

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“*Lactococcus lactis* NATIVO: CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN
DE BACTERIOCINAS, PROPIEDADES TECNOLÓGICAS y EFECTO
ANTIMICROBIANO SOBRE *Listeria innocua*”**

por

**Gonzalo LORENZO LOUREIRO
Martín RAFFO SERRA**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias**

**Orientación: Higiene, inspección, control y
tecnología de los alimentos de origen
animal**

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Silvana Carro

Tercer Miembro:

Co-tutor:

Dr. Álvaro González

Autores:

Br. Gonzalo Lorenzo

.....

Br. Martín Raffo

Fecha: 13 de noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a nuestras familias por la motivación, la fuerza y el apoyo en todo momento.

A Silvana y Álvaro por su tiempo, dedicación y paciencia.

A los compañeros del Dpto. de Ciencia y Tecnología de la Leche, por la colaboración, enseñanza y compañerismo.

Al Área de Biofísica por la disposición de los equipos, en especial al Dr. Aldo Calliari por su apoyo.

A CSIC, por la financiación del proyecto.

A nuestros compañeros tesistas del Dpto. de Ciencia y Tecnología de la Leche, Bettiana, Virginia, Ignacio, Mara por su ayuda.

A nuestros amigos, amigas que siempre están y a los compañeros de Facultad, por los momentos vividos en estos años.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
ANTECEDENTES	9
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	9
Cultivos iniciadores o starters	9
Clasificación de cultivos starters	10
Cultivos adjuntos	11
Cultivos naturales (artesanales)	12
BIOCONSERVACIÓN	12
Ácidos orgánicos	13
Peróxido de hidrógeno	14
Diacetilo y Acetaldehído	14
Etanol	15
Dióxido de carbono (CO ₂)	15
BACTERIOCINAS	16
Clasificación	16
Clase I o Lantibióticos	16
Clase III	18
Espectro de acción	18
Factores que afectan la producción de Bacteriocinas	19
PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	20
Producción de ácido láctico	20
Producción de Diacetilo	22
Autólisis	23
Proteólisis	24
Lipólisis	25
ANTECEDENTES EN ESTUDIOS SOBRE BAL EN ROU	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	28
CINÉTICA DE DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS DE LACTOCOCCUS	
LACTIS NATIVO EN MEDIO DE CULTIVO Y LECHE	29
Cinética y producción de bacteriocinas en medio de cultivo	29
Curva de crecimiento y actividad acidificante	29
Producción de bacteriocinas y expresión en unidades arbitrarias de	
actividad por mL (UA/mL)	29
Cinética y producción de bacteriocinas en leche	31

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO SOBRE LISTERIA INNOCUA EN MEDIO DE CULTIVO Y LECHE.....	31
Efecto antimicrobiano en medio de cultivo	31
Efecto antimicrobiano en leche	32
Análisis estadístico.....	33
EVALUACIÓN DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO.	33
Actividad acidificante.....	33
Producción de diacetilo	33
Capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico	33
Actividad autolítica	34
Actividad proteolítica extracelular.....	34
Actividad lipolítica.....	35
RESULTADOS.....	36
CINÉTICA DE DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO EN MEDIO DE CULTIVO Y LECHE.....	36
EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO SOBRE LISTERIA INNOCUA EN MEDIO DE CULTIVO	37
EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO SOBRE LISTERIA INNOCUA EN LECHE.....	38
EVALUACIÓN DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO.	40
Curvas de crecimiento y actividad acidificante.....	40
Producción de diacetilo	40
Capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico	41
Actividad autolítica:	41
Actividad proteolítica extracelular y lipolítica:	42
DISCUSIÓN	43
CINÉTICA DE DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO EN MEDIO DE CULTIVO	43
CINÉTICA DE DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO EN LECHE.....	44
EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO SOBRE LISTERIA INNOCUA EN MEDIO DE CULTIVO	46
EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO SOBRE LISTERIA INNOCUA EN LECHE.....	47
EVALUACIÓN DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LACTOCOCCUS LACTIS NATIVO.	50
Curvas de crecimiento y actividad acidificante.....	50
Producción de diacetilo	50
Capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico	51
Actividad autolítica	51
Actividad proteolítica extracelular.....	52
Actividad lipolítica.....	53
CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Cuadro I. Resultado de los Recuentos de <i>L. innocua</i> (Log UFC/mL) y de pH en los tratamientos en co-cultivo y sus respectivos controles durante su crecimiento en TSB incubado a 35°C por 24 hs.....	37
Cuadro II. Resultado de los Recuentos de <i>L. innocua</i> (Log UFC/mL) y de pH en los tratamientos en co-cultivo (tratamiento A) y sus respectivos controles durante su crecimiento en RSM incubado a 35°C por 24 hs.....	38
Cuadro III. Resultado de los Recuentos de <i>L. innocua</i> (Log UFC/mL) y de pH en los tratamientos en co-cultivo (tratamiento B) y sus respectivos controles durante su crecimiento en RSM incubado a 35°C por 24 hs.....	39
Cuadro IV. Capacidad de crecimiento de <i>L. lactis</i> nativo en medio MRS modificado con NaCl o ácido Láctico.....	41
Cuadro V. Porcentaje de autólisis de <i>L. Lactis</i> nativo a 30°C a las 24 y 48 horas de incubación.....	41
Figura 1. Rutas metabólicas de fermentación de glucosa por bacterias ácido lácticas.....	10
Figura 2. Absorción y metabolismo de Lactosa y Galactosa por algunas BAL: vías de Tagatosa, Embden-Meyehorf y Leloir.....	22
Figura 3. Ruta del metabolismo del citrato por <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	23
Figura 4. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana por la técnica “agar well difusión”.....	31
Figura 5. Curva de crecimiento, producción de bacteriocina/s y actividad acidificante de <i>L. lactis</i> nativo en caldo MRS a 30°C.....	36
Figura 6. Curva de crecimiento, producción de bacteriocina/s y actividad acidificante de <i>L. lactis</i> nativo en leche (RSM) a 30°C.....	36
Figura 7. Crecimiento de <i>L. innocua</i> en co-cultivo con <i>L. lactis</i> nativo en TSB a 35°C.....	37
Figura 8. Crecimiento de <i>L. innocua</i> en co-cultivo con <i>L. lactis</i> nativo en leche (RSM) a 35°C, Tratamiento A (dosis alta de Listeria).....	38
Figura 9. Crecimiento de <i>L. innocua</i> en co-cultivo con <i>L. lactis</i> nativo en leche (RSM) a 35°C, Tratamiento B (dosis baja de Listeria).....	39
Figura 10. Curva de crecimiento y actividad acidificante de <i>L. lactis</i> nativo en leche (RSM) a 30°C.....	40
Figura 11. Producción de diacetilo por la cepas de <i>L. lactis</i> , <i>E. coli</i> ATCC 25922 (control negativo) y <i>Klebsiella</i> spp (Control positivo).....	40
Figura 12. Actividad proteolítica en agar leche (izquierda) de: <i>L. lactis</i> nativo (A), <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (B) y <i>E. coli</i> ATCC 25922 (C). Actividad Lipolítica en agar crema de leche (derecha) <i>L. lactis</i> nativo (A) y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (B).....	42

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte de la microbiota natural de la leche y son componentes fundamentales de muchos de los cultivos *starters* utilizados en la industria alimentaria. Las BAL presentan actividad antimicrobiana por lo que pueden formar parte de cultivos bioprotectores. Esta propiedad se atribuye principalmente a la producción de diferentes sustancias, entre las cuales se encuentran péptidos de síntesis ribosomal denominados bacteriocinas. Asimismo aquellas producidas por BAL resultan de gran interés ya que son reconocidas por la FDA con el *status* de "seguras" o GRAS (Generally Recognized as Safe). El espectro de acción de algunas bacteriocinas producidas por BAL es amplio e incluye microorganismos alterantes y/o patógenos de los alimentos como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* entre otros.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de bacteriocinas y el efecto antagónico frente a *Listeria innocua* de una cepa nativa de *Lactococcus lactis*, así como caracterizar tecnológicamente dicha cepa. Para ello se realizaron curvas de crecimiento en medio de cultivo y leche determinándose durante las mismas la producción de bacteriocinas. El efecto antagónico sobre *L. innocua* se estudió en medio de cultivo y leche mediante ensayos de co-cultivos. En el caso de la leche se utilizaron dos tratamientos variando la concentración de *Listeria* (dosis baja y alta). Las propiedades tecnológicas evaluadas fueron: capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico, producción de diacetilo y actividades acidificante, autolítica, proteolítica y lipolítica. En relación a los resultados, *L. lactis* nativo presentó curvas de crecimiento similares en los medios evaluados y aunque la producción de bacteriocinas fue detectada en ambos medios, la cinética de producción fue diferente. Además la concentración máxima de bacteriocinas obtenida en leche fue 7 veces menor que en medio de cultivo. En cuanto al efecto *in situ* sobre *Listeria innocua*, la incorporación de esta BAL en un co-cultivo afectó su desarrollo de forma significativa (efecto bacteriostático) en ambos medios. En los ensayos en medio de cultivo, el recuento final de *Listeria* fue 3,83 Log UFC/mL inferior en el co-cultivo que en el control. En leche el comportamiento fue similar, observándose una reducción de 1,52 y 4,32 Log UFC/mL de *Listeria* en comparación a los controles (dosis alta y baja respectivamente). Respecto a las propiedades tecnológicas, la actividad acidificante fue baja. Presentó baja tolerancia al NaCl y al ácido láctico, así como también baja actividad autolítica. Exhibió actividad proteolítica y no presentó actividad lipolítica. Por último fue productor de diacetilo, identificándose como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) are part of natural microbiota of milk and are fundamental components *starters* of many cultures used in the food industry. LAB have antimicrobial activity and can be part of bioprotectors cultures. This property is attributable to the production of different substances, including ribosomal synthesized peptides called bacteriocins. Those produced by LAB are also of great interest because they are on the FDA's GRAS (Generally Recognized as Safe) list. The action spectrum of some bacteriocins produced by LAB is broad and includes spoilage microorganisms and/or foodborne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* among others. The aim of this study was to evaluate the production of bacteriocins and the antagonistic effect against *Listeria innocua*, of a native strain of *Lactococcus lactis* and technologically characterize this strain. Thus, we performed growth curves in culture medium and milk determining the production of bacteriocins. The antagonistic effect on *L. innocua* was studied in culture medium and milk by co-culture assays. For milk were used two treatments: changing the concentration of *Listeria* (low and high dose). The technological properties evaluated were: ability to grow at different concentrations of salt and lactic acid, diacetyl production and acidifying, autolytic, proteolytic and lipolytic activities. Regarding the results, *L. lactis* native showed similar growth curves in the evaluated media and although bacteriocin production was detected in both media, the production kinetics was different. Furthermore, maximum concentration of bacteriocins in milk obtained was 7 times lower than in culture medium. About "*in situ*" *Listeria innocua* effect, incorporating this BAL in co-culture affected significantly (bacteriostatic effect) in both media. In assays in culture medium, the final count of *Listeria* was 3.83 log CFU/mL lower in the co-culture than in the control. In milk the behavior was similar, with a reduction of 1.52 and 4.32 log CFU/mL of *Listeria* compared to controls (high and low dose, respectively). Regarding technological properties, the acidifying activity was low. This presented low tolerance to NaCl and lactic acid as well lower autolytic activity and exhibited proteolytic activity but no lipolytic activity. Finally produced diacetyl, and it was identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

ANTECEDENTES

Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

El conocimiento de cultivos lácticos se originó en el siglo XVIII, cuando agricultores de África, Asia y Europa observaron el comportamiento de la leche cruda en los meses cálidos. La leche coagulada bajo estas condiciones presentaba un sabor diferente, en ocasiones agradable, así se fueron seleccionando las BAL con mejores propiedades (sabor-aroma) para inocular la leche al día siguiente (Bedolla y col., 2003). Éstas pueden estar contenidas en un grupo de microorganismos llamados cultivos lácticos o iniciadores (Parra Huertas, 2010). Las BAL integran parte de la microbiota natural de la leche. Son un grupo de microorganismos de gran importancia desde el punto de vista aplicado y componentes fundamentales de muchos de los cultivos iniciadores o *starters* utilizados en la industria alimentaria (Axelsson, 2004)

Los géneros tradicionales de BAL incluyen: *Streptococcus*, *Lactococcus* (grupo N de *Streptococcus*), *Enterococcus* (grupo serológico D de Lancefield), *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium*. Éstos se encuentran involucrados en la preservación e identidad específica de un determinado producto, así como también le otorgan los atributos sensoriales, los cuales son difíciles de obtener por otros métodos de elaboración (Carr y col., 2002; Chen y Hoover, 2003).

Tradicionalmente las BAL han sido empleadas empíricamente o deliberadamente en la elaboración de diversos productos, entre otros los derivados lácteos: quesos, mantequilla, yogurt, etc. Así, han sido aplicadas como cultivos *starters* (iniciadores de la producción de ácido láctico), no *starter* o adjuntos (NSLAB, no contribuyen a la producción de ácido) o también como microbiota competitiva en estos productos lácteos. Sobre la base de sus propiedades metabólicas se emplean debido a su contribución al sabor, la textura y al valor nutricional de los alimentos (Smit, 2003).

Cultivos iniciadores o starters

Los cultivos iniciadores o *starters* pueden definirse como preparados de inóculos de bacterias o levaduras que se añaden directamente a la leche o en una etapa de la elaboración de los productos lácteos fermentados (Hill y Kethireddipalli, 2013). Deben esta denominación a que inician la producción de ácido láctico, considerada ésta, su principal función (Fox y col., 2000). Sin embargo, los cultivos pueden proporcionar otras propiedades a los productos lácteos fermentados, por ejemplo: (1) desarrollar típicos sabores como los aportados por el diacetilo y acetaldehído en leches fermentadas y ciertos quesos; (2) promover la maduración en el queso (3) evitar alteraciones de calidad en los productos como por ejemplo la “hinchazón tardía” causada por *Clostridium tyrobutyricum*; (4) brindar una barrera antimicrobiana frente a peligros biológicos de importancia en alimentos como es la presencia de

Listeria monocytogenes; o (5) aportar propiedades benéficas para la salud actuando como probióticos (Hill y Kethireddipalli, 2013)

Clasificación de cultivos *starters*

Los cultivos lácticos pueden ser clasificados de diversas maneras: según su metabolismo, temperatura óptima de crecimiento, producción de compuestos aromáticos, forma de presentación, etc (Parra Huertas, 2010).

Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (producen principalmente ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias).

Homofermentativas: ejemplos de éstas son los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*. A su vez, determinados *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis, conocida también como vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Axelsson, 2004) (Fig. 1).

Heterofermentativas: los géneros como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium* y algunos *Lactobacillus*, convierten hexosas o pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfoacetolasa, produciendo además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr y col., 2002) (Figura 1).

En la industria alimentaria algunas BAL heterolácticas son más importantes que las homolácticas, por ejemplo en la producción de compuestos que intensifican el sabor y aroma tales como acetaldehído y diacetilo (García y col., 1998; Jay, 2000 citados por Ramírez y col., 2011).

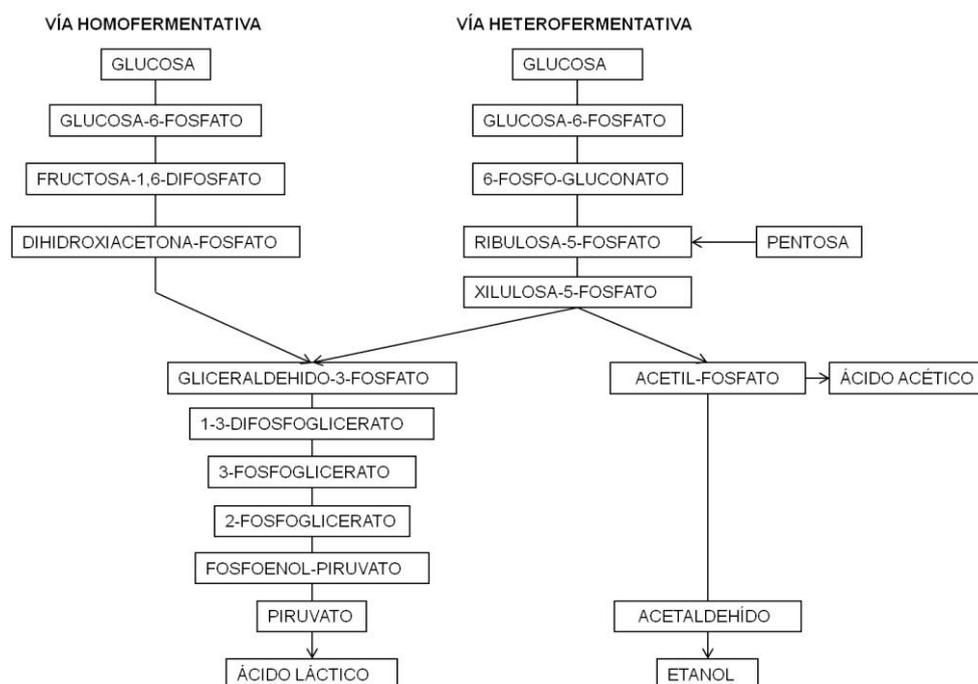


Figura 1. Rutas metabólicas de fermentación de glucosa por bacterias ácido lácticas Adaptado de Axelsson, (2004)

Las BAL también se clasifican de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento en:

Cultivos mesófilos: El rango de crecimiento óptimo para este tipo de cultivos es de 30-35°C, la producción de ácido es lenta o ausente a temperaturas inferiores a 20° C y el crecimiento se inhibe a temperaturas superiores a 39° C. Pertenecen a este grupo: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, los que son utilizados conjuntamente constituyendo los cultivos mesófilos y homofermentativos más comúnmente usados en muchas variedades como el queso fresco, Cheddar, Colby, Gouda y variedades de corta maduración (Hill y Kethireddipalli, 2013). Dentro de las subespecies de *lactis*, existe la biovariante *diacetylactis*, la cual fermenta el citrato, produciendo diacetilo y acetoína (Curioni y Bosset, 2002 citado por Cavanagh y col., 2015). Otros ejemplos de cultivos mesófilos incluyen además una cepa heterofermentativa: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* puede ser mezclada con *L. lactis* ssp. *cremoris/lactis* considerados fermentadores de citrato para la elaboración manteca y quesos con ojos pequeños como Havarti y Gouda (Hill y Kethireddipalli, 2013).

Cultivos termófilos: su crecimiento es favorecido por temperaturas en el intervalo de 40-45°C, pero pueden sobrevivir a temperaturas superiores a 55°C como se requiere en las variedades de quesos de pasta cocida como los tipos suizos e italianos. Estos quesos generalmente llevan una etapa de cocción a temperaturas superiores a 45° C antes de la separación de la cuajada y el suero. Las mezclas de cultivos mixtos termófilos más comúnmente utilizadas son: *Streptococcus thermophilus* con *Lactobacillus delbrüeckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* con *Lactobacillus helveticus* (Hill y Kethireddipalli, 2013). Los cultivos iniciadores termófilos pueden crecer juntos en una relación simbiótica o asociativa, en la que la tasa de crecimiento y producción de ácido es más rápida que la de cada uno por separado (Carrasco y col., 2005 citado por Hill y Kethireddipalli, 2013). La actividad proteolítica de los bacilos producen aminoácidos y péptidos, que estimulan el crecimiento de cocos, y éstos a su vez producen ácido fórmico, que es requerido por los bacilos (Hill y Kethireddipalli, 2013).

Cultivos adjuntos

Los quesos tradicionales poseen un intenso “*flavour*” (sabor-aroma) característico desarrollado por las denominadas bacterias ácido lácticas no starter o adjuntos (del inglés, Non Starter Lactic Acid Bacteria-NSLAB). Estos son microorganismos que no corresponden a los del starter normal, pero se desarrollan en el producto, particularmente durante la maduración, como microbiota secundaria (Beresford, y col., 2001). El origen de estos NSLAB puede estar en la leche u otros componentes utilizados en la fabricación de queso, o del microentorno de la quesería (Martley y Crow, 1993).

Para que la inclusión de las NSLAB en la elaboración de los quesos sea satisfactoria debe existir un equilibrio en las reacciones de maduración por parte de las cepas involucradas. También deben ser capaces de competir

contra los o las contaminantes del queso y permanecer como microbiota predominante durante la maduración para contribuir con el desarrollo del flavour específico. Las propiedades que le confieren al queso en cuanto a sabor y textura pueden ser positivas, negativas o neutrales dependiendo las cepas predominantes y sus características asociadas a la maduración (Crow y col., 2001). Por lo tanto, es esencial seleccionar las cepas de NSLAB de forma adecuada para aprovechar las propiedades sensoriales que confieren al queso y al mismo tiempo, poder controlar la población bacteriana en todo el proceso de maduración asegurando que no existan defectos indeseables originados por otras cepas bacterianas de NSLAB (Fox y col., 2000)

Cultivos naturales (artesanales)

En muchos países se utilizan otros tipos de cultivos, denominados artesanales, los que derivan de una mezcla de BAL nativas contenidas en suero de los anteriores lotes de quesos (denominado “suero fermento”), que se repica como inóculo para el nuevo lote de elaboración. Así, este “suero fermento” de la elaboración del queso del día se incuba a una temperatura alta (45-52°C) por un período de 4,5 a 18 horas, dependiendo del cultivo, para utilizarlo en la elaboración del día siguiente. Los quesos generalmente se realizan con leche cruda, por lo que tales cultivos dependen de la presencia de BAL en la misma. La temperatura de incubación y el pH influyen sobre los tipos de bacterias que crecen bajo estas condiciones. La composición de estos cultivos es extremadamente compleja y muy variable y puede incluir *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lc. lactis*, *Sc. thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Ec. faecium*, y *Leuconostoc spp.* Estos cultivos tienen gran parte de los atributos de las mezclas de ambos cultivos mesófilos y termófilos (Fox y col., 2000).

Bioconservación

La “bioconservación” se define como la prolongación de la vida útil contribuyendo a la inocuidad de los alimentos mediante la microbiota natural o sus metabolitos (Holzapfel y col., 1995; Favaro y col., 2015). Algunos de los métodos más antiguos de conservación de los alimentos son la adición de sal, la deshidratación y la fermentación. Particularmente, la fermentación láctica tiene un papel determinante en la conservación porque inhibe el crecimiento de microorganismos deteriorantes y patógenos mediante la reducción del pH. La inhibición de patógenos transmitidos por alimentos mediante el uso de bacterias ácido lácticas es una de las formas de bioconservación (Riley, 2005). Muchos investigadores consideran que las BAL son candidatas idóneas para formar parte de cultivos bioprotectores e incluso algunos han llegado a definir la bioconservación como el empleo de BAL, sus productos metabólicos o ambos para mejorar la calidad de los alimentos (Cintas y col., 1997; Casaus y col., 1998; Rodríguez y col., 2005).

El principal factor en el que se basa la actividad antimicrobiana de las BAL es la producción de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico), derivada de

la fermentación de carbohidratos presentes en alimentos y la consecuente disminución del pH, a lo que se suma además, la competencia por nutrientes presentes en el sustrato. Estas bacterias pueden tener también la capacidad de producir otras sustancias inhibitorias tales como: peróxido de hidrógeno (H₂O₂), diacetilo, metabolitos de oxígeno y bacteriocinas (Rodríguez y col., 2000; Carro y col., 2005).

Los consumidores se han ido concientizando sobre aspectos relativos a inocuidad e higiene alimentaria debido al número creciente de enfermedades e intoxicaciones de origen alimentario. La preferencia de los consumidores en alimentos mínimamente procesados, producidos sin la adición de compuestos químicos, han sido una motivación para que los investigadores se focalicen en el desarrollo de métodos modernos y naturales de preservación. Así es que, la biopreservación apunta a la reducción de los riesgos para la salud sin cambiar las propiedades sensoriales de los productos (Holzapfel y col., 1995)

Existe interés a nivel mundial, tanto de los sectores industriales como de la comunidad científica, por la investigación de las bacteriocinas como biopreservantes naturales de los alimentos formando parte de un sistema de barreras sanitarias múltiples (Citti, 2005).

A continuación se describen brevemente otros compuestos antimicrobianos producidos por las BAL que también presentan interés tanto desde el punto de vista tecnológico como desde el de inocuidad, por su posible aplicación como biopreservantes en la industria alimentaria.

Ácidos orgánicos

Estos incluyen en mayor proporción el ácido láctico, así como también ácido propiónico y acético, los cuales son productos finales y proveen de un ambiente desfavorable para el crecimiento de microorganismos del deterioro y algunos patógenos. El mecanismo de acción propuesto es que interfieren en el mantenimiento del potencial de membrana, inhibiendo el transporte activo, reduciendo el pH e inhibiendo el metabolismo celular (Ross y col., 2002). El efecto antimicrobiano neto de los ácidos orgánicos depende de su concentración y del valor del pH, aumentando a bajos valores de este último (Adams y Halls, 1988 citado por Citti, 2005). Los ácidos orgánicos sintetizados a partir de la fermentación, son liberados al medio extracelular donde además de contribuir a las características sensoriales y reológicas del alimento, inhiben o retardan el desarrollo de microorganismos alterantes y/o patógenos, entre los que se incluyen *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium* spp (Adams y Halls, 1988; Caplice y Fitzgerald, 1999 citados por Citti, 2005). También se ha descrito que los ácidos orgánicos inhiben la germinación de las esporas de *Bacillus cereus* (Wong y Chen, 1988 citado por Citti, 2005) y *Clostridium tyrobutyricum* (Blocher y Busta, 1983 citado por Citti, 2005) y fundamentalmente el ácido acético, el desarrollo de algunos hongos y levaduras (Baird-Parker, 1980 citado por Citti, 2005)

Es importante destacar que el desarrollo en aerobiosis de las BAL conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno, peróxido de hidrógeno, aniones

superóxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la microbiota láctea y no láctica (Zamora, 2003).

Peróxido de hidrógeno

En presencia de oxígeno, las BAL producen peróxido de hidrógeno como resultado de la actividad de oxidasas. Debido a la ausencia de la enzima catalasa en dichas bacterias, la cual es capaz de degradar el H_2O_2 , éste puede acumularse en el medio inhibiendo el crecimiento de microorganismos. El efecto inhibitorio del H_2O_2 se logra a través de su fuerte capacidad oxidante sobre los lípidos de membrana y proteínas celulares y también a través de la activación del sistema lactoperoxidasa (De Vuyst y Vandame, 1994; Caplice y Fitzgerald, 1999 citados por Riley, 2005). El contenido de H_2O_2 es variable y depende del grado de oxigenación del medio. La producción es mayor a bajas temperaturas, cuando la solubilidad del oxígeno es elevada y cuando los cultivos usados son mantenidos en constante agitación. A su vez, el H_2O_2 puede también reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibitoras. En leche cruda, el peróxido producido reacciona con el tiocianato endógeno, el cual es catalizado por la lactoperoxidasa, para formar productos de oxidación intermediaria, que son inhibidores de microorganismos (Thomas, 1985 citado por Citti, 2005). Diferentes estudios han demostrado que microorganismos como *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* y *Listeria monocytogenes* son inhibidos por la presencia de H_2O_2 , sin embargo su efecto bactericida o bacteriostático depende de su concentración en el medio y de factores ambientales como el pH y la temperatura (Juven y Pierson, 1996; Brul y Coote, 1999 citados por Riley, 2005).

Diacetilo y Acetaldehído

El diacetilo es un producto final del metabolismo de BAL y es conocido por el aroma a manteca que confiere a los productos fermentados de leche y también por su acción antimicrobiana (Vandenbergh, 1993 citado por Riley, 2005). Las bacterias Gram negativas generalmente presentan mayor sensibilidad que las Gram positivas a la acción del diacetilo (Jay, 1982 citado por Riley, 2005). El uso del diacetilo es limitado debido a que son necesarias dosis elevadas para la preservación. Además, su intenso aroma impide el uso en la mayoría de los alimentos. Sin embargo, existen estudios sugiriendo que concentraciones reducidas de diacetilo pueden ser eficientes cuando se utilizan bajas temperaturas y que podría ser usado como antimicrobiano para utensilios y superficies operacionales en la industria alimentaria debido a su alta volatilidad. (Dillon y Cook, 1994 citado por Riley, 2005)

El acetaldehído es otro de los metabolitos antimicrobianos producido por las bacterias lácticas heterofermentativas a partir de los hidratos de carbono, siendo uno de los principales compuestos responsables por el aroma del yogur. La producción de este compuesto se atribuye al metabolismo del piruvato y a la reacción de la treonina aldolasa, que transforma la treonina en acetaldehído y glicina. El acetaldehído es reducido a etanol por la acción de la NAD-alcohol-dependiente deshidrogenasa, por lo que la ausencia o represión de esta

enzima se traduce en la secreción y acumulación de acetaldehído en el medio extracelular (Accolas y col., 1980 citado por Citti, 2005). La concentración de 10–100 ppm de acetaldehído inhibe el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos de la leche, como, entre otros, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Kulshrestha y Marth, 1974 citado por Citti, 2005). La concentración de acetaldehído producida y encontrada en el yogur es de aproximadamente 25 ppm, es por este motivo, que la contribución de este compuesto en la biopreservación es menor.

Etanol

El etanol es producido en bajas concentraciones por las BAL heterofermentativas y produce la deshidratación de la membrana celular al extraer los lípidos y reducir su permeabilidad. Los contenidos de etanol y ácido etanoico son inversamente proporcionales. Estos compuestos demuestran una contribución importante en los procesos fermentativos naturales cuando las bacterias heterofermentativas activas están presentes (Helander y col., 1997).

Dióxido de carbono (CO₂)

La fermentación de azúcares por las bacterias heterofermentativas con producción de CO₂ contribuye a inhibición de otros microorganismos. El CO₂ ejerce una acción antimicrobiana frente a diversos microorganismos. El mecanismo por el que el éste ejerce su acción antimicrobiana, se atribuye a la producción de condiciones de anaerobiosis que implica la inhibición de descarboxilaciones enzimáticas y también la contribución en la disminución del pH (Eklund, 1984; De Vuyst y Vandamme, 1994 citados por Citti, 2005).

Por otra parte, la inhibición de microorganismos por el CO₂, es comprobada con la utilización en escala comercial de envases para productos alimenticios con atmósfera modificada y controlada (Citti, 2005). Los microorganismos varían en su sensibilidad al CO₂, mohos y bacterias Gram negativas oxidativas son más susceptibles, mientras que algunos *Lactobacillus* y levaduras poseen alta tolerancia.

En síntesis, las BAL tienen un gran potencial para su uso en bioconservación, además son generalmente reconocidas por la “*Food and Drug Administration*” (FDA) como “seguras” para el consumo o “*Generally Recognized As Safe*” (GRAS) ya que durante el almacenamiento, predominan en la microbiota de muchos alimentos (Dal Bello y col., 2012; Castellano y col., 2008). En contraposición con los aditivos químicos, el empleo de las BAL en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad entre los consumidores, la que por el efecto antagonista microbiano (antibiosis) resulta una alternativa atractiva (Deegan y col., 2006).

Bacteriocinas

La capacidad de biopreservar de las BAL en los alimentos se atribuye principalmente a la producción de sustancias antimicrobianas incluyendo: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Holzapfel, 1995; Gálvez y col., 2007). Éstas últimas son sustancias proteicas de síntesis ribosomal (proteínas o polipéptidos) con actividad antimicrobiana que pueden ser producidas por un gran número de bacterias Gram + y Gram – durante su crecimiento (Joerger, 2003; Papagianni, 2003; García y col., 2010). Más de 300 tipos diferentes de bacteriocinas se han descrito para los géneros de Lactobacilos, Lactococos, Leuconostoc, Pediococos y Enterococos (De Vuyst y Vandamme, 1994; Olasupo, 1998; Osuntoki y col., 2003). Las bacteriocinas de las BAL son un grupo heterogéneo constituido mayoritariamente por péptidos de pequeño tamaño, generalmente catiónicos o anfipáticos, y derivados de propéptidos con un extremo N-terminal cargado negativamente (Arqués, 2003). Las bacteriocinas podrían ser categorizadas como antibióticos, pero no lo son. La principal diferencia es que éstas restringen su actividad a cepas de especies relacionadas y particularmente a las cepas de la misma especie. Los antibióticos en cambio, tienen un mayor espectro de actividad e incluso si la misma es limitada no existe efecto preferencial sobre cepas estrechamente relacionadas. Son producidas durante la fase primaria del crecimiento, mientras que los antibióticos son generalmente metabolitos secundarios (Balciunas y col., 2013).

Clasificación

Las bacteriocinas han sido sometidas a diversas clasificaciones atendiendo a su estructura, tamaño molecular, presencia de aminoácidos modificados, modo de acción, estabilidad térmica, etc. (Arqués, 2003). Desde hace varios años diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas.

Así han sido divididas en diferentes grupos o clases. Klaenhammer, (1993), las clasifica en 4 clases y Kemperman y col., (2003), proponen una quinta clase. Por otra parte, Cotter y col., (2005), proponen clasificarlas en dos grupos: Clase I o lantibióticos, correspondiente a aquellas que contiene lantionina (análogo de cistina que consiste en dos residuos de alanina unidos por un solo átomo de azufre) y Clase II o no lantibióticos, aquellas que no la poseen. Estos autores proponen además, que los péptidos de alto peso molecular termolábiles, constituyan un grupo separado denominándolas “bacteriolisinas” (Clase III), mientras que la Clase IV proponen eliminarla. Finalmente Drider y col., (2006), proponen 3 clases principales de acuerdo a las características genéticas y bioquímicas; con las que concuerdan Balciunas y col., (2013). Dicha clasificación se desarrolla a continuación:

Clase I o Lantibióticos

Son péptidos pequeños (19-38 residuos de aminoácidos, <5KDa), estables al calor, activos a nivel de membrana y que contienen aminoácidos modificados

post-traduccionalmente, como ejemplo: lantionina, β -metil-lantionina y dihidroalanina.

Por otra parte, los lantibióticos en función de su estructura y modo de acción se subdividen en 2 grupos (Drider y col., 2006):

Clase IA: moléculas lineales, catiónicas que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total. Corresponde a este grupo la lacticina 481 producida por *L. Lactis* (Piard y col., 1992 citado por Arqués, 2003). Otro ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina, la que fue descubierta en Inglaterra por Rogers y Whitter en 1928. Debido a su alta actividad bactericida y a que no es tóxica para los humanos ha sido usada como conservante en alimentos por más de 50 años (Cruz-Chamorro y col., 2006). Es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y su biosíntesis se produce durante la fase de crecimiento exponencial y se detiene completamente cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento (De Vuyst y Vandamme, 1994). Es un polipéptido de 34 aminoácidos que presenta características catiónicas e hidrofóbicas, con un peso molecular de 3500 Da. Presenta importantes propiedades funcionales, como la tolerancia a la acidez, termo-estabilidad a bajo pH y una específica acción bactericida contra las cepas bacterianas Gram positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* y también la inhibición efectiva del crecimiento de diversos bacilos y esporas de clostridios (Juncioni de Arauz y col., 2009). Su mecanismo de acción es doble: por un lado se une al péptidoglicano e inhibe la síntesis de la pared celular, mientras que por otro lado, forma poros en la membrana citoplasmática (Breukink y col., 1999).

Desde el año 1969, la nisina es considerada segura por la FAO para su aplicación en alimentos. Además ha sido incluida en la lista Europea de aditivos alimentarios como ingrediente biopreservante, al que se le asignó el número E234 (Balciunas y col., 2013). El Comité del Codex FAO y la OMS sobre la leche y productos de la leche autoriza a la nisina como aditivo alimentario para queso procesado a una concentración de 12,5 mg (como nisina pura) por kilogramo producto (Reis y col., 2012). Existen grandes diferencias en las legislaciones nacionales relativas a la presencia y niveles de nisina en diversos productos alimenticios. Así por ejemplo, la nisina puede adicionarse a quesos sin límite en Reino Unido, mientras se permite una concentración máxima de 12,5 mg/kg en que los alimentos en España (Sobrino-López y Martin-Belloso, 2008). En Brasil, Argentina, Italia y México, se permite la nisina para la aplicación en el queso hasta 12,5 mg/kg y hasta 500 UI/g. Sin embargo, en EE.UU. mucho más alto nivel de 10.000 UI/g es permitido (Cleveland y col., 2001). En Uruguay está permitida su utilización a una concentración de 12,5 mg/kg según el Reglamento Bromatológico Nacional 1994.

Clase IB: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos, por ejemplo mersacidina y cinamicina producidos por *Bacillus* spp y *Streptomyces cinnamoneus* respectivamente (López y col., 2008).

Además, Martin y col., (2004) proponen una tercera Clase IC, aquellas bacteriocinas con estructura más compleja, por ejemplo la lacticina 3147, un antibiótico formado por dos péptidos.

Clase II: No lantibióticos

Son bacteriocinas de estructura helicoidal y anfipáticas, además de no presentar modificaciones postraduccionales como la Clase I. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática despolarizando la misma causando muerte celular (Drider y col., 2006).

En este grupo se pueden identificar tres subclases:

Clase IIA: Péptidos activos contra *Listeria monocytogenes*, como la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase IIB: Incluye bacteriocinas heterodiméricas, es decir, que su actividad requiere la combinación de dos péptidos. En este grupo se encuentran la plantaricina y lacticina F.

Clase IIC: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

El representante más característico de la Clase II es la pediocina PA- 1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. Fue inicialmente detectada en *Pediococcus acidilactici*. Está compuesta por 44 residuos de aminoácidos y es la única bacteriocina perteneciente a la subclase IIA que es sintetizada no sólo por diferentes especies, sino también por diferentes géneros de BAL (Bhunja y col., 1987).

Otras bacteriocinas pertenecientes a la Clase II incluyen algunas similares a la pediocina como las producidas por *L. lactis*: Lactococina MMFII, A (Diplococcina), B, G, M y 972 (Venema y col., 1995; Oppedgård y col., 2007).

Clase III

Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Su mecanismo de acción consiste en promover la lisis de la pared celular del microorganismo blanco. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofilicina A y lactacinas A y B (Balciunas y col., 2013).

Espectro de acción

El espectro de acción antimicrobiano de algunas bacteriocinas es amplio e incluye microorganismos patógenos y/o alterantes de los alimentos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* (Cleveland y col., 2001; Gurira y Buys, 2005).

Listeria monocytogenes es un patógeno alimentario de relevancia para la industria láctea debido a su capacidad para crecer en condiciones de refrigeración (Gandhi y Chikindas, 2007). Por lo cual, es conveniente la

aplicación de un sistema combinado de métodos conservantes con el fin de obtener alimentos seguros. Esto determinará una reducción considerable de las concentraciones de aditivos químicos empleados habitualmente y/o de la intensidad de los tratamientos tecnológicos aplicados; circunstancia de especial interés en alimentos mínimamente procesados (Chen y Hoover, 2003). Según Lundén y col., (2004), los productos lácteos han sido asociados con aproximadamente la mitad de los brotes de listeriosis en Europa y en su mayoría se vincularon con el consumo de leche cruda o productos elaborados a partir de ésta. La leche no pasteurizada debe ser considerada por la industria láctea como una fuente de contaminación en la planta procesadora. *Listeria monocytogenes* es responsable de aproximadamente el 25% de las muertes causadas anualmente por patógenos transmitidos por los alimentos en los EE.UU. Este agente fue la causa del 71% de todos los *recall* del mercado de productos alimenticios en los EE.UU. entre 1993 y 1998, dado que las normativas aplican tolerancia cero en la presencia de este microorganismo en productos listos para el consumo (Cotter y col., 2005).

Factores que afectan la producción de Bacteriocinas

Las BAL poseen un número limitado de vías catabólicas que proporcionan energía para la síntesis celular y para la producción entre otros, de bacteriocinas. Por lo tanto, las condiciones que favorecen el crecimiento de las células, probablemente, aumentarán la producción de bacteriocinas por el proceso de crecimiento asociado. Sin embargo, un medio rico en nutrientes no conducirá necesariamente a un aumento de la producción de bacteriocinas. Varios estudios han demostrado que el tipo y nivel de carbohidratos (glucosa, sacarosa, fructosa), utilizados como fuentes de carbono afectan sustancialmente la síntesis de bacteriocinas (Biswas y col., 1991; Bárcena y col., 1998; Drosinos y col., 2005). La producción de bacteriocinas se ha demostrado que aumenta con una alta concentración de glucosa en el medio (Drosinos y col., 2005), posiblemente debido al estrés generado por las altas presiones osmóticas (De Vuyst y Vandamme, 1994). Sin embargo, se requiere una relación óptima entre carbohidrato y nitrógeno para asegurar la producción satisfactoria de bacteriocinas, debido a que el carbono o nitrógeno en exceso se convierten en un factor limitante para la síntesis de bacteriocina (Mataragas y col., 2003). Así también se observó que la máxima concentración de nisina se incrementaba con el nitrógeno en el medio, debido al aumento de aminoácidos esenciales para la formación de células y por ende la producción de bacteriocinas (Kim y col., 1997 citado por Toldrá, 2008). También el tipo de fuente de nitrógeno que hay en el medio tiene un efecto sobre la producción de bacteriocina. Las fuentes de nitrógeno (por ejemplo, extracto de levadura) con una mayor proporción de aminoácidos libres y péptidos cortos, favorecen la producción de bacteriocinas, en comparación con fuentes de péptidos largos (8 aminoácidos) debido al ahorro de energía (Benthin y col., 1994; Mataragas y col., 2003 citados por Toldrá, 2008). La presencia de varios elementos tales como fósforo, magnesio y calcio influyen la producción de bacteriocina, pero esta acción es específica de cada cepa (Parente y col., 1994).

Por otra parte, condiciones de pH y temperatura, son de los factores más críticos que afectan significativamente la producción de bacteriocina. Con frecuencia, la máxima concentración se logra a valores de pH: 5,5-6,0 y/o temperaturas ligeramente inferiores a los óptimos para el crecimiento. El mayor crecimiento celular no necesariamente significa mayor producción de bacteriocina (De Vuyst y col., 1996; Mataragas y col., 2003 citados por Toldrá, 2008). En este sentido, la producción de bacteriocinas se ve reforzada en ambientes con factores de crecimiento más bajos que el óptimo, probablemente porque el proceso de síntesis de bacteriocina se ve favorecido por una tasa de crecimiento más baja.

Propiedades Tecnológicas de Bacterias Ácido Lácticas

Como ya se ha mencionado las BAL comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos capaces de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico. Su capacidad para disminuir el pH mediante la producción de ácidos orgánicos durante la fermentación conduce al desarrollo de propiedades sensoriales deseables en los productos fermentados. Asimismo previenen el crecimiento de microorganismos patógenos y/o alterantes incrementando la estabilidad y colaborando en la seguridad de dichos productos. Además, la producción de ácido láctico actúa como un agente selectivo que permite a las BAL predominar frente a microorganismos competidores. Por otra parte aquellas BAL no starter (NSLAB) se encuentran en alto número en la maduración de quesos y desempeñan a través de actividades bioquímicas un papel de importancia en su maduración (Settanni y Moschetti, 2010). La información sobre las propiedades tecnológicas de BAL nativas puede contribuir a la estandarización de la calidad y seguridad de los productos sin necesidad de cambiar las propiedades fundamentales de los mismos (Ribeiro y col., 2012).

El desarrollo de cultivos iniciadores “*starters*” para alimentos fermentados es un esfuerzo multidisciplinario que requiere el estudio de los ecosistemas alimentarios (Vogel y col., 2002). Así como también la caracterización fisiológica y por tanto, las funcionalidades tecnológicas de las cepas a utilizar, por ejemplo, tolerancia a la sal, la capacidad acidificante, proteolítica y la actividad peptidasa o la producción de aminas biógenas, (Law y Kolstad 1983; Gardiner y col., 1998) con el fin de seleccionar aquellas que tengan el mayor potencial de aplicación a nivel industrial. La caracterización intra-especie es la primera etapa necesaria para la selección de cultivos iniciadores, debido a que tecnológicamente las propiedades antimicrobianas y probióticas son dependientes de las características de cada cepa (Mora y col., 2000).

Producción de ácido láctico

Las bacterias lácticas homofermentativas producen ácido láctico a partir de lactosa, lo que ocurre luego de su hidrólisis y posterior fermentación de glucosa y galactosa (Figura 1). Cuando estos azúcares se oxidan, estas bacterias pueden producir ácido fórmico, ácido acético y etanol por la fermentación de otros sustratos. Asimismo, las bacterias lácticas heterofermentativas también fermentan las hexosas y algunas veces, las

pentosas, originando ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y en algunos casos, ácido acético (Citti, 2005). En la producción fermentativa de ácido láctico los microorganismos utilizados frecuentemente pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Rhizopus* (Serna y Rodríguez de Stouvenel, 2006).

En el género *Lactococcus*, el mecanismo por el cual ingresa la lactosa a la célula es mediante el sistema fosfotransferasa (PTS) dependiente del fosfoenolpiruvato. No obstante, existen algunos lactococos que cuentan con la habilidad para transportar la lactosa al interior de la célula utilizando la lactosa permeasa (Figura 2). A su vez, en el interior de la célula (Figura 2), la lactosa 6-P es hidrolizada a glucosa y galactosa 6-P, por acción de la fosfo-beta-galactosidasa. Posteriormente la glucosa generada es fosforilada a glucosa 6-P la cual entra a la vía Embden-Meyerhof (EM). Por su parte, la galactosa 6-P toma una ruta diferente siendo isomerizada por medio de la galactosa 6-P isomerasa a tagatosa-6-fostato, ésta a su vez es fosforilada por la tagatosa 6-P quinasa a tagatosa-1-6-difosfato, la cual mediante una aldolasa produce gliceraldehído 3-P, entrando así en la ruta EM para producir finalmente ácido láctico (Hutkins, 2001 citado por Marth y Steele, 2001). Es importante destacar que el *L. lactis* fermenta en forma simultánea a la glucosa y galactosa por las rutas antes mencionadas

No obstante, puede existir galactosa libre en el medio, debido a la presencia de cultivos termófilos que no son capaces de fermentarla. De manera que los *Lactococcus* pueden transportarla por un mecanismo PTS galactosa específico o por una permeasa. El primero de los sistemas de transporte mencionado alimenta a la vía de la Tagatosa. En tanto si se utiliza el segundo sistema (galactosa permeasa) ingresará a la vía de "Leloir". Esta vía se caracteriza por la fosforilación de la galactosa, para luego realizar una isomerización y conversión en glucosa-1-fosfato, alimentando así la vía glicolítica. En aquellas cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* productoras de ácido láctico, los genes que codifican para el sistema de fosfotransferasa de lactosa (PTS lactosa), fosfo beta-galactosidasa y tagatosa, son puntos clave en el metabolismo de lactosa y se encuentran localizados en un solo operón identificado en plásmidos (Marth y Steele, 2001).

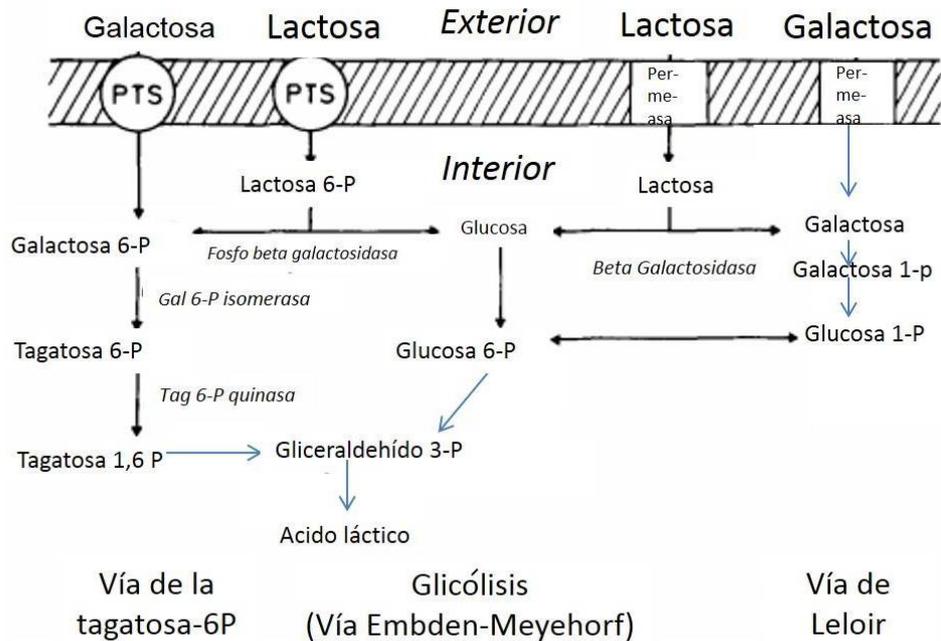


Figura 2. Absorción y metabolismo de Lactosa y Galactosa por algunas BAL: vías de Tagatosa, Embden-Meyehorf y Leloir. Adaptado de Kandler, (1983)

Producción de Diacetilo

El diacetilo es considerado uno de los compuestos más influyentes en la generación de aromas característicos en productos lácteos fermentados como manteca, leches cultivadas y quesos (McSweeney y Sousa, 2000). Las BAL utilizadas en la elaboración de este tipo de alimentos producen principalmente ácido láctico a partir de carbohidratos y la producción de diacetilo puede constituir una propiedad metabólica de interés industrial. Normalmente, *L. lactis* presenta una fermentación de tipo homoláctica donde la mayoría del piruvato intermediario se convierte en lactato. Esta reacción es catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y requiere la oxidación de NADH a NAD⁺ para el mantenimiento del equilibrio redox (Neves y col., 2005). Durante mucho tiempo se especuló que el diacetilo era el producto de una reacción enzimática en la que el α -acetolactato (α -AL) actuaba como sustrato. Sin embargo, no se pudo identificar y/o purificar una enzima que llevara a cabo la reacción descrita. Ramos y col., (1994), demostraron que el diacetilo provenía de una reacción espontánea que se originaba a partir de la descarboxilación oxidativa del α -AL. Éste es producido por la condensación de dos moléculas de piruvato por la acción de la α -acetolactato sintasa (α -ALS), que constituye una enzima clave en la generación de compuestos aromáticos (Figura 3).

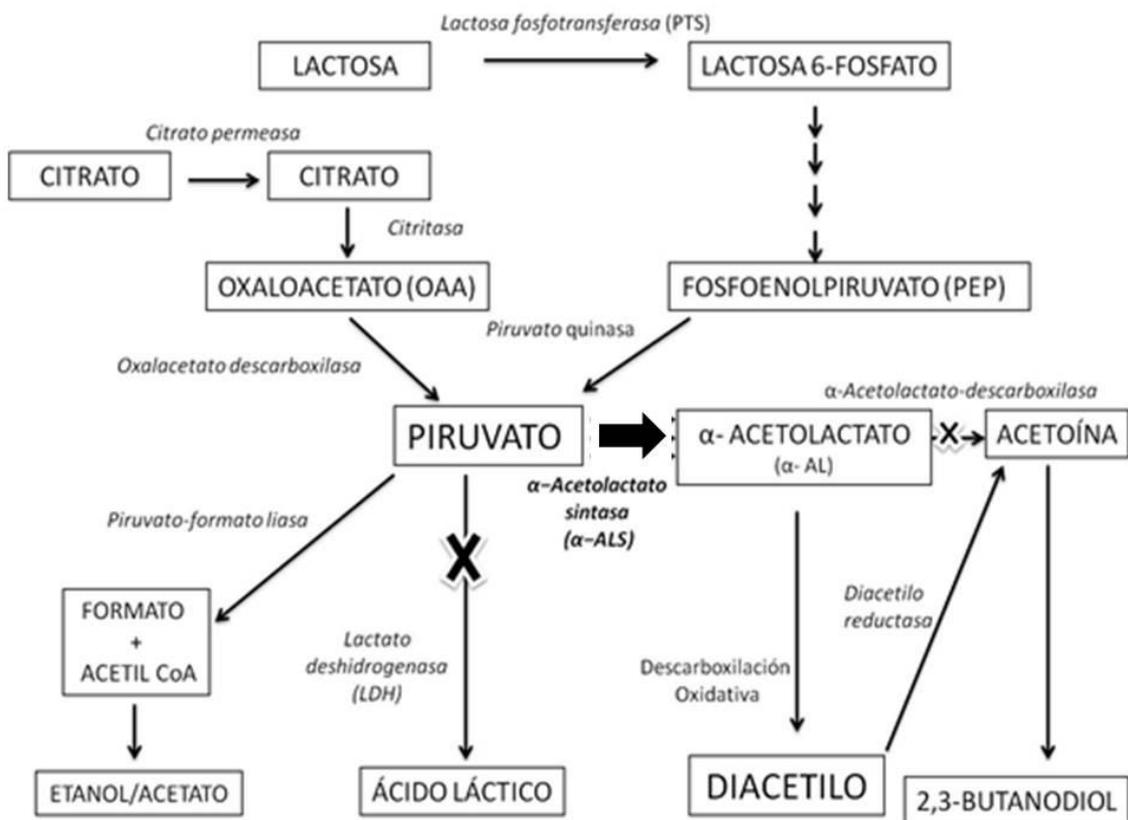


Figura 3. Ruta del metabolismo del citrato por *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* adaptada de Gasson y col., (1996)

Según Hugenholtz, (1993) y Marugg y col., (1994) las BAL poseen una α -ALS con una baja afinidad por el sustrato (50 mM), y en consecuencia la posibilidad de producir α -AL y posteriormente diacetilo, sólo queda reducida a aquellas especies capaces de utilizar citrato como fuente de carbono, cuyo metabolismo contribuye a aumentar la concentración de piruvato intracelular (Cogan, 1987; Palles y col., 1998; Kimoto y col., 1999). Entre las especies del género *Lactococcus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* difiere de los otros (*L. lactis* subsp. *lactis* y *cremoris*) por su capacidad de utilizar citrato como fuente de carbono. Esta cepa posee la enzima citrato permeasa que permite el transporte de citrato hacia dentro de la célula sin ninguna modificación (Kempeler y McKay, 1981). Sin embargo, la utilización del citrato es mediada a través de un plásmido, lo que constituye una característica inestable de estas bacterias por lo que se clasifican como una variedad del *L. lactis* subsp. *lactis* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Autólisis

La autólisis bacteriana resulta de la degradación enzimática de los peptidoglicanos de la pared celular por acción de hidrolasas endógenas denominadas autolisinas. Este proceso es de especial interés en las BAL e influye en su utilización como *starters* en lácteos fermentados. La actividad autolítica de las BAL en quesos es de particular importancia dado que se

encuentra vinculada a su maduración. El control y el aumento de esta actividad se considera un parámetro esencial para acelerar la maduración de los quesos (Lortal y Chapot-Chartier, 2005). Muchas enzimas de los *starters* que afectan la maduración del queso (peptidasas, lipasas y enzimas que catalizan la liberación de aminoácidos) se encuentran situadas intracelularmente, liberándose a causa de la autólisis (Pillidge y col., 2002).

Por otra parte las autolisinas están involucradas en diferentes funciones que requieren la modificación de la red de peptidoglicanos durante el crecimiento y la división celular (Smith y col., 2000 citado por Lortal y Chapot-Chartier, 2005). La autólisis ocurre generalmente bajo condiciones que llevan a la disminución de la síntesis de peptidoglicanos, por ejemplo el cese de aportes nutritivos u otras características ambientales desfavorables. Las enzimas más frecuentemente implicadas en la autólisis son N-acetil-muramidasa, N-acetil-glucosaminidasa, N-acetil-muramylamidasa y endopeptidasas, las que se clasifican con el nombre genérico de hidrolasas de péptidoglicano (Chapot-Chartier, 1996). En el caso del *L. lactis* la autolisina más comunmente expresada es la N-acetilmuramidasa (AcmA), la cual es responsable de la separación celular y autólisis durante la fase estacionaria de su crecimiento (Buist y col., 1997).

La lisis de *L. lactis* se ha estudiado ampliamente en quesos Cheddar y Saint-Paulin, donde se demostró ser altamente dependiente de la cepa (Chapot-Chartier y col., 1994; Wilkinson y col., 1994 citados por Lortal y Chapot-Chartier 2005). Por el contrario, se ha descrito que en quesos elaborados con leche ultrafiltrada, la lisis de especies de *L. lactis* fue inhibida, independientemente de la cepa utilizada (Hannon y col., 2004 citado por Lortal y Chapot-Chartier, 2005), lo que indica que la composición del queso y la tecnología utilizada puede también influir en la inducción de la lisis. Cuando la lisis del *starter* se produce fácilmente, la proteólisis se incrementa, en particular el nivel de aminoácidos libres, y el sabor amargo se reduce (Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

Proteólisis

El sistema proteolítico desempeña un rol importante en el crecimiento de las BAL, las cuales son exigentes desde el punto de vista energético ya que necesitan una fuente de aminoácidos y péptidos externos, que son proporcionados por proteólisis de la caseína. *Lactococcus lactis* ha sido una de las BAL más ampliamente estudiadas en cuanto a su sistema proteolítico, estableciéndose como un modelo para la proteólisis de caseína y el transporte, regulación y degradación de péptidos (Savijoki y col., 2006).

En general las BAL poseen proteinasas y peptidasas, que cumplen una función importante en el desarrollo de la textura y características sensoriales durante la maduración en el queso. La degradación de la caseína por las BAL se inicia por una proteinasa ubicada en la pared celular, la cual libera péptidos que son esenciales para el desarrollo de las mismas. La mayoría de estos péptidos con

más de cinco residuos de aminoácidos, necesitan ser hidrolizados en aminoácidos libres y pequeños péptidos para ser transportados por un sistema de transporte de péptidos específicos y así ser utilizados en la célula. Además de su papel en el suministro de nitrógeno, las peptidasas bacterianas son responsables de la degradación de aminoácidos libres y pequeños péptidos que son precursores de compuestos aromáticos (Kunji y col., 1996; Christensen y col., 1999). Los aminoácidos por acción de amino-transferasas proporcionan alfa-cetoácidos los que pueden ser degradados (enzimáticamente o no) generando compuestos aromáticos (Engels y col., 2000; Smit y col., 2004 citados por Brandsma y col., 2008). Así por ejemplo, el flavour típico de quesos madurados como el Gouda o Cheddar depende de la degradación de aminoácidos ramificados y metionina. Los alfa-cetoácidos derivados de aminoácidos aromáticos son convertidos en compuestos que generan *flavour*, y son generalmente considerados como sabores no agradables en este tipo de quesos (Brandsma y col., 2008).

Lipólisis

La lipólisis juega un papel crucial en el desarrollo de sabor en una gran variedad de quesos y es causada por enzimas denominadas lipasas, que son hidrolasas que escinden los enlaces ésteres entre ácidos grasos y glicerol de los triacilglicéridos, produciéndose ácidos grasos libres, mono y diacilglicéridos (Fox y col., 2000). Las lipasas en el queso posiblemente se originan a partir de la leche, del cuajo, de los starters, NSLAB o cultivos adjuntos, y preparaciones exógenas de lipasas comerciales (Collins y col., 2003). Los niveles de ácidos grasos de cadena corta como el butírico, caprílico y caproico son importantes contribuyentes de sabor en muchas variedades de queso (Fox y col., 2000).

En las BAL la ubicación de la mayoría de estas enzimas es intracelular (Fernández y col., 2000), y se activan a un pH óptimo de 7-8,5 (Kamaly y col., 1990 citado por Fox y col., 2004). Debido a su disposición en la célula requieren una liberación a través de la autólisis celular lo cual genera de esta manera una máxima eficiencia en su actividad. Se ha demostrado la presencia de lipasas y esterases en cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, citrato positivos y subsp *cremoris* (Piatkiewicz, 1987 citado por Fox y col., 2004).

La lipólisis se limita en la mayoría de los quesos debido a que un ligero exceso de degradación de grasa puede causar rancidez o “sabor inapropiado” en el queso (Choisy y col., 1997 citado por Fox y col., 2004). Cuando la lipólisis es excesiva se considera indeseable y los quesos que contienen un nivel moderado de ácidos grasos libres pueden ser considerados como rancios por algunos consumidores (Fox y col., 2004).

Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados son especialmente propensos a la oxidación, que conduce a la formación de diversos aldehídos insaturados que son de sabor fuerte y provocan el defecto del sabor denominado rancidez oxidativa (Fox y col., 2000).

Antecedentes en estudios sobre BAL en ROU

Durante esta última década existe una creciente demanda por quesos artesanales, en que los consumidores requieren aquellos productos específicos de procedimientos tradicionales e incluso estrictamente vinculados a su territorio (Aquilanti y col., 2013; Di Cagno y col., 2007 citados por Velčovská y Sadilek, 2015). Surge el interés también por aspectos asociados a la salud y la identidad de su origen. Este último aspecto a diferencia de otros países no está muy desarrollado en el nuestro, pero sí se está caminando en tal sentido.

Por su parte, Bermúdez y Reginensi (2014), señalan que en referencia a la elaboración de quesos en particular, existen dos enfoques principales, por un lado la imitación de productos de otros países, principalmente europeos y por otro, el desarrollo de productos auténticos (genuinos) en base a la re-ingeniería de aspectos biológicos específicos asociados a la "territorialidad". Se incluye aquí lo de producto regional específico (Paxon, 2010 citado por Bermúdez y Reginensi, 2014). Estos autores han desarrollado un fermento para aplicación en la elaboración de queso con leche ovina, caracterizando bacterias ácido lácticas nativas (Reginensi y col., 2013).

Actualmente en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR, se está trabajando en una línea de investigación en la que ha aislado BAL de quesos artesanales, leche cruda y suero fermento de productores de la zona de Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay. El objetivo inicialmente fue generar una colección de BAL nativas, para disponer de ellas y estandarizar la elaboración de Quesos Artesanales. A su vez, desarrollar procedimientos con estas BAL previamente caracterizadas desde el punto de vista tecnológico y que puedan inhibir microorganismos patógenos y alterantes en productos lácteos fermentados. En este marco en el estudio realizado por Fraga y col., (2013), se tuvo como objetivo evaluar la producción de bacteriocinas, con el fin de seleccionar aquellas posibles para la elaboración de quesos. Se obtuvieron 509 aislamientos de cultivos, y 5 de ellos fueron productores de bacteriocinas identificados como *Enterococcus durans*, dos *Lactobacillus casei* y dos *Lactococcus lactis*. Estos resultados son prometedores para poder utilizar estas cepas nativas en la elaboración de quesos u otros productos favoreciendo la obtención de productos seguros (Fraga y col., 2013).

Actualmente, se plantea la continuación de esta línea de trabajo con la caracterización tecnológica de una de estas BAL, así como la evaluación del efecto antimicrobiano frente a *Listeria* sp.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de bacteriocinas y el efecto antagónico de *Lactococcus lactis* nativo frente a *Listeria innocua* en medio de cultivo y leche. Caracterizar tecnológicamente la cepa de *Lactococcus lactis* nativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la cinética de crecimiento y producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo en medio de cultivo y leche.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* nativo sobre *Listeria innocua* en medio de cultivo y leche.
- Evaluar las siguientes propiedades tecnológicas: capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico, producción de diacetilo y actividades acidificante, autolítica, proteolítica y lipolítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizó la cepa nativa identificada como *Lactococcus lactis* (GU967439). Ésta es una BAL nativa, aislada de leche cruda utilizada para la elaboración de quesos artesanales en la zona de Colonia, Uruguay (Fraga y col., 2013). Además González, (2012); Fraga y col., (2013) indicaron que esta BAL posee efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* y que el mismo es debido a sustancias de naturaleza proteica, presuntivamente bacteriocinas. Actualmente, se están realizando estudios para la identificación de dicha sustancia.

La cepa de *L. lactis* nativo fue mantenida congelada a -20°C en caldo Mann-Rogosa-Sharpe (MRS, HiMedia®, India) suplementado con glicerol (15%, v/v). Para el descongelado de la cepa, la misma se sembró en tubos con 5 mL de caldo MRS (HiMedia®, India) y se incubó a 30°C/24 hs en microaerofilia. Posteriormente se sembraron por estrías en placas con MRS agar (HiMedia®, India) y se incubaron a 30°C/24 hs en microaerofilia (González, 2012). La pureza de la cepa se confirmó mediante el examen macroscópico de las colonias (pequeñas, circulares, translúcidas a blanquecinas), tinción de Gram (cocos, Gram positivos, esféricos-ovoides únicos o agrupados en pares o en cadenas) y prueba de catalasa negativa (Teuber, 2009). Como medio de cultivo en los ensayos *in vitro* se utilizó caldo MRS (HiMedia®, India) incubado a 30°C en condiciones de microaerofilia.

En los ensayos de inhibición *in vitro* fue utilizado como indicador la cepa de referencia de *Listeria innocua*, *American Type Culture Collection* (ATCC) N° 33090 (Ammor y col., 2006). Esta cepa también fue utilizada en los ensayos de actividad antagonista en co-cultivos con la cepa de *L. lactis* nativo, la utilización de *L. innocua* como alternativa a la utilización de *L. monocytogenes* es considerado un modelo adecuado ya descrito por algunos autores (Hugas y col., 1995; Steg y col., 1995, citados por Weiss, 2005). Se requieren menores condiciones de bioseguridad y también algunos autores sugieren la utilización *L. innocua* porque presenta mayor resistencia a condiciones de estrés ambiental, como por ejemplo, al tratamiento con nisina y calor (Kamat y Nair, 1996; Friedly y col., 2008). La cepa mantenida a -20°C en caldo Brain Heart Infusion, (BHI) (HiMedia®, India) suplementado con glicerol (15%, v/v), fue sembrada en 5 mL de BHI suplementado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura, (Ye) (HiMedia®, India), incubándose a 37°C/24 hs en aerobiosis. Posteriormente, se sembró por estrías en placas de TSA, (HiMedia®, India) incubándose a 37°C/24 hs en aerobiosis. La pureza se confirmó mediante el examen macroscópico de las colonias (no pigmentadas, redondas, transparentes, ligeramente convexas con una superficie lisa, bordes enteros y aspecto central cristalino), tinción de Gram (bacilos cortos Gram positivos, lados paralelos y extremos romos, generalmente solos o en cadenas cortas) y prueba de catalasa positiva (McLaughlin y Rees., 2009). Para el crecimiento de este microorganismo se utilizó caldo BHI+Ye (HiMedia®, India) e incubado a 37°C/24 hs en aerobiosis. La evaluación de inhibición *in vitro* se realizó

utilizando BHI+Ye adicionado de Agar (1.5% p/v, HiMedia[®], India) (BHIA + Ye) y se incubaron a 37°C/24 hs en aerobiosis.

Los ensayos en leche fueron realizados utilizando leche en polvo descremada reconstituida al 10% (Conaprole, Uruguay), libre de inhibidores y esterilizada a 110°C por 10 minutos (*reconstituted skim milk* - RSM).

Cinética de desarrollo y producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo en medio de cultivo y leche

Cinética y producción de bacteriocinas en medio de cultivo

Para cumplir con este objetivo se determinó la curva de crecimiento del microorganismo en medio de cultivo MRS a 30°C/30 hs (Valbuena y col., 2008). Su actividad acidificante se realizó por la medición del pH (Moreno, 1995) y la cinética de producción de bacteriocinas a través del método “well diffusion” (Fraga y col., 2008, Perelmuter y col., 2008).

Curva de crecimiento y actividad acidificante

La curva de crecimiento se determinó en un matraz conteniendo 750mL de caldo MRS. El mismo fue sembrado con un cultivo de *L. lactis* nativo ajustando la turbidez en solución salina estéril (NaCl 0,85%) al 0.5 de la escala MacFarland, y posteriormente diluido de manera tal de alcanzar una concentración inicial de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Posteriormente se incubó a 30°C/30 hs en condiciones de microaerofilia. El crecimiento del microorganismo se evaluó a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 y 30 hs mediante el recuento en placas con agar MRS incubadas en las mismas condiciones. Cada recuento se realizó por duplicado.

Así mismo la actividad acidificante se evaluó en los mismos tiempos midiendo el pH (pH-metro, Oakton[®] pH 5 Acorn series).

Producción de bacteriocinas y expresión en unidades arbitrarias de actividad por mL (UA/mL)

La producción de bacteriocinas fue evaluada a través del método “well diffusion” en los mismos tiempos descritos en la curva de crecimiento y utilizando *Listeria innocua* (ATCC 33090) como microorganismo indicador (Fraga y col., 2008, Perelmuter y col., 2008). Además la producción de bacteriocinas se expresó en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) (Schillinger y Lücke, 1991).

La técnica de “well diffusion” se realizó de la siguiente manera: en cada tiempo evaluado durante la curva de crecimiento se tomaron alícuotas de 20 mL del cultivo, las que fueron centrifugadas a 10000 RPM por 15 minutos a 4°C (). Posteriormente fueron esterilizadas por filtración utilizando membranas de 0,22 µm de diámetro (PVDF, Millipore®, Merck®, Brasil) obteniendo así un sobrenadante libre de células (SLC) de cada uno de los tiempos de la curva. A continuación alícuotas de 1 mL de cada SLC fueron colocadas en tubos tipo eppendorf estériles y se ajustó el pH a 6,5 con NaOH 1M. Por último, para determinar el número de UA/mL se utilizó el método de dilución seriada, así el SLC ajustado a pH 6,5 fue diluido sucesivamente en proporción 1:1 en PBS (solución fosfato 0.01M y NaCl 0.15M), obteniéndose las diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc. las que fueron sembradas en las placas con el microorganismo indicador ya mencionado.

Para la preparación de las placas de pocillos con el indicador, cilindros metálicos estériles fueron colocados en placas de Petri. Se utilizó un matraz conteniendo 50 mL de BHIA+Ye el cual fue sembrado con 1mL de una dilución (1/1000) de un cultivo *overnight* de *L. innocua* en BHI+Ye de manera de obtener una concentración aproximada a 1×10^6 UFC/mL en cada placa. Este medio conteniendo así el microorganismo indicador se fraccionó en las placas de Petri con los cilindros estériles y una vez solidificado el medio, los cilindros fueron retirados quedando así los pocillos formados en el agar.

Posteriormente se inoculó en cada pocillo 100µL de cada una de las diluciones de los SLC de cada tiempo. Como control positivo se inoculó 100µL de nisina (Nisaplin®, Danisco) en una concentración de 100mg/mL de PBS. Como control negativo se utilizó el mismo volumen de caldo MRS estéril ajustado a pH 6,5 con NaOH 1M (Figura 4).

Las placas se incubaron a 37°C/24 hs en aerobiosis. La lectura se realizó observando halos de inhibición y la producción de bacteriocinas de cada sobrenadante se expresó en UA/mL, definiéndose una UA como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición visible y multiplicándose por 10 para expresarla por mL (Schillinger y Lücke, 1991).

Cada ensayo se realizó por duplicado y se realizaron tres ensayos de manera independiente.

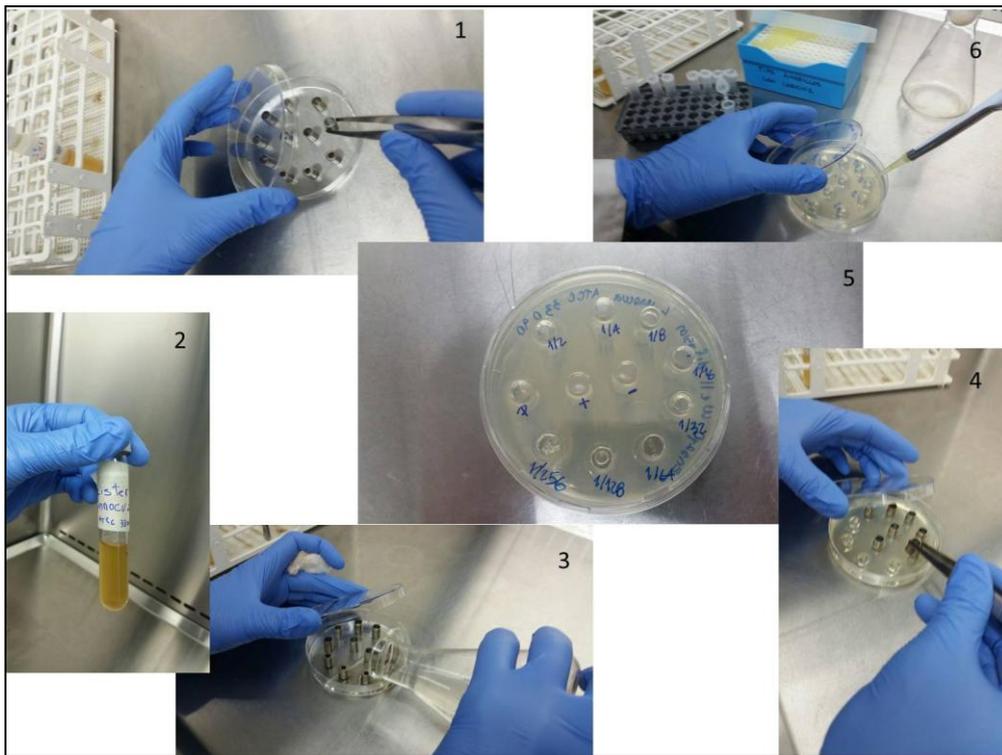


Figura 4. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana por la técnica “agar well difusión”. 1- Preparación de placas de Petri con cilindros estériles, 2- Inoculación de *Listeria innocua* en el medio de cultivo, 3-Colocación del medio de cultivo ya inoculado con el indicador, 4- Retiro de cilindros una vez solidificado el medio, 5- Placas listas para la inoculación, 6- Siembra de inóculos en los pocillos.

Cinética y producción de bacteriocinas en leche

La cinética, actividad acidificante y producción de bacteriocinas en leche se determinó de igual manera que lo descrito anteriormente para medio de cultivo (MRS), utilizando en este caso RSM al 10% y adicionando dos tiempos (16 y 20 horas) en la evaluación del crecimiento del microorganismo.

Efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* nativo sobre *Listeria innocua* en medio de cultivo y leche

Efecto antimicrobiano en medio de cultivo

Se evaluó el crecimiento de *L. innocua* en Caldo Soya Triptica (TSB, HiMedia®, India) a 35 °C/24hs en presencia de *L. lactis* GU967439, evaluando el efecto antimicrobiano de este último sobre *L. innocua* en función del tiempo de acuerdo a lo propuesto por Cosentino y col., (2012) con algunas modificaciones

Para el ensayo de co-cultivo un matraz conteniendo 50 mL de caldo TSB se inoculó con 5 ml de una suspensión bacteriana de cada cepa (*L. innocua* y *L. lactis*). Dicha suspensión se preparó a partir de cultivos frescos ajustando al 0.5 de la escala MacFarland obteniendo así una concentración final aproximada de 7 Log UFC/mL de cada cepa.

Posteriormente se incubó a 35°C/24 hs en aerobiosis, y el crecimiento se determinó mediante recuento en placa a las 0, 5, 10 y 24 hs de incubación, con la técnica de siembra en superficie en agar MRS para la cepa de *Lactococcus lactis* y agar PALCAM y OXFORD para *Listeria innocua*.

Como controles, se evaluó en paralelo, el crecimiento de forma independiente, para cada una de los microorganismos antes mencionados y en iguales condiciones a las que se evaluó el crecimiento en forma conjunta (medio de cultivo, temperatura, tiempo, dosis).

Paralelamente se midió pH en los mismos tiempos con pH-metro (Oakton Series pH 5 Acorn series) y por último a las 24 hs de crecimiento se tomaron muestras para determinación de actividad bacteriocinogénica por el método de "well diffusion" expresada en UA/mL, utilizando las técnicas ya descritas.

Este experimento se realizó por triplicado en forma independiente.

Efecto antimicrobiano en leche

De igual manera al ensayo anterior y conforme a Cosentino y col., (2012) se evaluó la capacidad de *L. lactis* nativo para inhibir el crecimiento de *L. innocua* durante su co-cultivo en RSM a 35°C por 24 hs.

Adicionalmente se evaluaron 2 concentraciones diferentes de *Listeria innocua*. Se utilizó una concentración baja (3 Log UFC/mL) debido a que es la dosis con la que se contamina un alimento generalmente y una alta dosis (6 Log UFC/mL) para comprobar si la bacteriocina era tan potente como para eliminar esta dosis. En el tratamiento A (dosis alta) un matraz con 100 mL de RSM fue inoculado a una concentración final de 6 Log UFC/mL y en el tratamiento B (dosis baja) se inoculó a una concentración final de 3 Log UFC/mL. Tanto en el tratamiento A como en el B la dosis de *L. lactis* nativo fue de 6 Log UFC/mL. Luego de 0, 5, 10, y 24 hs, alícuotas de cada tratamiento fueron diluidas en forma seriada y se sembraron en agar MRS para el recuento de *L. lactis* y en agar PALCAM para el recuento de *L. innocua*.

Como controles, se evaluaron en paralelo el crecimiento de cada microorganismo en las mismas concentraciones, medio y condiciones en las que se evaluó el crecimiento en forma conjunta.

Igual que lo descrito en medio de cultivo, se midió pH en los mismos tiempos y se determinó actividad bacteriocinogénica a las 24 hs expresándola en UA/mL utilizando las técnicas ya descritas.

Cada recuento se realizó por duplicado y se efectuaron tres ensayos de manera independiente.

Análisis estadístico

En ambos experimentos (medio de cultivo y leche) los recuentos, el pH y la actividad bacteriocinogénica se analizaron independientemente mediante ANOVA ($p < 0,01$) considerando los efectos fijos de tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento/tiempo.

Evaluación de propiedades tecnológicas de *Lactococcus lactis* nativo

Con el objetivo de conocer el perfil tecnológico de esta BAL y en un futuro implementar la aplicación de esta como cultivo adjunto en la elaboración de quesos, se evaluaron algunas de las propiedades tecnológicas más relevantes. Las mismas se realizaron mediante estudios *in vitro* e incluyen: capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico, producción de diacetilo y actividades acidificante, autolítica, proteolítica y lipolítica.

Actividad acidificante

La actividad acidificante se determinó a través de la medición de pH (Moreno, 1995) y la acidez titulable (NaOH, 0,111 N) expresada en grados Dörníc (Pinto y col., 1998) durante la curva de crecimiento en RSM, en las mismas condiciones utilizadas anteriormente durante la curva de crecimiento (Valbuena y col., 2008).

Producción de diacetilo

La producción de diacetilo fue determinada de acuerdo a lo propuesto por Franciosi y col., (2009) utilizando el método descrito por King (1948). Para ello un cultivo *overnight* de *L. lactis* en MRS a 30°C fue centrifugado (Sorvall ST16R, Thermo Scientific, USA) a 5000 RPM durante 5 minutos. El pellet obtenido fue lavado con PBS estéril (10mM, pH 7) y re-suspendido en 1 mL del mismo buffer. Esta suspensión celular fue utilizada para inocular al 1% (v/v) tubos con 10mL de leche entera UHT (Ultra High Temperature, Conaprole®, Uruguay). Posteriormente los tubos fueron incubados a 30°C por 24 hs en aerobiosis. Luego de este tiempo se adicionó 0,5mL de una solución de alfa naftol (1%, Dinâmica®, Brasil) e hidróxido de potasio (16%, Merck®, Alemania) a 1mL del cultivo y se incubó a 30 °C por 10 minutos. La reacción se consideró positiva cuando existió formación de un anillo rojo en la superficie del tubo (King, 1948). Como controles del experimento se utilizaron las cepas de *Klebsiella* spp (control positivo) y *E. coli* ATCC 25922 (Control negativo). El ensayo se realizó por triplicado y el experimento se repitió dos veces en forma independiente.

Capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico

Para determinar la tolerancia al NaCl y al ácido láctico se utilizó la técnica propuesta por Sánchez y col., (2005) con algunas modificaciones. Para ello se utilizaron 10mL de caldo MRS conteniendo 0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0% y 10% de NaCl. Paralelamente, el mismo volumen de caldo MRS se ajustó a pH 4.3, 4.6, 4.9, 5.2 y 5.5 con ácido láctico. Los caldos fueron inoculados al 1% (v/v)

con un cultivo *overnight* de *L. lactis* nativo e incubados a 30°C por 24hs. El medio MRS sin modificaciones fue utilizado como tratamiento control. Luego del período de incubación la densidad óptica fue medida a λ_{595} nm (espectrofotómetro UV SPD-6A). El ensayo se realizó por triplicado en forma independiente y se expresó como el porcentaje de crecimiento respecto al control de la siguiente manera:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{DO_{595} \text{ MRS modificado}}{DO_{595} \text{ MRS estándar}} \times 100$$

Donde DO_{595} MRS modificado es el valor de densidad óptica luego de la incubación en MRS modificado según la concentración de NaCl o pH y DO_{595} MRS estándar es la correspondiente al MRS sin modificar (control).

Actividad autolítica

La actividad autolítica de *L. lactis* nativo se evaluó de acuerdo a lo propuesto por Ouzari y col., (2002). Para ello un cultivo *overnight* en MRS a 30°C fue centrifugado a 5000 RPM por 5 minutos (Sorvall ST16R, Thermo Scientific, USA). El *pellet* obtenido fue lavado y resuspendido en una solución buffer de citrato de sodio (50 mM, pH 5,5, 0,5 M NaCl). Posteriormente la suspensión bacteriana se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica a λ_{650} nm igual a 0.6-0.8 (Espectrofotómetro UV SPD-6A). La actividad autolítica se determinó como el porcentaje de disminución de la absorbancia a λ_{650} nm en la suspensión bacteriana después de incubar a 30°C por 24 o 48 hs calculándose de la siguiente manera:

$$\% \text{ Autolisis} = \frac{(DO_0 - DO_{24/48})}{DO_0} \times 100$$

Donde DO_0 es el valor inicial de densidad óptica y $DO_{24/48}$ la densidad óptica luego de 24 o 48hs de incubación.

El ensayo se realizó por triplicado en forma independiente.

Actividad proteolítica extracelular

En cuanto a la actividad proteolítica extracelular se determinó por el método microbiológico en agar nutritivo suplementado con RSM (Agar Leche) descrito

por Franciosi y col., (2009). Para ello cultivos de *L. lactis* en MRS a 30°C *overnight* se centrifugaron a 5000 RPM por 5 minutos (Sorvall ST16R, Thermo Scientific, USA). El pellet obtenido fue lavado 2 veces con PBS estéril (10mM, pH 7), a continuación el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 1 mL del mismo buffer. Esta suspensión celular fue utilizada para inocular al 1% (v/v) tubos de 10mL de leche entera UHT que se incubaron a 30°C por 24hs en aerobiosis. Posteriormente alícuotas de 20uL de dicho cultivo fueron sembradas en las placas con agar leche y se incubaron a 30°C por 4 días. La actividad proteolítica se observó como una zona clara (halo) alrededor de las colonias correspondientes a la precipitación de la caseína. Como controles se utilizaron: cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (control positivo) y *E. coli* ATCC 25922 (Control negativo). El ensayo se realizó por triplicado y el experimento se repitió dos veces en forma independiente.

Actividad lipolítica

La evaluación de actividad lipolítica se realizó en dos medios de cultivo diferentes:

1- MRS agar + 0,1% Tween® 80 (SIGMA-ALDRICH, Francia) + CaCl₂ 0,01% (Pisano y col., 2015). En este medio de cultivo con Tween 80 como sustrato de las lipasas, las colonias con actividad lipolítica se ven rodeadas por un halo opaco debido a la precipitación de las sales de calcio en presencia de ácidos grasos libres.

2- Agar nutritivo suplementado al 1% (v/v) de crema de leche (38%). La ventaja de este medio es que emplea grasa láctea, la cual es uno de los sustratos utilizados por las BAL en los fenómenos de lipólisis de quesos (Buffa, 2006; Nieto- Arribas y col., 2009^b).

Las placas fueron sembradas por estriamiento o adición de 20 µl (spot) del cultivo de *L. lactis* obtenido de igual manera que lo descrito para actividad proteolítica extracelular. Posteriormente las placas se incubaron a 37°/72 hs. La lectura de las placas se realizó evaluando la aparición de halos alrededor de colonias crecidas. Como controles se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (control positivo) y *E. coli* ATCC 25922 (Control negativo).

El ensayo se realizó por triplicado y el experimento se repitió dos veces en forma independiente.

RESULTADOS

Cinética de desarrollo y producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo en medio de cultivo y leche

Los resultados del desarrollo y producción de bacteriocinas de *L. lactis* nativo en medio de cultivo y en leche se muestran en las Figuras 5 y 6 respectivamente.

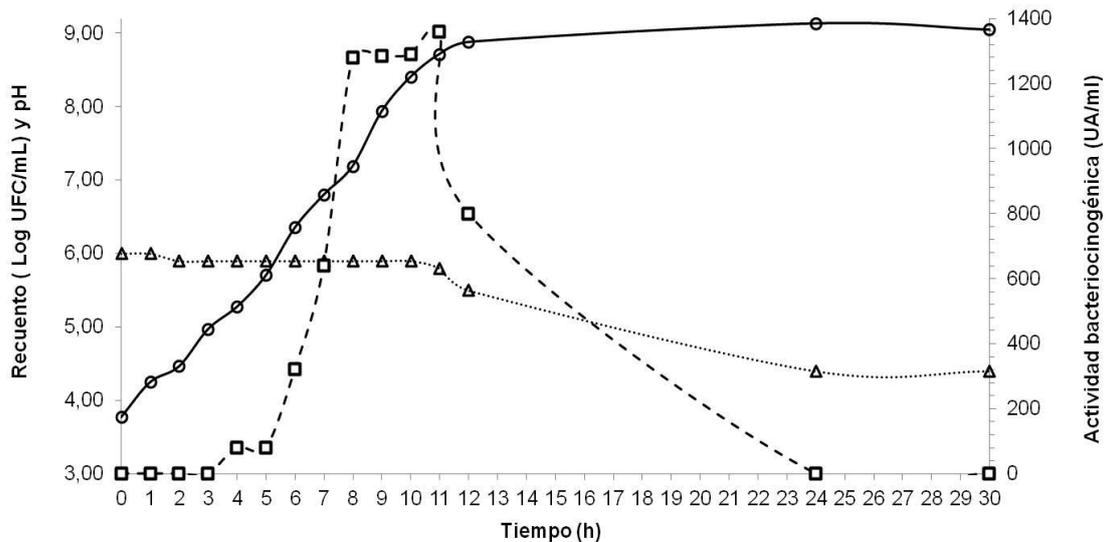


Figura 5. Curva de crecimiento, producción de bacteriocina/s y actividad acidificante de *L. lactis* nativo en caldo MRS a 30°C. Valores promedio de: Recuento bacteriano en Log UFC/mL (O), producción de bacteriocinas en UA/mL (□) y pH (Δ)

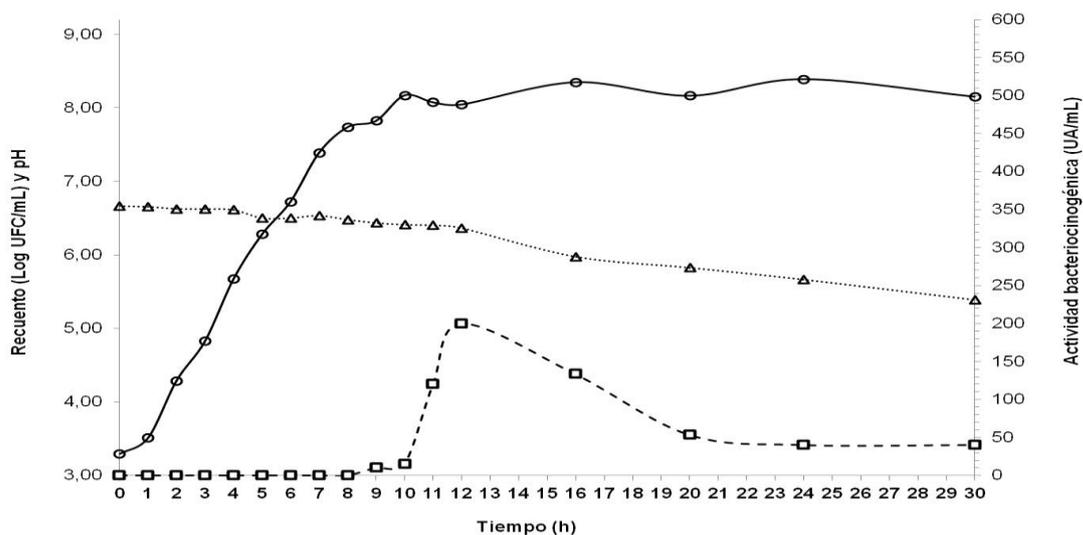


Figura 6. Curva de crecimiento, producción de bacteriocina/s y actividad acidificante de *L. lactis* nativo en leche (RSM) a 30°C. Valores promedio de: Recuento bacteriano en Log UFC/mL (O) y producción de bacteriocinas en UA/mL (□) y pH (Δ)

Efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* nativo sobre *Listeria innocua* en medio de cultivo

Los resultados del crecimiento de *L. innocua* en co-cultivo con *L. lactis* nativo en TSB a 35°C se indican en la Figura 7. La media de los recuentos, pH así como el análisis estadístico se indican el cuadro I.

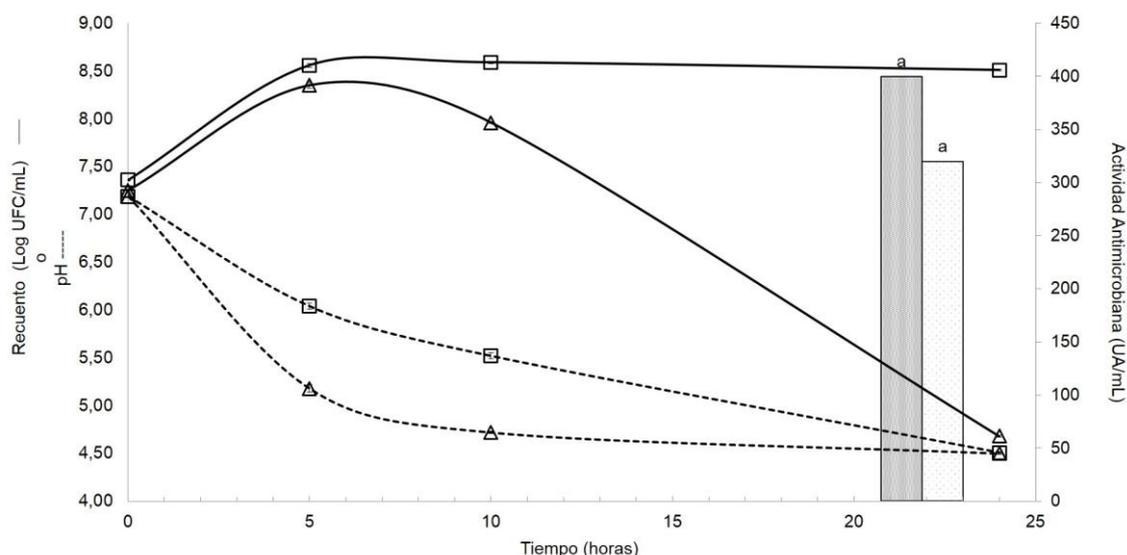


Figura 7. Crecimiento de *L. innocua* en co-cultivo con *L. lactis* nativo en TSB a 35°C Valores promedio del Recuento bacteriano en Log UFC/mL de: co-cultivo (∇), control de *Listeria innocua* (\boxtimes), pH co-cultivo (∇), pH control de *Listeria innocua* (\boxtimes). Actividad antimicrobiana en UA/mL de: co-cultivo (\blacksquare) y control de *L. lactis* (\square). **Letras diferentes (entre barras), indican diferencias significativas con $p < 0,01$

Cuadro I. Resultado de los recuentos de *L. innocua* (Log UFC/mL) y de pH en los tratamientos en co-cultivo y sus respectivos controles durante su crecimiento en TSB incubado a 35°C por 24 hs

Tiempo (hs)	Recuento (Log UFC/mL)		pH		
	Co-cultivo	Control <i>Listeria</i>	Co-cultivo	Control <i>Listeria</i>	Control <i>Lactococcus</i>
0	7,25±0,04 ^a	7,36±0,01 ^a	7,19±0,01 ^a	7,19±0,01 ^a	7,19±0,01 ^a
5	8,35±0,03 ^a	8,56±0,02 ^b	5,18±0,04 ^a	6,04±0,03 ^b	5,19±0,02 ^a
10	7,96±0,01 ^a	8,59±0,01 ^b	4,72±0,01 ^a	5,52±0,03 ^b	4,65±0,01 ^a
24	4,68±0,01 ^a	8,51±0,01 ^b	4,50±0,01 ^a	4,51±0,01 ^a	4,53±0,02 ^a

* Media de los valores \pm desvió estándar

**Letras diferentes (entre pares de datos), indican diferencias significativas con $p < 0,01$

Efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* nativo sobre *Listeria innocua* en leche

Los resultados del crecimiento de *L. innocua* en co-cultivo con *L. lactis* nativo en leche (RSM) a 35°C del Tratamiento A (dosis alta de *Listeria*) y B (dosis baja) se indican en la Figura 8 y 9 respectivamente.

Por otra parte, en los cuadros II y III se presentan los resultados del análisis estadístico de recuentos y pH. En ambos tratamientos (A y B) existieron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre tratamientos, tiempo y la interacción tratamiento tiempo.

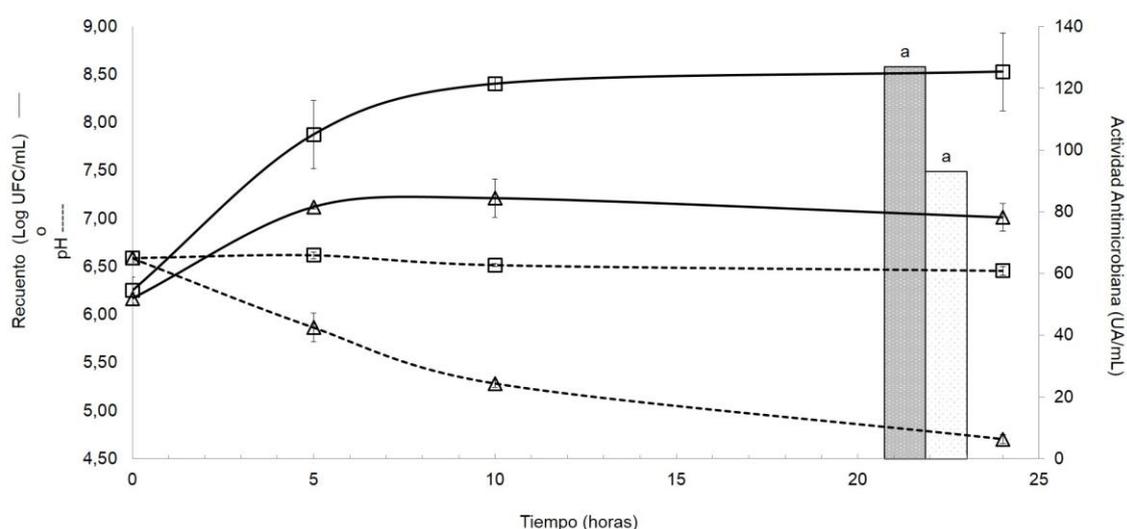


Figura 8. Crecimiento de *L. innocua* en co-cultivo con *L. lactis* nativo en leche (RSM) a 35°C, Tratamiento A (dosis alta de *Listeria*). Valores promedio del Recuento bacteriano en Log UFC/mL de: co-cultivo (∇), control de *Listeria innocua* (\boxtimes), pH co-cultivo (\triangle), pH control de *Listeria innocua* (\square). Actividad antimicrobiana en UA/mL de: co-cultivo (\blacksquare) y control de *L. lactis* (\square).

*Letras diferentes (entre barras), indican diferencias significativas con $p < 0,01$

Cuadro II. Resultado de los Recuentos de *L. innocua* (Log UFC/mL) y de pH en los tratamientos en co-cultivo (tratamiento A) y sus respectivos controles durante su crecimiento en RSM incubado a 35°C por 24 hs.

Tiempo (hs)	Recuento (Log UFC/mL)		pH		
	Co-cultivo	Control <i>Listeria</i>	Co-cultivo	Control <i>Listeria</i>	Control <i>Lactococcus</i>
0	6,17±0,06 ^a	6,25±0,14 ^a	6,59±0,05 ^a	6,59±0,05 ^a	6,59±0,05 ^a
5	7,12±0,02 ^a	7,88±0,36 ^b	5,87±0,15 ^a	6,62±0,03 ^b	5,89±0,16 ^a
10	7,21±0,20 ^a	8,40±0,07 ^b	5,28±0,04 ^a	6,52±0,02 ^b	5,31±0,05 ^a
24	7,01±0,14 ^a	8,53±0,40 ^b	4,70±0,05 ^a	6,46±0,05 ^b	4,74±0,07 ^a

* Media de los valores \pm desvió estándar

**Letras diferentes (entre pares de datos), indican diferencias significativas con $p < 0,01$

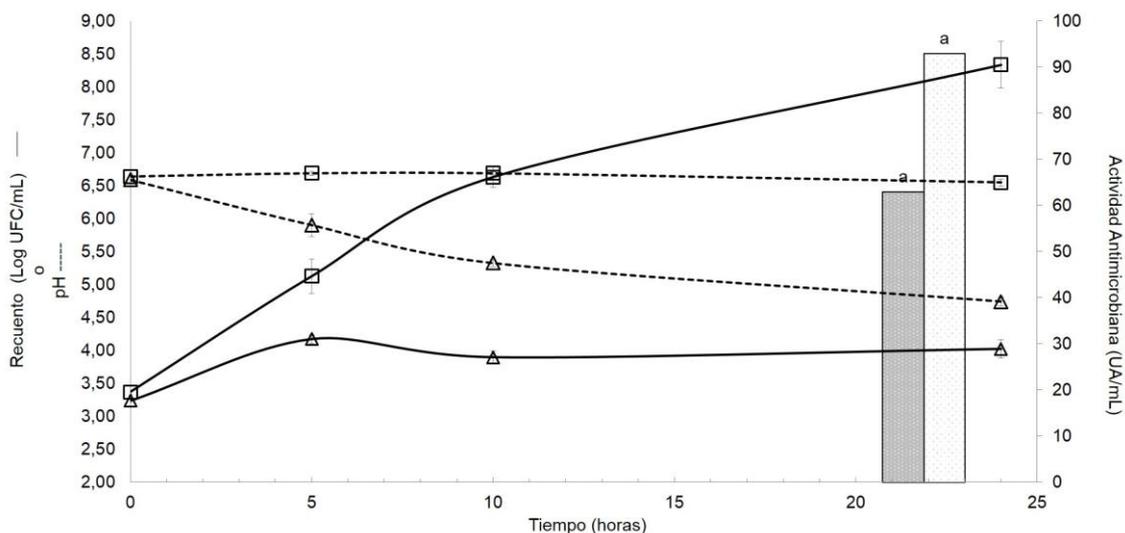


Figura 9. Crecimiento de *L. innocua* en co-cultivo con *L. lactis nativo* en leche (RSM) a 35°C, Tratamiento B (dosis baja de *Listeria*). Valores promedio del Recuento bacteriano en Log UFC/mL de: co-cultivo (∇), control de *Listeria innocua* (\square), pH co-cultivo (\triangle), pH control de *Listeria innocua* (\square). Actividad antimicrobiana en UA/mL de: co-cultivo (\blacksquare) y control de *L. lactis* (\square).

*Letras diferentes (entre barras), indican diferencias significativas con $p < 0,01$

Cuadro III. Resultado de los Recuentos de *L. innocua* (Log UFC/mL) y de pH en los tratamientos en co-cultivo (tratamiento B) y sus respectivos controles durante su crecimiento en RSM incubado a 35°C por 24 hs

Tiempo (hs)	Recuento (Log UFC/mL)		pH		
	Co-cultivo	Control <i>Listeria</i>	Co-cultivo	Control <i>Listeria</i>	Control <i>Lactococcus</i>
0	3,24±0,09 ^a	3,37±0,14 ^a	6,59±0,05 ^a	6,59±0,05 ^a	6,59±0,05 ^a
5	4,17±0,07 ^a	5,13±0,36 ^b	5,90±0,17 ^a	6,66±0,03 ^b	5,89±0,16 ^a
10	3,90±0,10 ^a	6,63±0,07 ^b	5,33±0,05 ^a	6,67±0,02 ^b	5,31±0,05 ^a
24	4,02±0,14 ^a	8,34±0,40 ^b	4,74±0,07 ^a	6,49±0,06 ^b	4,74±0,07 ^a

* Media de los valores \pm desvió estándar

**Letras diferentes (entre pares de datos), indican diferencias significativas con $p < 0,01$

Evaluación de propiedades tecnológicas de *Lactococcus lactis* nativo

Curvas de crecimiento y actividad acidificante

Los resultados de crecimiento y actividad acidificante de *L. lactis* nativo en leche (RSM) se muestran en la Figura 10.

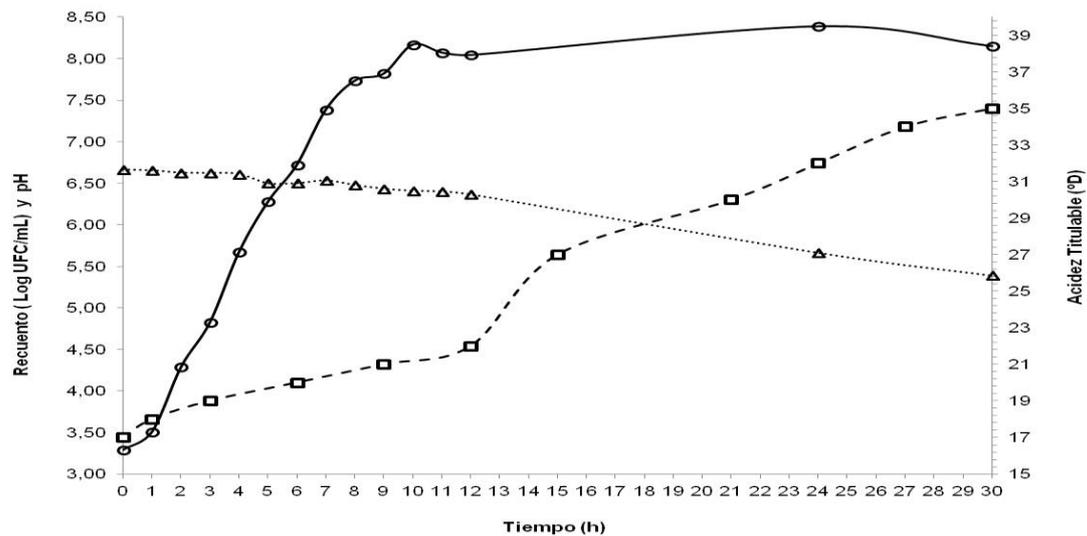


Figura 10. Curva de crecimiento y actividad acidificante de *L. lactis* nativo en leche (RSM) a 30°C. Valores promedio de: Recuento bacteriano en Log UFC/mL (O), acidez titulable en ° Dörníc (□) y pH (Δ)

Producción de diacetilo

Los resultados de la producción de diacetilo por la cepa de *L. lactis* nativo y los respectivos controles se indican en la Figura 11.

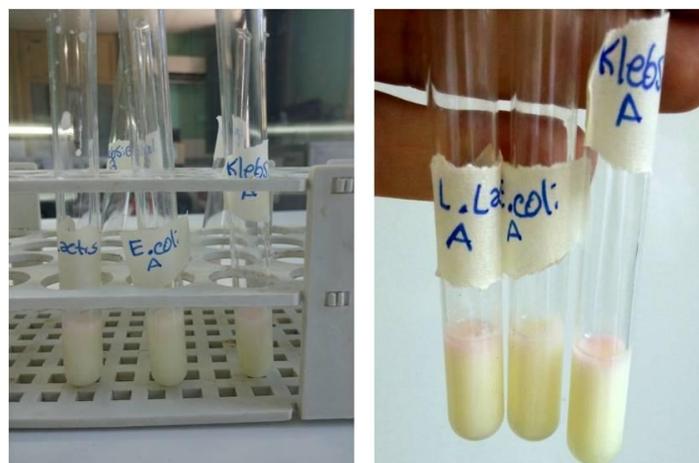


Figura 11. Producción de diacetilo por la cepas de *L. lactis*, *E. coli* ATCC 25922 (control negativo) y *Klebsiella* spp (Control positivo)

Capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico

En el cuadro IV se muestran los resultados de la tolerancia al NaCl y al ácido láctico por parte del *L. lactis*.

Cuadro IV. Capacidad de crecimiento de *L. lactis* nativo en medio MRS modificado con NaCl o ácido Láctico

Tolerancia a NaCl		Tolerancia al ácido Láctico	
Concentración de NaCl (%)	Crecimiento respecto al control ¹ (%)	pH (ajustado con ácido Láctico)	Crecimiento respecto al control ¹ (%)
0	100	6.5	100
4,0	5,7 ± 0,9	5,5	43,3 ± 2,8
4,5	2,0 ± 0,2	5,2	5,5 ± 2,1
5,0	2,1 ± 0,2	4,9	0,0 ± 0,0
5,5	0,9 ± 0,4	4,6	0,0 ± 0,0
6,0	1,0 ± 0,1	4,3	0,0 ± 0,0
10,0	0,5 ± 0,5	-----	-----

¹Calculado como DO_{595nm} MRS modificado/ MRS control x 100. Los valores se expresan como la media ± desvío estándar

Actividad autolítica:

En el cuadro V se muestran los resultados de la actividad autolítica del *L. lactis* nativo.

Cuadro V. Porcentaje de autólisis de *L. Lactis* nativo a 30°C a las 24 y 48 horas de incubación

Tiempo	% de Autólisis*
24hs	14,54 ± 2,28
48hs	14,67 ± 2,51

*Los valores se expresan como la media ± desvío estándar

Actividad proteolítica extracelular y lipolítica:

En agar leche *L. lactis* nativo presentó actividad proteolítica extracelular observándose como una zona clara (halo) alrededor de las colonias (Figura 12 izquierda). Por otra parte no presentó actividad lipolítica en ninguno de los medios utilizados, MRS agar + 0,1% TWEEN® 80 + CaCl₂ 0,01% y agar crema de leche, (Figura 12 derecha).



Figura 12. Actividad proteolítica en agar leche (izquierda) de: *L. lactis* nativo (A), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B) y *E. coli* ATCC 25922 (C). Actividad Lipolítica en agar crema de leche (derecha) *L. lactis* nativo (A) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B)

DISCUSIÓN

Cinética de desarrollo y producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo en medio de cultivo

El conocimiento detallado de las características de desarrollo de cada cepa y su relación con la producción de bacteriocinas son necesarios para lograr la aplicación eficaz de cepas bacteriocinogénicas así como obtener la tasa más alta de producción de bacteriocinas en cada matriz.

En este trabajo el número máximo de células viables en MRS se obtuvo a las 12 hs de incubación (8,88 log UFC/mL), por lo que ese período se correspondería con el final de la fase exponencial para este microorganismo. En cuanto a la tasa de producción de bacteriocinas, ésta acompañó su crecimiento exponencial, detectándose a partir de las 4hs y observándose un título máximo de 1360 UA/mL a las 11hs de crecimiento (Figura 5). Estos resultados coinciden con lo reportado por Moreno, (1995) que estudió el crecimiento de 3 cepas de *Lactococcus lactis* productoras de bacteriocinas (ITAL 383, ATCC 11454, CNRZ 150), en caldo MRS a 30°C. En ese estudio se reportó la producción de bacteriocinas paralelamente al crecimiento celular, con un máximo aproximado a 3000 UA/mL a las 10 hs de incubación, coincidiendo con el máximo crecimiento celular. En concordancia con estos resultados varios autores han informado que la biosíntesis de bacteriocinas y particularmente de la nisina se produce durante la fase de crecimiento exponencial y que se ve afectada por el medio de cultivo (tipo y nivel de nutrientes) y las condiciones ambientales, entre otras (Powell y col., 2007; Settanni y col., 2008; Juncioni de Arauz y col., 2009). Además, una brusca disminución de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en las etapas finales de la fase de crecimiento exponencial ha sido demostrada para nisina y otras bacteriocinas. Esto coincide con lo observado en este trabajo, donde existió una brusca disminución a partir de las 12hs de crecimiento (pérdida de más del 40% de actividad) y que coincide además con el comienzo de la fase estacionaria (Figura 5). Así mismo Moreno, (1995) destaca una baja de la producción de bacteriocinas al inicio de la fase estacionaria y un cese de producción del más del 50% luego de las 24hs de incubación. Esta reducción en la actividad inhibitoria podría estar relacionado con el agotamiento de nutrientes, degradación de proteínas por peptidasas, adsorción de la bacteriocina a la célula productora. y/o diferentes efectos sobre la producción debido a un pH bajo, (Choi y col., 2000; Todorov y col., 2004; Todorov y col., 2007; Juncioni de Arauz y col., 2009 citados por Taheri y col., 2012). Otro factor importante a considerar es que la bacteriocina presente una baja estabilidad y que la actividad antimicrobiana decaiga rápidamente y no sea detectada, en este sentido se están llevando a cabo estudios para caracterizar dicha estabilidad.

En cuanto a las condiciones de los cultivos, varios estudios han sido realizados en medios complejos y en algunos residuos de la industria alimentaria y han demostrado que la producción de bacteriocinas depende de la composición del medio (Parente y Hill, 1992; Daba y col., 1993; Yang y Ray, 1994). Las bacteriocinas por lo general se producen en medios de crecimiento complejos

como el caldo MRS (utilizado en este trabajo), Caldo Triptona Glucosa Extracto de Carne (m-T.G.E.), medio todo propósito con Tween 80 ("all purpose tween=APT"), infusión cerebro corazón (BHI), caldo Tripticasa de soya con o sin extracto de levadura (TSB/TSB+YE) (Guerra y col., 2001). Por otra parte, De Vuyst y col., (1996) sugieren que una baja tasa de crecimiento o condiciones de crecimiento desfavorables pueden aumentar la producción de bacteriocinas.

Aunque el caldo MRS es considerado el medio de cultivo más utilizado para el crecimiento de BAL (Todorov y Dicks, 2005) ciertos componentes agregados, tales como carbohidratos, sales, agentes tensioactivos o agentes reductores de la tensión de oxígeno pueden interferir con la producción de bacteriocinas (Vázquez y col., 2004; Todorov, 2008; Castro y col., 2011 citados por Malheiros y col., 2015).

Con respecto a las condiciones ambientales, el rango de pH para la producción de bacteriocinas es cepa dependiente, siendo frecuentemente el pH óptimo para la producción menor al pH óptimo de crecimiento (Parente y Ricciardi, 1999). Según Chinachoti y col., (1997) el pH óptimo para la producción de bacteriocina es generalmente 5.5-6.0. Además sólo unas pocas bacteriocinas son producidas a pH inferior a 5,0 (Bárcena y col., 1998). Por otra parte, el pH afecta entre otros factores, la adsorción de la bacteriocina a la superficie de la célula productora (Taheri y col., 2012). En este sentido, varios estudios han demostrado que la liberación de éstas es un paso preliminar para conseguir una alta concentración de las mismas durante su producción o su posterior purificación (Bhunias y col., 1991; Yang y col., 1992 citados por Taheri y col., 2012).

En nuestro trabajo podría plantearse que la bacteriocina se adsorbiese a las células productoras. Ahora bien, la adsorción es un proceso dependiente del pH, siendo máxima a pH neutro y disminuyendo proporcionalmente al aumentar la acidez (Yang y col., 1992). Estas condiciones no ocurrieron ya que la actividad máxima se evidenció en el intervalo de pH de 6 a 5.8. En este sentido, es probable que la reducción en la concentración de bacteriocinas durante la fase estacionaria sea debida a la acción de ciertas peptidasas, o que exista una supresión de la producción de bacteriocina que lleva a una reducción en la tasa de producción. Así Kim y col., (1997) señalaron que la producción de nisina es inhibida cuando ésta llega a una alta concentración, aun cuando las células permanecen creciendo en el medio de cultivo.

Estos factores, así como la estabilidad de la bacteriocina producida deben ser evaluados para lograr una producción de bacteriocinas óptima para aplicaciones industriales.

Cinética de desarrollo y producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo en leche

Los resultados obtenidos mostraron que en esta matriz el número máximo de células viables se obtuvo a las 10 hs de incubación (8,17 Log UFC/mL) similar a lo observado en caldo MRS (8,88 Log UFC/mL a las 12hs).

En cuanto a la producción de bacteriocinas, la actividad se detectó desde las 9 hs de incubación y hasta el final del ensayo (30hs). La actividad máxima

alcanzada fue de 200 UA/mL a las 12 hs de incubación correspondiéndose con el final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria (Figura 6). En concordancia con estos resultados, De Vuyst y Vandamme, (1992) comprobaron que la nisina fue producida durante la fase exponencial de crecimiento de *L. lactis* NIZO 22186 y que dicha producción cesó completamente cuando las células entraron en la fase estacionaria. En este sentido, estos autores indican que la formación tardía de las enzimas necesarias para la modificación de pro-nisina puede ser responsable de los altos niveles de actividad detectados al final de la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria como ocurrió en el presente trabajo.

Luego de las 12 hs de incubación la actividad disminuyó más del 50% y se mantuvo en ese valor hasta el final de la incubación (Figura 6). Esto es similar a lo observado en caldo MRS, pudiendo deberse a las condiciones anteriormente mencionadas (agotamiento de nutrientes, baja estabilidad, degradación de proteínas por peptidasas, adsorción a la célula productora y/o diferentes efectos en la producción debido a un pH bajo).

Existen trabajos que indican la producción de bacteriocinas por cepas de BAL, específicamente de *L. lactis* en esta matriz (Moreno, 1995; Martinez., 1996; Guessas y col., 2005; Todorov y col., 2007; Simova y col., 2008). En nuestro trabajo si bien existió producción de la bacteriocina en leche, la actividad fue considerablemente menor en comparación a lo obtenido en medio de cultivo (7 veces inferior). Coincidiendo con este resultado, Todorov y col., (2007) utilizando una cepa de *Lactobacillus plantarum* (AMA-K) reportaron buen crecimiento pero baja producción de bacteriocinas en Leche (800 UA/mL) y menor producción comparada con medio de cultivo (BHI). Estos autores sugieren que podría deberse a que el medio de cultivo aporta un mayor nivel de nutrientes específicos para la producción de bacteriocinas. Por otra parte la menor producción detectada podría deberse a varios factores, como por ejemplo, la adsorción de las moléculas de bacteriocinas a los componentes de la leche (Chung y col., 1989 citado por Moreno, 1995). Así mismo Murray y Richard (1997) reportaron que la unión a proteínas es un fenómeno que puede causar una reducción significativa en la concentración de bacteriocina libre en los alimentos. En este sentido se ha reportado que la adición de caseína reduce la actividad de algunas bacteriocinas como la sakacina P, curvacina y nisina en medios sintéticos (Gänzle y col., 1999). Adicionalmente en otras matrices como el suero lácteo Guerra y col., (2001) han informado que el crecimiento y producción de bacteriocinas por *L. lactis* fueron inferiores a las obtenidas en caldo MRS.

En contraposición a lo observado en nuestro trabajo, Simova y col., (2008) estudiando la cinética y producción de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* BCM5 en medio de cultivo (M17) y leche (RSM, al 12%) reportaron un máximo recuento de células viables y actividad antimicrobiana a las 13 hs de incubación y además dicha actividad se mantuvo sin cambios durante 24 hs. En cuanto a la población de *Lactococcus* en leche fueron 4 veces superiores a los obtenidos en caldo M17, siendo la producción de bacteriocinas mayor en leche que en medio de cultivo (actividad máxima bacteriocinogénica de 2000 UA/mL-1).

Efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* nativo sobre *Listeria innocua* en medio de cultivo

El efecto antimicrobiano sobre *L. innocua* se evaluó mediante ensayos de co-cultivo con *L. lactis* nativo en caldo TSB a 35°C por 24 hs. Cada cepa se inoculó a una concentración final de 7 Log UFC/mL. Como controles se evaluaron en paralelo el crecimiento de cada cepa en las mismas condiciones.

Los resultados y su posterior análisis estadístico indicaron que existieron diferencias significativas ($p < 0.01$) en los recuentos de *Listeria innocua* en comparación con el tratamiento control. Dichas diferencias se encontraron en los tiempos 5, 10 y 24hs de incubación (Cuadro I). A las 5hs de incubación en ambos tratamientos (co-cultivo y control) existió crecimiento de *Listeria* (Figura 7). Sin embargo, en este tiempo existió 0,21 Log UFC/mL menos en el co-cultivo que en el control. A las 10 hs en el tratamiento control continuó aumentando el número de *Listeria*, mientras que en el co-cultivo disminuyó en comparación con el tiempo anterior. En este punto se observó en el co-cultivo 0,63 Log UFC/mL de *Listeria* menos que en el tratamiento control. Finalmente a las 24hs el recuento de *Listeria* en el co-cultivo fue 3,83 Log UFC/mL inferior con respecto al control y existió una reducción de 2,57 Log UFC/mL con respecto a la concentración inicial inoculada. En cambio, en el mismo lapso el tratamiento control presentó un incremento de 1,15 Log UFC/mL. (Cuadro I).

Con respecto al recuento de *L. lactis* nativo no existieron diferencias significativas ($p > 0.01$) entre el co-cultivo y el control. Estos resultados sugieren que el crecimiento de *L. lactis* no se vio afectado por la presencia de *Listeria innocua*.

En cuanto a la determinación de pH no se observaron diferencias significativas ($p > 0.01$) en los valores de pH entre el co-cultivo con respecto al control de *Lactococcus* en ninguno de los tiempos evaluados, por lo que la velocidad de acidificación de *L. lactis* no se vería afectada por la presencia de *Listeria*. (Cuadro I).

Sin embargo existieron diferencias significativas ($p < 0.01$) a las 5 y 10 hs entre el co-cultivo y el control de *Listeria* (Cuadro I). En este sentido las diferencias observadas podrían estar dadas por la menor velocidad de producción de ácido por parte del cultivo de *Listeria*, ya que a las 24 hs de incubación no existieron diferencias entre los tratamientos y todos presentaron pH de 4,5.

En cuanto a la relación entre la actividad antimicrobiana y el efecto del pH, en el co-cultivo se observó al final del experimento una reducción de 3,83 Log UFC/mL de *Listeria* en comparación con el control. Esta disminución podría ser explicada por la producción de bacteriocinas por parte de la cepa BAL y no deberse a la reducción del pH del medio ya que en el tratamiento control se observó en el mismo período y a pH 4,5 una alta concentración de *Listeria* (8 Log UFC/mL) (Cuadro I). Estos resultados muestran similitud con los expuestos por varios autores. Schmidt, (2007) observó una reducción significativa de *L. monocytogenes* en presencia de una BAL bacteriocinogénica con respecto a los controles. Los recuentos de *Listeria* a las 24hs en co-cultivo fueron de 6 Log UFC/mL, mientras que en el mismo período llegó a valores de 9 Log UFC/ml en el tratamiento control.

A su vez Yáñez, (2007) utilizó un co-cultivo de una cepa BAL no identificada productora de bacteriocina con *Listeria monocytogenes*. El inóculo inicial de la BAL fue de 5 Log UFC/mL y se utilizó 3 Log UFC/mL de *L. monocytogenes*. Esta autora observó que los recuentos de *Listeria* fueron 2,18 Log UFC/mL inferiores con respecto al control luego de las primeras 12 hs de incubación y 4,07 Log UFC/mL a las 24 hs. Además pudo comprobar que la bacteriocina producida tuvo un efecto bacteriostático frente a *L. monocytogenes* en las primeras 24hs; sin embargo, la efectividad de esta bacteriocina en la etapa final del experimento (72 hs), se vio notablemente disminuida. Así describe que un factor que podría limitar la eficacia de la bacteriocina frente a *L. monocytogenes*, es la capacidad de algunas cepas de *Listeria*, de desarrollar resistencia parcial o total a la acción de la bacteriocina.

En relación a la actividad bacteriocinogénica no existieron diferencias significativas entre la actividad detectada en co-cultivo (400 UA/mL) y el control (320 UA/ mL) (Figura 7).

Efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* nativo sobre *Listeria innocua* en leche

Con respecto al efecto antimicrobiano se evaluó la capacidad de *L. lactis* nativo para antagonizar el crecimiento de *L. innocua* durante su co-cultivo en RSM a 35°C/24 hs. Se utilizaron 2 tratamientos variando la concentración de *Listeria innocua*. El tratamiento A utilizando 6 Log UFC/mL y el tratamiento B con 3 Log UFC/mL. En A y B la dosis de *L. lactis* nativo fue de 6 Log UFC/mL. Como controles, se evaluaron en paralelo el crecimiento de cada uno de los microorganismos.

Los resultados y su posterior análisis estadístico indicaron que existieron diferencias significativas ($p < 0.01$) en los recuentos de *L. innocua* de ambos tratamientos (A y B) en comparación con los respectivos controles. Dichas diferencias se encontraron a las 5, 10 y 24hs de incubación (Cuadro II y III).

En el tratamiento A (6 Log UFC/mL de *Listeria*), este efecto se tradujo como un menor número de células viables alcanzado durante la fase exponencial de crecimiento con respecto al tratamiento control. En cuanto a la evolución del crecimiento de *L. innocua* la cepa creció durante las primeras 10hs tanto en co-cultivo como en el control para luego llegar a la fase estacionaria y permanecer sin cambios. No obstante valores inferiores se observaron en el co-cultivo a partir de las 5hs (Figura 8). Este efecto podría deberse a la producción de bacteriocinas, ya que según nuestros resultados el inicio de la producción de bacteriocinas en leche comienza a las 9hs con un pico máximo a las 12hs (Figura 6). En este tratamiento, el crecimiento de *L. innocua* a las 24hs resultó 1,52 Log UFC/mL menor con respecto al control. En cuanto a la concentración final (24hs) de *L. innocua* y en comparación con la concentración inoculada inicialmente, en el tratamiento A existió un incremento de 0,84 Log UFC/mL mientras que en el tratamiento control este aumento fue de 2,28 Log UFC/mL (Cuadro II).

Con respecto al tratamiento B (3 Log UFC/mL de *Listeria*), el efecto inhibitor del crecimiento (efecto bacteriostático) fue más acentuado ya que el

crecimiento de *L. innocua* a las 24hs fue 4,32 Log UFC/mL menos que el tratamiento control. Además, la concentración de *L. innocua* a las 24 hs en este tratamiento aumentó sólo 0,78 Log/UFC/mL con respecto al inóculo inicial, mientras que en el tratamiento control el incremento fue de 5 Log UFC/mL (Cuadro III).

Los resultados observados coinciden en parte con lo reportado por Cosentino y col., (2012), quienes utilizando *L. lactis* sp. *lactis* en co-cultivo en leche con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a concentraciones iniciales similares al tratamiento A, obtuvieron luego de 24 hs de incubación, diferencias en el recuento de *L. monocytogenes* en comparación con el control. El tratamiento de co-cultivo con la cepa bacteriocinogénica fue 4 Log UFC/mL menor con respecto al control, mientras que en nuestro trabajo esta diferencia no fue tan acentuada y el recuento de *L. innocua* fue sólo 1.52 Log UFC/mL menor al control. En cuanto a la concentración final de *Listeria*, estos autores reportan una reducción de 2 Log UFC/mL con respecto al inóculo inicial a diferencia del presente trabajo en el cual aumentó la concentración final de la misma (0,84 Log UFC/mL).

Adicionalmente y concordando con los resultados mencionados, Perin y col., (2013), utilizando una cepa de *L. lactis* productora de bacteriocina y una no bacteriocinogénica como control, observaron que el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 fue similar en los tratamientos donde esta crecía individualmente o co-cultivada con la cepa no bacteriocinogénica. En cambio, cuando creció en co-cultivo con la cepa bacteriocinogénica, los recuentos de *L. monocytogenes* a las 24 hs fueron 3 Log UFC/mL inferiores con respecto al control. Estos autores también informan una reducción leve de la concentración de *Listeria* a las 24hs en comparación al inóculo inicial, mientras que en el tratamiento control existió un incremento de 2 Log UFC/mL.

Por otra parte, el efecto antimicrobiano de cepas de BAL productoras de bacteriocinas también ha sido estudiado sobre otros patógenos. En este sentido, Guessas y col., (2005) estudiaron el efecto sobre *Staphylococcus aureus* al ser co-cultivado en leche con una cepa de *L. lactis diacetylactis* bacteriocinogénica. Estos autores trabajaron con concentraciones de 5 Log/UFC de *S. aureus* y 8 de *L. lactis* y reportan una disminución del crecimiento del patógeno en las primeras 8 hs en comparación al tratamiento control. Además observan una reducción considerable luego de las 24 hs de crecimiento obteniendo recuentos de *S. aureus* de 2 Log UFC/mL luego de las 48hs y atribuyendo el efecto a la combinación de bacteriocinas y reducción de pH.

En relación al crecimiento de *L. lactis* nativo, no existieron diferencias significativas ($p > 0.01$) en los recuentos entre los diferentes tratamientos con respecto al control en ninguno de los tiempos evaluados. Estos resultados sugieren que el crecimiento de *L. lactis* no se vio afectado por la presencia de *Listeria innocua*.

En cuanto a la determinación del pH, existieron diferencias significativas ($p < 0.01$) en ambos tratamientos (A y B) en comparación con los respectivos

controles. Dichas diferencias se encontraron a las 5, 10 y 24hs de incubación. No existieron diferencias entre los tratamientos A y B con respecto al control de *L. lactis* (cultivo individual). La media de pH en dichos tratamientos fue de 5.9, 5.3 y 4.7 a las 5, 10 y 24hs respectivamente (Cuadro II y III). Esta reducción del pH es debida a la incorporación de la cepa BAL nativa (producción de ácido láctico) ya que no existieron cambios en el pH del control de *Listeria*. El descenso en el pH del medio es considerado un factor importante para controlar el crecimiento de patógenos. Además, *L. monocytogenes* es una bacteria que ha demostrado, en diversos estudios, su resistencia a pH ácido, creciendo a pH entre 5,0-9,6 (pH óptimo cercano a 7,0). Algunos trabajos reportan que la bacteria puede crecer a pH 4,4 (Sorrells y col., 1989) y que puede existir una adaptación de esta bacteria a condiciones ácidas, mediante el fenómeno de respuesta ácido tolerante logrando sobrevivir a pH de 3,87 inclusive (Gahan y col., 1996). Como ya se ha mencionado es probable que la reducción del número de *L. innocua* en los tratamientos A y B sea en parte por un efecto independiente del grado de pH alcanzado (producción de bacteriocinas), al menos a las 10 hs de incubación donde la media de pH fue de 5.3 y existieron diferencias significativas en el recuento de *Listeria*. En concordancia, Cosentino y col., (2012) reportan valores de pH similares y concluyen que la inhibición no parecería estar correlacionada con la reducción en el pH durante las primeras 10 hs de fermentación, demostrando que la actividad antimicrobiana de las cepas no se debe a la producción de ácido orgánico.

Con respecto a la actividad bacteriocinogénica, a las 24hs fue detectada en todos los tratamientos (A, B y en el control de *L. lactis* individual) y el título en UA/mL fue similar al obtenido durante las curvas de crecimiento de *L. lactis* nativo. No existieron diferencias significativas en la actividad detectada (UA/mL) entre los distintos tratamientos. En contraposición a estos resultados Todorov y col., (2007) reportan que la introducción de células vivas o muertas de *Listeria innocua* en un cultivo de *Lactobacillus plantarum* AMA-K estimuló la producción de bacteriocinas por la BAL obteniendo una mayor producción.

En resumen, comparando los recuentos de *L. innocua* en los diferentes tratamientos con respecto a los controles, y teniendo en cuenta la capacidad de *L. lactis* de producir bacteriocinas en esta matriz, se podría inferir que parte de la actividad inhibitoria se debe a la producción de bacteriocinas. Estos resultados sugieren que la cepa bacteriocinogénica utilizada podría aplicarse potencialmente en leche para controlar el crecimiento de *Listeria*.

Evaluación de propiedades tecnológicas de *Lactococcus lactis* nativo

Curvas de crecimiento y actividad acidificante

Como ya se mencionó en el punto “Cinética de producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo en leche” los resultados obtenidos permitieron determinar que a las 10 hs de incubación (8,17 Log UFC/mL) se detectó el número máximo de células viables. En cuanto a la capacidad acidificante, los valores más bajos de pH y más altos de titulación se obtuvieron al final del período de incubación (30 hs), siendo de 5.39 y 35°D respectivamente (Figura 10). Desde un punto de vista tecnológico las BAL llevan a cabo la acidificación inicial de la leche lo que ayuda a la gelificación en los procesos de fermentación. Una disminución rápida del pH durante la etapa inicial de la elaboración del queso es de fundamental importancia ya que es esencial para la coagulación y la prevención o reducción del crecimiento de microbiota no deseable (Ayad y col., 2004). También promueve la actividad de renina (cuajo), apoya la expulsión de suero de la cuajada, estimula la solubilización del calcio micelar y, por tanto, contribuye a la textura del queso obtenido (Herrereros y col., 2003).

En nuestro estudio la capacidad acidificante de *L. lactis* nativo fue baja debido a que el pH no disminuyó a valores de 5,3 o menores en las primeras 6 horas de fermentación, valor considerado al momento de diferenciar entre cepas rápidamente acidificantes de las de baja capacidad acidificante. Resultados similares son reportados por Ma y col., (2011), quienes estudiaron la capacidad acidificante en 21 cepas de *L. lactis* aislados de leches fermentadas naturales y concluyen que ninguna de las cepas fue considerada como rápidamente acidificantes. A su vez, Özkalp y col., (2007) estudiaron la actividad acidificante de 50 cepas de *Lactococcus lactis*, de las cuales 49 fueron consideradas como lentas en la producción de ácido, respaldando los resultados de los trabajos mencionados anteriormente. Si bien las cepas con capacidad de acidificar rápidamente son buenas candidatas para ser utilizadas como *starters* en productos fermentados, aquellas que producen ácido lentamente, como lo observado en este trabajo, se pueden utilizar como cultivos adjuntos en función de sus otras propiedades tecnológicas (Ayad y col., 2004).

Producción de diacetilo

La fermentación del citrato como se observa en la Figura 3, resulta en la producción de varios productos metabólicos tales como ácido acético, acetaldehído, acetoína y diacetilo, compuestos que intervienen directamente en el aroma. Los niveles de diacetilo son directamente proporcionales a los de citrato en leche (Quintans y col., 2008). Los resultados obtenidos indican que *L. lactis* nativo fue productor de diacetilo (Figura 11). Por lo anterior es posible su identificación a nivel de subespecie como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, al igual que lo reportado por Pisano y col., (2015) para la cepa 6/23898. El diacetilo es considerado un compuesto responsable de sabor y aroma muy importante en varios productos lácteos por lo que su producción

constituye una propiedad metabólica de interés industrial (Monnet y col., 1997). En este sentido los resultados obtenidos indican que *L. lactis* nativo podría ser utilizado como adjunto con este fin. Sin embargo son necesarios estudios complementarios para cuantificar su producción ya que la concentración adecuada de este metabolito difiere según el tipo de producto.

Capacidad de crecimiento a diferentes concentraciones de sal y de ácido láctico

Los estudios de resistencia al NaCl y a condiciones ácidas resultan de gran importancia para la industria ya que en varios procesos tecnológicos se expone a las bacterias *starters* a condiciones de estrés como las mencionadas. Por ejemplo, en quesos la presencia de ácido es necesaria para que se forme la cuajada y antes de la maduración generalmente se agrega NaCl en diferentes concentraciones dependiendo del tipo de queso (0.6–7%). Los dos agentes son inhibitorios no sólo para el desarrollo de microorganismos indeseables sino también para los *starter*. En este trabajo el efecto del NaCl y el ácido láctico influyeron en el crecimiento de *L. lactis* nativo. Incluso la más baja concentración de NaCl provocó una reducción en su crecimiento de más del 90% (Cuadro IV). Resultados similares han sido reportados por Dal Bello y col., (2012), quienes determinaron la tolerancia al NaCl de 20 cepas de *L. lactis* productores de bacteriocinas aislados de alimentos fermentados. Sus resultados concluyen que si bien la mayoría de éstas cepas (18) lograron crecer a una concentración de NaCl del 4% ninguna creció con más del 6%. En contraposición Pisano y col., (2015) reportan que 6 cepas de *L. lactis* bacteriocinogénicas fueron tolerantes a 6,5% de NaCl. Sin embargo, estos autores indicaron que ésta es una característica atípica en *L. lactis*, que se observa en cepas de origen lácteo y confirman la gran adaptabilidad de esta especie a diferentes condiciones ambientales.

En cuanto a la tolerancia al ácido láctico la capacidad de las BAL de producir y tolerar una concentración relativamente alta de ácido láctico es de gran valor selectivo, ya que las capacita a eliminar microorganismos competidores en ambientes ricos en nutrientes (Dabés y col., 2001). Así, generalmente, el crecimiento de las BAL continúa a través de la fermentación, hasta que el pH llega a un valor menor o igual a 5. En este trabajo, los resultados indicaron que el crecimiento se redujo más del 50% a pH 5.5, 95% a pH 5.2 y no existió crecimiento por debajo de pH 4.9 (Cuadro IV). En este sentido, la influencia del pH sobre el crecimiento de *L. lactis* ha sido estudiado por varios autores siendo 6.0 el óptimo para el crecimiento y producción de ácido (Bibal y col., 1988; Parente y col., 1994; Akerberg y col., 1998).

Actividad autolítica

Los resultados mostraron porcentajes de autólisis similares a las 24 y 48 hs, 14.5 y 14.7% respectivamente (Cuadro V). Estos valores resultan inferiores a los reportados por Dal Bello y col., (2012), quienes determinaron la capacidad de autólisis de 20 cepas de *L. lactis* productores de bacteriocinas aislados de

alimentos fermentados. En ese estudio describen que al menos un 15% de autólisis se observó en 5 cepas luego de 4 hs de incubación. Sin embargo, a las 24 hs reportan niveles entre 20-40% en todas las cepas utilizadas. Además, 6 cepas fueron particularmente notables, ya que oscilaron entre 41-50% de autólisis. Estos valores son de especial interés en cuanto a la aplicación de las BAL como *starters* en lácteos fermentados. La autólisis, como ya se ha mencionado, es un rasgo deseable durante la maduración del queso ya que mejora su textura y las propiedades sensoriales (Sallami y col., 2004 citado por Nieto-Arribas y col., 2009^b). La capacidad de provocar autólisis, con la posterior liberación de enzimas intracelulares, ha sido descrita como una propiedad dependiente de la cepa (El Soda y col., 2000; Wilkinson y col., 1994 citados por Nieto-Arribas y col., 2009^a). En relación a este concepto Franciosi y col., (2009) reportaron en su estudio que ésta varió considerablemente entre las cepas pertenecientes a la misma especie, pero que no hubo diferencias sustanciales entre los diferentes grupos.

Por otra parte, Ayad y col., (2004) clasificaron al género *Lactococcus* en tres grupos de acuerdo a su actividad autolítica: baja (1–14%), media (15–24%), y alta (25–37%). En ese estudio el 40% de las cepas de *Lactococcus* mostraron una baja actividad, un 41% media y sólo un 19% alta actividad autolítica. En general, se acepta que uno de las formas más eficaces para acelerar la maduración del queso es adicionar cepas altamente autolíticas y la selección de estas cepas debe basarse en sus perfiles enzimáticos (Ayad y col., 2004). En el presente estudio y de acuerdo a esta clasificación, *Lactococcus lactis* nativo posee una baja capacidad de autólisis, lo cual debería ser considerado al momento de elaborarse quesos con largo periodo de maduración.

Actividad proteolítica extracelular

Los resultados obtenidos indicaron que *L. lactis* nativo presentó actividad proteolítica extracelular, evidenciado por la presencia de halos en las placas de agar leche debido a la proteólisis de la caseína (Figura 12 izquierda A). El sistema proteolítico (peptidasas y proteinasas) de las BAL aplicadas en la elaboración del queso juegan un rol muy importante en el desarrollo de las características sensoriales en el queso madurado (Christensen y col., 1999). Como ya fue mencionado, la degradación de la caseína por las BAL se inicia por una proteinasa ubicada en la pared celular, la cual libera péptidos que son esenciales para el desarrollo de las mismas. Además de su papel en el suministro de nitrógeno, las peptidasas bacterianas son responsables de la degradación de aminoácidos libres y pequeños péptidos que son precursores de compuestos aromáticos (Kunji y col., 1996; Christensen y col., 1999). En este sentido, la actividad proteolítica es una propiedad significativa en los cultivos, ya que puede proporcionar el sustrato para enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos, que a menudo suele ser una limitante de la velocidad para el desarrollo del sabor (Yvon, 2006 citado por Ma y col., 2011). Sin embargo, es importante tener en cuenta que las cepas altamente proteolíticas no siempre son las más adecuadas para su uso como cultivos iniciadores, ya que la proteólisis excesiva puede causar la producción descontrolada de péptidos amargos y otros compuestos indeseables, o incluso

una excesiva hidrólisis de caseína que resulta en un producto final muy suave (Buffa y col., 2006 citado por Nieto Arribas y col., 2009^b).

El grado de actividad proteolítica de cepas de *L. lactis* es variable, así Pisano y col., (2015) reportaron que 7 de 10 cepas de *L. lactis* presentaron actividad proteolítica cuando se evaluaron en agar leche en las mismas condiciones que en el presente trabajo. A su vez, Dal Bello y col., (2012) reportaron actividad proteolítica alta en ocho cepas de *L. Lactis* mientras que cinco cepas mostraron actividad proteolítica media y siete cepas no la presentaron.

Si bien *L. lactis* nativo presentó cualitativamente actividad proteolítica, son necesarios estudios posteriores dirigidos a cuantificar esta actividad, lo que resultaría de gran interés a nivel tecnológico.

Actividad lipolítica

En la literatura se indica que las BAL son débilmente lipolíticas en comparación con muchos otros grupos de bacterias, por ejemplo *Pseudomonas*, *Bacillus*, y *Achromobacter* (Medina y col., 2004). Sin embargo algunas especies de BAL son capaces de hidrolizar la grasa de la leche o al menos algunos triglicéridos de la misma (Gobbetti y col., 1996). Así lipasas y estererasas de BAL *starters* o no *Starters* (NSLAB) (homo y heterofermentativas) pueden influir, en mayor o menor medida, en el desarrollo de sabor en el queso.

En este estudio *L. lactis* no mostró actividad lipolítica en ninguno de los medios ensayados (MRS agar/Tween80/CaCl₂ y agar crema de leche) (Figura 12 derecha). Pisano y col., (2015) estudiaron la actividad lipolítica de 10 cepas de *L. lactis* bacteriocinogénicas y ninguna de ellas resultó positiva cuando se evaluaron en agar tributirina. Mientras que solo una de ellas (3LC39) presentó actividad en agar MRS/Tween80/CaCl₂. Adicionalmente Nieto-Arribas y col., (2009)^b, quienes evaluaron la actividad lipolítica de *Lactobacillus* en agar crema, siendo sus resultados negativos en todos los casos. Del mismo modo, Pérez y col., (2003) reportaron que ninguna de las 130 BAL aisladas de quesos de Tenerife, pertenecientes a los generos *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* evidenció actividad lipolítica cuando se ensayaron en agar tributirina.

Las BAL utilizadas como cultivos iniciadores deberían tener preferentemente baja actividad lipolítica, ya que la descomposición de la grasa de leche durante la maduración debe ser leve con el fin de asegurar la producción de aroma sin generar sabor rancio (Herrero y col., 1996 citado por Nieto-Arribas y col., 2009^b).

El hecho que *L. lactis* nativo no haya presentado actividad lipolítica, podría resultar favorable para su aplicación en la industria como cultivo adjunto. Por lo cual, deberían realizarse estudios adicionales utilizando otras fuentes de lípidos y cuantificando su actividad para conocer con más detalle su perfil tecnológico.

CONCLUSIONES

L. lactis nativo presentó curvas de crecimiento similares en MRS y en leche.

La producción de bacteriocinas de *L. lactis* se evidenció en ambos medios. En MRS acompañó el crecimiento con un máximo título al final de la fase exponencial. En leche esta producción fue más demorada, con un máximo al inicio de la fase estacionaria. La concentración máxima de bacteriocinas en leche fue 7 veces menor que en MRS.

En cuanto al efecto *in situ* sobre *Listeria innocua*, la incorporación de esta BAL en un co-cultivo afectó su desarrollo de forma significativa (efecto bacteriostático) en ambos medios, concentraciones y períodos evaluados.

Respecto a las propiedades tecnológicas, presentó baja actividad acidificante, baja tolerancia al NaCl y al ácido láctico.

L. lactis fue productor de diacetilo, identificándose como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

La actividad autolítica de la cepa fue baja, exhibió actividad proteolítica y no actividad lipolítica.

La producción de bacteriocinas, de diacetilo, la baja capacidad acidificante y la no presencia de actividad lipolítica le otorgan a esta cepa un potencial uso como cultivo adjunto a nivel industrial con propiedades bioprotectoras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akerberg, C.; Hofvendahl, K.; Zacchi, G. (1998) Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ss *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:682-690.
2. Ammor, S.; Tauveron, G.; Dufour, E.; Chevallier, I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17:454-461.
3. Arqués, J.L. (2003) Tratamientos Combinados de Bacteriocinas y otros Sistemas Inhibitorios para la mejora de la seguridad de los Productos Lácteos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 187p.
4. Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S.; von Wright, A.; Ouwehand, A (Eds.) *Lactic Acid bacteria*, New York, Marcel Dekker. pp 1-66.
5. Ayad, E.H.E.; Nashat, S.; El-Sadek, N.; Metwaly, H.; El-Soda, M. (2004) Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology* 21:715-725.
6. Badis, A.; Guetarni, D.; Boudjema, B.M.; Henni, D.E., Kihal, M. (2004) Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21:579-588.
7. Balciunas, E.M.; Castillo, F.A.; Todorov, S.D.; Gombossy de Melo Franco, B.D.; Converti, A.; Pinheiro de Souza Oliveira, R. (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* 32:134-142.
8. Bárcena, J.M.; Siñeriz, F.; González de Llano, D.; Rodríguez, A.; Suárez, J.E. (1998) Chemostat Production of Plantaricin C By *Lactobacillus plantarum* LL441. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3512–3514.
9. Bedolla, B.S.; Dueñas, G.C.; Esquivel, I.I.; Favela, T.T.; Guerrero, H.R.; Mendoza, M.E.; Trujillo, C.M. (2003) Introducción a la Tecnología de Alimentos. Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos. México. Limusa. 142 p.
10. Beresford, T.P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N.L.; Cogan, T.M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11:259-274.
11. Bermúdez, J.; Reginensi, S. (2014) Alternativas para la producción de quesos ovinos diferenciados en Latinoamérica En: Guía práctica de producción ovina en pequeña escala en Iberoamérica, Andrés Ganzábal (ed). 219 p.
12. Bhunia, A.K.; Johnson, M.C.; Ray, B. (1987) Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-

- polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology* 2:319-322.
13. Bibal, B.; Goma, G.; Vayssier, Y., Pareilleux, A. (1988) Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28:340-344.
 14. Biswas, S.R.; Ray, P.; Johnson, M.C.; Ray, B. (1991) Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology* 57:1265-1267.
 15. Brandsma, J.B.; Floris, E.; Dijkstra, A.; Rijnen, L.; Wouters, J.; Meijer, W. (2008) Natural diversity of aminotransferases and dehydrogenase activity in a large collection of *Lactococcus lactis* strains. *International Dairy Journal* 18:1103-1108.
 16. Breukink, E.; Wiedemann, I.; Van Kraaij, C.; Kuipers, O. P.; Sahl, H. G., Kruijff, B. (1999) Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286:2361-2364.
 17. Buffa, M.; Morais, J.; Jiménez-Belenguer, A.; Hernández-Giménez, E.; Guamis, B. (2006) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw ewes milk for cheese making. *Milchwissenschaft* 61:404-407.
 18. Buist, G.; Karsens H.; Nauta, A.; Van Sinderen, D.; Venema, G.; Kok, J. (1997) Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2722–2728.
 19. Carr, F.; Chill, D.; Maida, N. (2002) The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Review in Microbiology* 28:281-370.
 20. Carro, S.; Zocche, F.; Jantzen, M.; Silveira, A.; Rosa, L.; Soares, G.; Da Silva, W. (2005) Actividad anti-*Listeria monocytogenes* de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos artesanales producidos en la región de Pelotas, R.S., Brasil. *Alimentaria* 361:73-76.
 21. Casaus, P. (1998) Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 363 p.
 22. Castellano, P.; Belfiore, C.; Fadda, S.; Vignolo, G. (2008) Review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in freshmeat produced in Argentina. *Meat Science* 79:483-499.
 23. Cavanagh, D.; Fitzgerald, G.; McAuliffe, O. (2015) From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment: a review. *Food Microbiology* 47:45-61.
 24. Chapot-Chartier, M.P. (1996) Les autolysins des bacteries lactiques. *Lait* 76: 91-109.

25. Chen, H.; Hoover, D.G. (2003) Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:82-100.
26. Chinachoti, N.; Hiromi, M.; Kenji, S.; Ayaaki, I. (1997) Utilization of xylose as an alternative carbon source for nisin Z production by *Lactococcus lactis* IO-1. *Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University* 42:171-181.
27. Christensen, J.E.; Dudley, E.G.; Pederson, J.A.; Steele, J.L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:217-246.
28. Cintas, L.M.; Casaus, P.; Havarstein, L.S.; Hernández, P.E.; Nes, I.F. (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2643-2648.
29. Citti, R. (2005) Aislamiento e Identificación de Bacterias Lácticas Bacteriocinogénicas de Leches y Quesos de Búfala de Venezuela: Actividad Antimicrobiana y Caracterización Bioquímica y Genética de sus Bacteriocinas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 447p.
30. Cleveland, J.; Montville, T.; Nes, I.; Chikindas, M. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Review article. *International Journal of Food Microbiology* 71:1-20.
31. Cogan, T.M. (1987) Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *Journal of Applied Bacteriology* 63: 551-558.
32. Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13:841-866.
33. Cosentino, S.; Fadda, M.E.; Deplano, M.; Melis, R.; Pomata, R.; Pisano, M.B. (2012) Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Disponibles en: <http://www.hindawi.com/journals/jbb/aip/376428.pdf> Fecha de Consulta: 20 de Agosto de 2015.
34. Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3:777-788.
35. Crow, V.; Curry, B.; Hayes, M. (2001) The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*. 11:275-283.
36. Cruz-Chamorro, L.; Puertollano, M.A.; Puertollano, E.; Álvarez de Cienfuegos, G.; de Pablo, M.A. (2006) In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. *Peptides* 27:1201-1209.
37. Daba, H.; Lacroix, C.; Huang, J.; Simard, R.E. (1993) Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of

- Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39:166-177.
38. Dabés, A.C.; Santos, W.L.M.; Pereira, E.M. (2001) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from meat products against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53:136-140.
 39. Dal Bello, B.; Cocolin, L.; Zeppa, G.; Field, D.; Cotter, P.; 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.
 40. De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. (1992) Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology* 138:571-578.
 41. De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. (1994) Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application. London. Chapman. 539 p.
 42. Deegan, L.H.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, P. (2006) Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16:1058-1071.
 43. Drider, D.; Fimland, G.; Hechard, Y.; McMullen, L.M.; Prevost, H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2):564-582.
 44. Drosinos, E.H.; Mataragas, M.; Nasis P.; Galiotou M.; Metaxopoulos J. (2005) Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology* 99:1314-1323.
 45. El Soda, M.; Madkor, S.A.; Tong, P.S. (2000) Adjunct Cultures: Recent Developments and Potential Significance to the Cheese Industry. *Journal of Dairy Science* 83:609-619.
 46. Favaro, L.; Penna, A.L.B.; Todorov, S.D. (2015) Bacteriocinogenic LAB from cheeses Application in biopreservation. *Trends in Food Science & Technology* 41:37-48.
 47. Fernández, L.; Beerthuyzen, M.M.; Brown J., Siezen, R.J.; Coolbear, T.; Holland, R.; Kuipers, O.P. (2000) Cloning, Characterization, Controlled Overexpression, and Inactivation of the Major Tributyrin Esterase Gene of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1360-1368.
 48. Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L. (2000) *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg. Ed. Aspen. 638p.
 49. Fox, P.F.; McSweeney, P.L.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (2004) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects*. 3^a ed. Londres, Academic Press. 640p.
 50. Fraga, M.; Perelmuter, K.; Delucchi, L.; Cidade, E.; Zunino, P. (2008) Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.

51. Fraga, M.; Perelmuter, K.; Giacman, S.; Zunino, P.; Carro, S. (2013) Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology* 33:801-804.
52. Franciosi, E.; Settanni, L.; Cavazza, A.; Poznanski, E. (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal* 19:3-11.
53. Friedly, E.C.; Grandall, P.G.; Ricke, S.; O'Bryan, C.A.; Martin, E.M.; Boyd, L.M. (2008) Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *Journal of Food Science* 73:174-178.
54. Gahan, C.G.; O'Driscoll, B.; Hill, C. (1996) Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3128-3132.
55. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Omar N.B. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120:51-70.
56. Gandhi, M.; Chikindas, M.L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows. *International Journal of Food Microbiology* 113:1-15.
57. Gänzle, M.G.; Weber, S.; Hammes, W. P. (1999) Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* 46:207-217.
58. García, P.; Rodríguez, L.; Rodríguez, A.; Martínez, B. (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology* 21:373-382.
59. Gardiner, G.; Ross, R.P.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G.; Stanton, C. (1998) Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2192-2199.
60. Gasson, M.J.; Benson, K.; Swindell, S.; Griffin, H. (1996) Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Le lait* 76:33-40.
61. Gobbetti, M.; Fox, P.F.; Stepaniak, L. (1996) Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Italian Journal of Food Science* 8:127-135.
62. González, A. (2012) *Lactococcus Lactis* Autóctono: Efecto Antilisterial y evaluacion de propiedades sensoriales en quesos tipo cuartirolo. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. 61 p.
63. Guerra, N.P.; Rua, M.L.; Pastrana, L. (2001) Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology* 70:267-281.
64. Guessas, B.; Hadadji, M.; Saidi, N.; Kihal, M. (2005) Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth by Lactic Acid Bacteria in Milk. *African Crop Science Conference Proceedings* 8:1159-1163.

65. Gurira, O.Z.; Buys, E.M. (2005) Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology* 22:159-168.
66. Helander, I.; Wright, A.; Mattila-Sandholm, T. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria: a review. *Trends in Food Science and Technology* 8:146-150.
67. Herreros, M.A.; Fresno, J.M.; Gonzalez, M.J.; Tornadijo, M.E. (2003) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal* 13:469-479.
68. Hill, A.R.; Kethireddipalli, P. (2013) Dairy Products: Cheese and Yogurt Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. pp 319-362
69. Holzapfel, W.H.; Geisen, R.; Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24:343-362.
70. Hugenholtz, J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:165-178.
71. Joerger, R.D. (2003) Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science* 82:640-647.
72. Juncioni de Arauz, L.; Faustino Jozala, A.; Gava Mazzola, P.; Vessoni Penna, T. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20:146-154.
73. Kamat, A.S.; Nair, P.M. (1996) Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *Listeria monocytogenes* by some meat processing treatments. *LWT-Food Science and Technology* 29:714-720.
74. Kandler, D. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224.
75. Kemperman, R.; Kuipers, A.; Karsens, H.; Nauta, A.; Kuipers, O.; Kok, J. (2003) Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1589-1597.
76. Kempler, G.M.; Mckay, L.L. (1981) Biochemistry and Genetics of Citrate Utilization in *Streptococcus lactis* ssp. *Diacetylactis*. *Journal of Dairy Science* 64:1527-1539.
77. Kim, W.S.; Hall, R.J.; Dunn, N.W. (1997) The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48:449-453.
78. Kimoto, H.; Nomura, M.; Suzuki, I. (1999) Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in cometabolism of citrate and glucose. *International Dairy Journal* 9:857-863.

79. King, N. (1948). Modification of the Voges-Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethylcarbinol plus diacetyl in butter cultures. *Dairy Industries* 13:860-866.
80. Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Review* 12:39-85.
81. Kunji, E.R.; Mierau, I.; Hagting, A.; Poolman, B.; Konings, W.N. (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:187-221.
82. Law, B.A.; Kolstad, J. (1983) Proteolytic system in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:225-245.
83. López, J.E.; Ochoa, A.; Santoyo, G.; Anaya, J.L.; Medina, E.; Martínez, M.; Loeza, P.D. (2008) Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 39:49-57.
84. Lortal, S.; Chapot-Chartier, M.P. (2005) Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese: a review. *International Dairy Journal* 15:857-871.
85. Lundén, J.; Tolvanen, R.; Korkeala, H. (2004) Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science* 87:E6–E11.
86. Ma, C.L.; Zhang, L.W.; Yi, H.X.; Du, M.; Han, X.; Zhang, L.L.; Li, Q. (2011) Technological characterization of lactococci isolated from traditional Chinese fermented milks. *Journal of Dairy Science* 94:1691-1696.
87. Malheiros, P.S.; Sant'Anna, V.; Todorov, S.D.; Franco, B.D. (2015) Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*2a. *Brazilian Journal of Microbiology* 46:825-834.
88. Marth, E.H.; Steele, J. (2001) *Applied Dairy Microbiology*. 2a ed. New York. Ed. Marcel Dekker. 736 p.
89. Martin, N.I.; Sprules, T.; Carpenter, M.R.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P.; Vederas, J.C. (2004) Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry* 43:3049-3056.
90. Martínez, B. (1996) Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, Asturias, España. 110p.
91. Martley, F.G.; Crow, V.L. (1993) Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal* 3:461-483.
92. Marugg, J.D.; Goelling, D.; Stahl, U.; Ledebøer, A.M.; Toonen, M.Y.; Verhøe, W.M.; Verrips, C.T. (1994) Identification and characterization of the alpha-acetolactate synthase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1390-1394.

93. Mataragas, M.; Metaxopoulos, J.; Galiotou, M.; Drosinos E.H. (2003) Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science* 64:265-71.
94. McLaughlin, J.; Rees, C.E.D. (2009) Genus I. *Listeria*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. De Vos, P.; Garrity, G.M.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey E.A (eds). 2a ed. New York, Springer, pp 244-257.
95. McSweeney, P.; Sousa, J. (2000) Biochemical pathway for the production of flavour compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80:293-324.
96. Medina, R.B; Katz, M.B; González, S; Oliver, G. (2004) Determination of esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria. *Public Health Microbiology* 268:465-470.
97. Ministerio de Salud Pública. (1994) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994 de fecha 05/07/1994. 2ª ed., Montevideo, IMPO. 454p.
98. Monnet, C.; Schmitt, P.; Divies, C. (1997) Development and Use of a Screening Procedure for Production of (alpha)-Acetolactate by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 793-795.
99. Mora, D.; Parini, C.; Fortina, M.G.; Manachini, P.L. (2000) Development of molecular RAPD marker for the identification of *Pediococcus acidilactici* strains. *Systematic and Applied Microbiology* 23:400-408.
100. Moreno, I. (1995) Ocorrencia e caracterizacao de bacteriocinas de *Lactococos* e sua utilizacao no processamento de queijo minas frescal. Tesis de Maestria en ciencias de alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de San Pablo. 75p.
101. Murray, M.; Richard, J.A. (1997) Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and pediocin Ach in fresh ground pork stored aerobically at 5 C. *Journal of Food Protection* 60:1534-1540.
102. Neves, A.R.; Pool, W.A.; Kok, J.; Kuipers, O.P.; Santos, H. (2005) Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis*-the input from in vivo NMR. *FEMS microbiology reviews* 29:531–554.
103. Nieto-Arribas, P.; Poveda, J.M.; Seseña, S.; Palop, L.; Cabezas, L. (2009b) Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control* 20:1092-1098.
104. Nieto-Arribas, P.; Seseña, S.; Poveda, J.M.; Palop, L.; Cabezas, L. (2009a) Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* 10:1505-1517.
105. Olasupo, N.A. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by plantaricin NA, an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum*. *Folia Microbiologica* 43:151-155.

106. Oppegård, C.; Fimland, G.; Thorbaek, L.; Nissen-Meyer, J. (2007) Analysis of the Two-Peptide Bacteriocins Lactococcin G and Enterocin 1071 by Site-Directed Mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2931-2938.
107. Osuntoki, A.A.; Gbenle, G.O.; Olukoya, D.K. (2003) Evidence for chromosomal determination of fungicidal activity in strain of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum* isolated from fermented foods. *Folia Microbiologica* 48: 56-58.
108. Ouzari, H.; Cherif, A.; Mora, D. (2002) Autolytic phenotype of *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional Tunisian dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 92:812-820.
109. Özkalp, B.; Özden, B.; Tuncer, Y.; Şanlıbaba, P.; Akçelik, M. (2007) Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. *Le Lait* 87:521-534.
110. Palles, T.; Beresford, T.; Condon, S.; Cogan, T.M. (1998) Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 85:147-154.
111. Papagianni, M. (2003) Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advance* 21:465-499.
112. Parente, E.; Hill, C. (1992) A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 73:290-298.
113. Parente, E.; Ricciardi, A. (1999) Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:628-638.
114. Parente, E.; Ricciardi, A.; Addario, G. (1994) Influence of Ph on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140MWC during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41:388-394.
115. Parra Huertas, R.A. (2010) Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos: a review. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 8:93-105.
116. Perelmuter, K.; Fraga, M.; Zunino, P. (2008) In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Applied Microbiology* 104:1718-1725.
117. 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.
118. Perin, L. M.; Miranda, R.O.; Camargo, A.C.; Colombo, M.; Carvalho, A.F.; Nero, L.A. (2013) Antimicrobial activity of the Nisin Z producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc08 against *Listeria monocytogenes* in

- skim milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65:1554-1560.
119. Pillidge, C.J.; Rallabhandi, P.; Tong, X.; Gopal, P.K.; Farley, P.; Sullivan, P. (2002) Autolysis of *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal* 12:133-140.
 120. Pinto, M.; Vega y León, M.; Pérez, N. (1998) *Métodos de análisis de la leche y derivados*. Valdivia, Ediciones Universidad Austral de Chile. 489p.
 121. Pisano, M.B.; Fadda, M.E.; Melis, R.; Ciusa, M.L.; Viale, S.; Deplano, M.; Cosentino, S. (2015) Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control* 51:1-8.
 122. Powell, J.E.; Witthuhn, R.C.; Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. (2007) Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal* 17:190-198.
 123. Quintans, N.G.; Blancato, V.; Repizo, G.; Magni, C.; López, P. (2008) Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications*, Research Signpost 65-68.
 124. Ramírez, J.C.; Rosas, P.; Velazquez, M.Y.; Ulloa, J.A.; Arce, F. (2011) Bacteria lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista fuente*. vol. 2, no 7.
 125. Ramos, A.; Jordan, K.N.; Cogan, T.; Santos, H. (1994) C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1739-1748.
 126. Reginensi, S., González, M., Bermúdez, J. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Brazilian Journal of Microbiology* 44: 427-430.
 127. Reis, J.A.; Paula, A.T.; Casarotti, S.N.; Penna, A.L.B. (2012) Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews* 4:124-140.
 128. Ribeiro, S.; Costa, M.C.; Dapkevicius, A.; Enes, M.L.; Silva, C.C.G. (2012) Technological characterization of bacteriocin producing strains isolated from a traditional cheese. 11^o encontro de química dos alimentos. Portugal, 4 p.
 129. Riley, A.P. (2005) *New developments in food policy, control and research*. New York. Nova Science. 185 p.
 130. Rodríguez, E.; Calzada, J.; Arqués, J.L.; Rodríguez, J.M.; Nuñez, M.; Medina, M. (2005) Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal* 15:51-57.
 131. Rodríguez, M.; Suárez, A.M.; Herranz Sorribes, C.; Martínez Corbacho, J.M.; Martínez Magro, M.I. (2000) Las bacteriocinas de las bacterias

lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria* 314:59-66.

132. Ross, R.P.; Morgan, S.; Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79:3-16.
133. Sánchez, J. I., Martínez, B., Rodríguez, A. (2005) Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 105:377-387.
134. Savijoki, K.; Ingmer, H.; Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:394-406.
135. Schillinger, U.; Lucke, F. (1991) El empleo de bacterias lácticas como cultivos protectores en productos cárnicos. *Fleischwirtsch* 1:35-40.
136. Schmidt, C.A (2007) Antagonismo en contra de *Listeria monocytogenes* de Nisina y de una Cepa Láctica, Encapsuladas en Alginato. Tesis Ingeniería de Alimentos, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 53p.
137. Serna, L.; Rodríguez De Stouvenel, A. (2006) Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis subs lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 9:40-45.
138. Settanni, L.; Moschetti, G. (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits: a review. *Food Microbiology* 27:691-697.
139. Settanni, L.; Valmorri, S.; Suzzi, G.; Corsetti, A. (2008) The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *Food Microbiology* 25:722-728.
140. Simova, E.D.; Beshkova, D.M.; Dimitrov, Z.P.; Simov, Z.I. (2008) In vitro and in situ Bacteriocin activity of lactic acid bacteria from Bulgarian dairy products and methods for making of *Lactobacillus* protective fermented milks with Bacteriocin inhibitory substances. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 14:28-42.
141. Smit, G. (2003) *Dairy Processing: Improving Quality*. Woodhead Publishing Elsevier 536 p.
142. Sobrino-López, A.; Martín-Belloso, O. (2008) Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products: a review. *International Dairy Journal* 18:329-343.
143. Sorrells, K.M.; Enigl, D.C.; Hatfield, J.R. (1989) Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52:571-573.
144. Stiles, M.E.; Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36:1-29.

145. Taheri, P.; Samadi, N.; Ehsani, M.R.; Khoshayand, M.R.; Jamalifar, H. (2012) An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 isolated from goat milk. *Brazilian Journal of Microbiology* 43:1452-1462.
146. Teuber, M. (2009) Genus II. *Lactococcus*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. De Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.H.; Whitman, W. (Eds). New York, Springer, pp 711-722.
147. Todorov, S.D.; Dicks, L.M. (2005) Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *Journal of Microbiology-seoul* 43:370-374.
148. Todorov, S.D.; Nyati, H.; Meincken, M.; Dicks, L.M. (2007) Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control* 18:656-664.
149. Toldrá, F. (2008) *Meat Biotechnonology*. New York, Springer. 500 p.
150. Valbuena, E.; Barreiro, J.; Sánchez, E.; Castro, G.; Kutchinskaya, V.; Briñez, W. (2008) Predicción del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* en leche descremada estéril en función a la temperatura. *Revista Científica FCV-LUZ* 18:745-758.
151. Velčovská, Š.; Sadilek, T. (2015) Certification of cheeses and cheese products origin by EU countries. *British Food Journal* 117:1843-1858.
152. Venema, K.; Venema, G.; Kok, J. (1995) Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiology* 3:299-304.
153. Vogel, R.F.; Ehrmann, M.A.; Ganzle, M.G. (2002) Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:631-638.
154. Weiss, A.; Hammes, W. (2005) Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon. *European Food Research and Technology* 222:343-346.
155. Yáñez, D.R.P.C. (2007) Caracterización de la producción de la sustancia tipo bacteriocina de una cepa láctica (BAL-C) antagonista de *Listeria monocytogenes*. Tesis Ingeniería de Alimentos, Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile. 63p.
156. Yang, R.; Johnson, M.C.; Ray, B. (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3355-3359.
157. Yang, R.; Ray, B. (1994) Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 11:281-291.
158. Zamora, L.M. (2003) Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral. Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA). Universidad de Girona, España. 255p.