e histamina junto con putrescina y cadaverina, que suelen aparecer después de los treinta días de maduración. Los niveles de aminas biógenas varían notablemente no sólo entre variedades de queso sino también dentro de cada variedad (Stratton y col., 1991; Silla, 1996).

Las bacterias lácticas integrantes de un cultivo iniciador deben carecer de la capacidad de producir aminas biógenas (Dewan y Tamang, 2007). Sin embargo, la presencia de estos compuestos es inevitable en alimentos fermentados (Masturcelli y col., 2005). La formación de aminas biógenas es un mecanismo que poseen las bacterias para protegerse frente a ambientes ácidos (Arena y Manca de Nadra, 2001). Las aminas biógenas se generan principalmente por descarboxilación del correspondiente aminoácido gracias a enzimas específicas que posee la microbiota del producto, por lo que están asociadas con aspectos higiénicos y tecnológicos (Curiel y col., 2011). Muchas bacterias lácticas poseen la capacidad de producir aminas. En concreto la actividad tirosina e histidina descarboxilasa han sido detectadas en lactobacilos, enterococos, lactococos y leuconostoc (Maijala y col., 1993; Silla, 1996; Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Fernández García y Núñez, 2000; Suzzi y Gardini, 2003). En consecuencia, la mayoría de los productos en los cuales crecen las bacterias lácticas pueden contener cantidades considerables de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina. La producción está relacionada principalmente con la actividad proteolítica de los microorganismos integrantes de la microbiota láctica non-starter (NSLAB) (Maijala y Eerola, 1993; Bover-Cid y col., 2001; Suzzi y Gradini., 2003). De hecho, la presencia de microrganismos con alta actividad descarboxilasa se considera el principal factor relacionado con el contenido de aminas biógenas en queso (Silla 1996; Arena y Manca de Nadra, 2001; Galgano y col., 2001; Masturcelli y col., 2005).

El test cualitativo de producción de aminas biógenas por las cepas de bacterias lácticas seleccionadas fue positivo respecto a putrescina, cadaverina y tiramina en todas ellas. Se detectó también producción de histamina en tres de las cinco cepas estudiadas. Antes de valorar estos resultados es conveniente tener en cuenta que algunos autores advierten de numerosos falsos negativos que ocurren quizá debido a un crecimiento insuficiente de las cepas o a la

capacidad acidificante de las bacterias lácticas. Por otro lado, otros autores afirman haber encontrado falsos positivos debido a la producción de otras sustancias capaces de alcalinizar el medio (Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Bover-Cid y col., 2001; Marcabal y col., 2006; Curiel y col., 2011). Por todo ello la producción de aminas biógenas, evaluada cualitativamente, fue confirmada por ensayos de cromatografía líquida de alta resolución.

Las cepas fueron posteriormente clasificadas según Özogul y Özogul (2007), dependiendo de su capacidad de producción, en las tres categorías siguientes: elevada capacidad de producción de aminas ($100\text{-}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), intermedia capacidad de producción de aminas ($10\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y baja capacidad de producción de aminas ($< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En general, las cepas evaluadas acumularon poca cantidad de histamina a partir de histidina. Sin embargo, la cepa GE 2320 exhibió una buena capacidad de formación de histamina pero a partir de otros aminoácidos. Esto es posible porque el medio utilizado contiene peptona y extracto de carne (Özogul y Özogul, 2007). Además, hay que tener en cuenta que las diferencias en la concentración de metabolitos puede deberse al estado de crecimiento de los cultivos.

Todas las cepas mostraron intermedia capacidad de producción de putrescina a partir de ornitina. Así mismo, fueron bajas productoras de cadaverina en el medio enriquecido con lisina.

Las cepas *Lactobacillus paracasei* GE 2036, *Enterococcus faecalis* GE 2320 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 2363 mostraron una producción de tiramina intermedia con valores en torno a $80\text{-}90 \mu\text{g mL}^{-1}$. De hecho, histamina y tiramina son las aminas biógenas más abundantes encontradas en quesos de oveja y vaca (Novella y col., 2003; Masturcelli y col., 2005).

En la valoración de estos resultados hay que tener en cuenta que la producción de aminas biógenas en el queso está condicionada por varios factores que incluyen la tecnología de elaboración, sus condiciones de maduración y la evolución de las especies microbianas y de los parámetro físico-químicos de los quesos (Ordoñez y col., 1997; Komprda y col., 2007; Linares y col., 2012).

5.8.-Estudio de la incompatibilidad entre las cepas identificadas a nivel de especie, seleccionadas por su aptitud tecnológica

Como se comentó anteriormente las bacterias lácticas son capaces de producir sustancias inhibitorias (bacteriocinas o sustancias similares a ellas) del crecimiento de otras

bacterias, siendo imprescindible conocer la incompatibilidad entre las cinco cepas seleccionadas para formar parte del cultivo iniciador.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* GE 12 y GE 2363 fueron compatibles entre ellas y con el resto de cepas. Sin embargo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 11 inhibió el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 2363 y de *Enterococcus faecalis* GE 2320. *Lactobacillus paracasei* GE 2036 sólo fue compatible con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 12 y *Enterococcus faecalis* GE 2320 inhibió el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 11.

Por consiguiente, los cultivos mixtos que se propongan deben incluir cepas compatibles entre sí.

5.9.-Bibliografía

- Alegría, A.; Álvarez-Martín P.; Sacristán, N; Fernández E.; Delgado, S.; Mayo, B.** 2009 Diversity and evolution of the microbial population during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 44-51.
- Arena, M. E., Manca de Nadra, M. C.** 2001 Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 158-162.
- Arenas, R.** 2007 Caracterización del queso Genestoso durante su maduración: estudio microbiológico, físico-químico, bioquímico y reológico. Tesis Doctoral Universidad de León. España.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E., Kihal, M.** 2004 Identification and technology properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21, 579-588.
- 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.
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Palma, S. B., Sabbag, N. G., Zalacar, C.A.** 2009. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal* 19, 467-475.
- Bhunia, A.K., Jonson, M.C., Ray, B., Kalchayanand, N.** 1991 Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 25-30.
- Boris, S., Suárez, J. L., Barbés, C.** 1997 Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *Journal of Applied Microbiology* 83, 413-420.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H.** 1999 Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C.** 2001 Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology* 66, 185-189.
- Broadhurst, C. L., Polansky, M. M., Anderson, R. A.** 2000 Safety assessment of dairy micororganisms: The *Lactobacillus* genus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 849-852.
- 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.

Centeno, J.A., Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L. 1996 Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology* 33, 307-313.

Cheng, A. I., Fantus, I. G. 2005 Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal* 55, 407-410.

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, 1219-1227.

Curiel, J.A., Ruiz-Capillas, C., de las Rivas, B., Carrascosa, A.V., Jiménez-Colmenero F., Muñoz R. 2011 Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Science* 88, 368-373.

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E. 1993 Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocine 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 166-173.

Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P.D., Hill, C. 2012 Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153, 58-65.

Deeth, H.C., Touch, V. 2000 Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology* 55, 153-168.

Del Re, B., Sgorbat,i B., Miglioli, M., Palenzona, D. 2000 Adhesion, autoaggregation and hydrofobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31, 438-442.

Dewan, S., Tamang, J. P. 2007 Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. *Antonie van Leeuwenhoek* 92, 343-352.

El Soda, M., Macedo, A., Olson, N. 1991 Aminopeptidase and dipeptydil aminopeptidase activities of several cheese related microrganisms. *Milchwissenschaft* 46, 213-226.

Ennahar, S., Assobhei, O., Hasselmann, C. 1998 Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *International Journal of Food Microbiology* 48, 97-111.

Fernández-García, E., Tomillo, J., Núñez, M. 2000 Formation of biogernic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinases and different leves of starter culture. *Journal of Food Protection* 63, 1551-1555.

- Foulquié Moreno, M.R., Rea, M.C., Cogan, L., De Vuyst, L.** 2003 Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 81, 73-84.
- Fox, P.F., Cogan, T.M.** 2004 Factors that affect the quality of cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* 1, 583-608.
- Galgano, F., Suzzi, G., Favati, F., Cruso, M., Masturcelli, M., Gardini, F., Salzano, G.** 2001 Biogenic amines during ripening in "Semicotto Caprino" Cheese: role of enterococci. *International Journal of Food Science and Technology* 36, 153-160.
- Gálvez, A., Abrionel, H., López, R.L., Ben Omar, N.** 2007 Bacteriocin-based strategies for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51-70.
- Gálvez, A., López, R.L., Abrionel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N.** 2008 Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 28, 125-152.
- Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T. Monfort, J.M.** 1993 Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 14-148.
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J. H., Manai, M.** 2008 Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control* 19, 162-169.
- Gill, C., Rowland, I.** 2002 Diet and cancer: assessing the risk. *British Journal of Nutrition* 88, 73-87.
- Giraffa, G.** 1995 Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology. *Food Microbiology* 12, 291-299.
- 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 goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, 13, 469-479.
- Huang, E., Zhang, L., Chung, Y.K., Zheng, Z., Yousef, A.E.** 2013 Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. *Biomed Research International* <http://dx.doi.org/101155/2013/206917>
- Johansson, M. L., Molin, B., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrné, S., Bengmark, S.** 1993 Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effects on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 15-20.
- Kenny, O., FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K.** 2003. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal* 13, 509-516.

Komprda, T., Smělá, D., Novická, K., Kalhotka, L., Šustová, K., Pechová, P. 2007 Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry* 102, 129-137.

Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. 2003 Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94, 981-987.

Lane, C.N., Fox, P.F. 1996 Contribution of starter and adjunct Lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal* 6, 715-728.

Linares, D.M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M.C., Álvarez, M.A. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Food Microbiology* 3, 1-10.

Liu, L., O'Conner, P., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2008. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1059-1066.

Macedo, A., Vieira, M., Poças, R., Malcata, F.X. 2000 Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *International of Dairy Journal* 10, 769-774.

Maijala, R., Eerola, S. 1993 Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science* 35, 387-395.

Maijala, R., Eerola, S., Aho, M., Him, J. 1993 The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection* 56, 125-129.

Marcabal, A., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C., Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V. 2006 Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection* 69, 397-404.

Marshall, J. M., Law, B. A. 1984 The physiology and growth of dairy lactic acid. In F.L. Davies and B.A. Law (Eds.). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, pp 67-98. London: Elsevier Applied Science Publishers.

Masturcelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-López, C., Schirone, M., Suzzi, G. 2005 Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal* 15, 571-578.

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.

Mitsouka, T. 1990 Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology* 6, 263-268.

- Morea, M., Matarante, A., Di Cagno, R., Baruzzi, F., Minervini, F.** 2007 Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese. *International Dairy Journal* 17, 525-534.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R. A., Clemens, R. A.** 1999 Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 13-126.
- Novella Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C.** 2003 Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science* 68, 750-756.
- O`Keeffe, T., Hill, C.** 1999 Bacteriocins. Potential in food preservation
<http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/bacteriocins.doc>
- Ordóñez, J. A., Ibáñez, F. C., Torre, P., Barcina, Y.** 1997 Formation of biogenic amines in Idiazábal ewe's-milk cheese: effect of ripening, pasteurization and starter. *Journal of Food Protection* 60, 1371-1375.
- Özer, B., Kirmaci, H. A., Senel, E., Atamer, M., Hayaloglu, A.** 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal* 19, 22-29.
- Özogul, F., Özogul, Y.** 2007 The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology* 225, 385-394.
- Parente, E., Ricciardi, A.** 1999 Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied in Microbiology and Biotechnology* 52, 628-638.
- Pérez, G., Cardell, E., Zárate, V.** 2003 Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 537-546.
- Pérez, P. F., Minnaard, Y., Disalvo, E. A., De Antoni, G.** 1998 Surface properties of Bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 21-26.
- Prost, F., Chambra, J. F.** 1994 Effect of aminopeptidase activity of thermophilic lactobacilli on Emmental cheese characteristics. *Journal of Dairy Science* 77, 24-33.
- Reid, G., McGroarty, J. A., Angotti, R., Cook, R. L.** 1998 *Lactobacillus inhibitor* production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 344-351.
- Requena, T., Peláez, C., Desmazeaud, M. J.** 1991 Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semi-hard goats' cheese. *Journal of Dairy Research* 58, 137-145.
- Sako, T. K., Matsumoto, K., Tanaka, R.** 1999 Recent progress on research and applications of non-digestible galacto oligosaccharides. *International Dairy Journal* 9, 69-80.

Shah, N. P. 2001 Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology* 55, 46-53.

Silla Santos, M.H. 1996 Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 213-231.

Stratton, S.S., Hutkins, R. W., Taylor, S. L. 1991 Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection* 54, 460-470.

Suzzi, G., Gardini, F. 2003 Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.

Tan, P.T.S., Poolman, B., Komings, W.N. 1993 Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research* 60, 269-286.

Tanner, A. C., Strzempko, M. N., Belsky, C. A., McKinley, A. G. 1985 Api Zym and Api an-ident reactions of fastidious oral Gram negatives species. *Journal of Clinical Microbiology* 22, 333-335.

Ur-Rehman, S., McSweeney, P.L.H., Banks J.M., Brechany, E.Y., Muir D.D., Fox, P.F. 2000, Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal* 10, 33-44.

Wadstrom, T., Andersson, K., Sydow, M., Axelsson, L., Lindgren, S., Gullmar, B. 1987 Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *Journal of Applied Microbiology* 62, 513-520.

Zárate, S., López-Leiva, M. H. 1990 Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *Journal of Food Protection* 53, 262-268.

6.-ELECCIÓN DEL CULTIVO INICIADOR

La identificación y el estudio de la actividad enzimática de las cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso permiten llevar a cabo una selección preliminar de las cepas con vistas a diseñar un cultivo iniciador para su uso en la fabricación industrial de quesos artesanales.

En cepas que forman parte de cultivos iniciadores para la fabricación de queso, bajos nivel de actividad proteasa y alta actividad aminopeptidasa son rasgos deseables para el desarrollo del flavor y la textura adecuados, reduciendo el amargor y los defectos de textura (Mathara y col., 2004). En base a los resultados obtenidos es posible sugerir que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 11, GE 12, y GE 2363, *Lactobacillus paracasei* GE 2036 y *Enterococcus faecalis* GE 2320 serían adecuadas para este propósito, siendo necesario realizar estudios de resistencia a fagos, factores de virulencia y detección de enterotoxinas.

Las cepas de la especie *Lactococcus lactis* fueron elegidas en base a su capacidad acidificante y proteolítica y/o caseinolítica. La cepa *Lactococcus lactis* GE 2363 aportaría su elevada actividad esterasa, pero el inconveniente de su alta producción de putrescina y tiramina la hacen una candidata menos favorable. La cepa NSLAB autóctona, *Lactobacillus paracasei* GE 2036, elegida para formar parte del cultivo iniciador, tiene interés por su elevada actividad caseinolítica y aminopeptidasa y podría ser añadida al cultivo iniciador como adjunto, aunque también hay que tener en cuenta que ha resultado ser medianamente formadora de putrescina y tiramina. Por último, la cepa *Enterococcus faecalis* GE 2320 ha sido elegida por su alta capacidad caseinolítica y dipeptidasa. Todas estas cepas mostraron altos índices de hidrofobicidad, propiedad interesante en la selección de cepas probióticas.

Considerando los resultados de los ensayos de incompatibilidad entre cepas, los cultivos mixtos que se diseñen deberán tener en cuenta las siguientes combinaciones posibles: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE12 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 2363; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 11 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 12; *Lactobacillus paracasei* GE 2036 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 12.

Estas cepas serán ensayadas en la elaboración de algunos lotes de queso en planta piloto bajo condiciones controladas. En base a los resultados obtenidos en ese ensayo se diseñará el cultivo iniciador autóctono para la fabricación industrial de esta y otras variedades artesanales con el objetivo de obtener quesos similares, desde el punto de vista sensorial, a los quesos tradicionales.

7.- CONCLUSIONES

- ✓ El queso de Genestoso elaborado con leche cruda constituye una fuente de microorganismos con propiedades tecnológicas deseables para formar parte de posibles cultivos iniciadores.
- ✓ Las bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso artesanal y seleccionadas en función de su aptitud tecnológica y propiedades probióticas constituyen una alternativa a los fermentos comerciales.
- ✓ La utilización combinada de las técnicas clásicas y las técnicas moleculares permite obtener una adscripción a género y a especie de las cepas aisladas mucho más precisa.
- ✓ Las técnicas rápidas de detección enzimática combinadas con la cuantificación por métodos clásicos constituyen una vía esencial para la determinación de las características tecnológicas de las cepas. También permiten una estimación aproximada de la capacidad probiótica de los aislados y de su implicación en la formación de aminas biógenas.
- ✓ Las cepas de bacterias lácticas con excelente capacidad acidificante, altas actividades aminopeptidasa, dipeptidasa y caseinolítica, así como esterasa, fueron seleccionadas para formar parte de un posible cultivo iniciador.
- ✓ Los altos índices de hidrofobicidad mostrados por las cepas seleccionadas hacen que éstas puedan ser consideradas microorganismos probióticos.

- ✓ Los resultados de los ensayos sobre aminas biógenas fueron similares a los encontrados para otros quesos, con valores no preocupantes para la salud humana.
- ✓ En base a los resultados obtenidos se sugieren: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE11, GE12 y GE 2363, *Lactobacillus paracasei* GE 2036 y *Enterococcus faecalis* GE 2320 como las cepas más adecuadas para constituir un cultivo iniciador autóctono.
- ✓ Es necesario llevar a cabo la detección de enterotoxinas y el ensayo de factores de virulencia de la cepa perteneciente al género *Enterococcus* seleccionada para formar parte del cultivo iniciador propuesto. Ello garantizará la calidad higiénico-sanitaria del producto.
- ✓ Para establecer la proporción de cada cepa en el cultivo iniciador y la combinación más adecuada de las mismas es imprescindible estudiar el efecto de la adición de los cultivos en la elaboración del queso de Genestoso, puesto que, la caracterización *in vitro* de las cepas aisladas no puede sustituir al ensayo *in vivo* de las mismas en las condiciones reales de elaboración del queso.