
Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche.

Jorge Olivera
Licenciatura en Bioquímica

Tutor: Dra. Stella Reginensi

Unidad de Tecnología de Alimentos – Facultad de
Agronomía

Universidad de la República

Julio de 2011

Índice:

1.Resumen.....	1
2.Introducción.....	2
2.1 Antecedentes de las bacterias lácticas a través de la historia.....	2
2.2 Importancia de las bacterias ácido lácticas.....	3
2.3 Productos lácteos fermentados.....	4
2.3.1 Yogur.....	4
2.3.2 Kefir.....	5
2.3.3 Kumis.....	6
2.3.4 Bioyogur.....	7
2.3.5 Leche acidófila.....	8
2.3.6 Queso.....	8
2.4 Caracteres generales de las bacterias ácido lácticas.....	10
2.4.1 Géneros de bacterias ácido láctica.....	12
2.4.1.1 <i>Lactococcus</i> spp.....	12
2.4.1.2 <i>Lactobacillus</i> spp.....	12
2.4.1.3 <i>Leuconostoc</i> spp.....	12
2.4.1.4 <i>Pediococcus</i> spp.....	13
2.4.1.5 <i>Streptococcus</i> spp.....	13
2.5 Características deseadas en las bacterias ácido lácticas de acuerdo a los productos elaborados.....	14
2.5.1 Fermentación.....	14
2.5.1.1 Cultivos iniciadores.....	15
2.5.2 Proteólisis.....	16
2.6 Objetivo.....	17
2.6.1 Objetivo general.....	17
2.6.2 Objetivos específicos.....	17
3.Materiales y métodos.....	18
3.1 Microorganismos.....	18
3.2 Evaluación de propiedades de interés tecnológico.....	19
3.2.1 Estudio de la actividad acidificante.....	19
3.2.2 Cinéticas de crecimiento en leche UHT descremada estéril.....	19
3.2.3 Estudio de la actividad proteolítica.....	19
4.Resultados y discusión.....	22
4.1 Actividad acidificante.....	22
4.2 Análisis de crecimiento y actividad proteolítica.....	27
5.Conclusión.....	32
6.Bibliografía.....	34

1. Resumen.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) proveen características particulares en los productos lácteos como son: sabor, aroma, textura, cambios en las propiedades reológicas y acción específica contra microorganismos patógenos. Estos aspectos señalados son esenciales en el diseño de mezclas adecuadas de BAL para ser utilizadas por el sector quesero industrial y artesanal como iniciadores en la fabricación de sus productos lácteos fermentados. En los últimos años la implementación de nuevas tecnologías de la industria láctea ha requerido el empleo de cepas lácticas con características específicas. La proteólisis es uno de los parámetros enzimáticos esenciales en la maduración de quesos, la producción de péptidos pequeños y aminoácidos libres es una consecuencia de la actividad de las peptidasas del fermento o “starter” primario, y depende de la cepa bacteriana utilizada que posea la mayor capacidad de lisis. También la actividad acidificante de las cepas empleadas en los fermentos es de importancia en la elaboración de productos lácteos y en la selección de las mismas para ser integradas en los “starters”. Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar propiedades de interés tecnológico en cepas de BAL autóctonas aisladas de la cadena láctea provenientes de diferentes establecimientos bovinos, ovinos y caprinos. Se seleccionaron 17 cepas BAL autóctonas identificadas de la colección del laboratorio. En la primera etapa se evaluaron: actividad acidificante en 6 horas, cinéticas de crecimiento en leche UHT descremada estéril y estudio de la actividad proteolítica por electroforesis en geles de SDS-PAGE. La actividad acidificante se analizó bajo condiciones controladas, que simulan las empleadas en la tina de elaboración de queso. Se determinó la variación de pH en leche UHT descremada en un período de 6 h, utilizando como temperatura de incubación aquella utilizada normalmente bajo condiciones industriales para cada cepa BAL en estudio. Para las cinéticas de crecimiento se emplearon matraces Erlenmeyer con leche UHT descremada incubados a 37° C por 8 horas. El inóculo inicial se determinó a partir de caldos de MRS incubados por 24 horas, se transfirieron 100 µL a placas de Petri con agar MRS a partir de diluciones decimales y se incubaron de acuerdo a las exigencias de cada cepa BAL utilizada bajo condiciones aerotolerantes. La actividad proteolítica de cada una de las cepas se determinó durante la cinética de crecimiento mediante electroforesis (SDS-PAGE) hasta 72 horas de incubación. De las diecisiete cepas estudiadas seis mostraron importante capacidad acidificante: *Lactococcus lactis* (37, 82, 106 y 975), *Leuconostoc* (982) y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (196). Con respecto a la capacidad proteolítica, cinco cepas desarrollaron mayor proteólisis, dos del género *Lactobacillus* (66 y 71) y tres del género *Lactococcus* (82, 104 y 106). Las curvas de cinética de crecimiento permitieron identificar ocho cepas con fases de crecimiento exponencial prolongadas en el tiempo (entre cuatro y mas de ocho horas) entre las que se encuentran cuatro de las cepas con actividad proteolítica (66, 71, 104 y 106). Las cepas de *Lactococcus lactis* 37, 975 y 106 también presentan fase de crecimiento exponencial larga con lo cual aumenta su importancia como cepas acidificadoras. De las ocho cepas con fase de crecimiento exponencial de $\leq 4 - 6$ horas; las cepas *Lactococcus lactis* 82 y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 196 producen rápida acidificación y son las que presentan mayor actividad proteolítica al compararlas con las seis cepas restantes. Las cepas de *Pediococcus* evaluadas presentaron baja actividad proteolítica y la acidificación fue baja luego de seis horas de crecimiento. Estas características estudiadas en las diferentes cepas BAL aisladas son de importancia en el momento de seleccionar “starters” con diferentes usos en la elaboración de productos lácteos de acuerdo a sus propiedades tecnológicas aplicables en la industria láctea.

2. Introducción.

2.1 Antecedentes de las bacterias lácticas a través de la historia.

La elaboración de productos fermentados se piensa que se inició con pueblos nómades de las regiones de Turquía, Asia Central y Bulgaria que transportaban leche fresca en estómago de cabra (abomaso), obteniéndose una masa coagulada por la quimosina producida y las bacterias presentes en la leche, que facilitaba el transporte y la conservación de la misma lo cual hizo que esta práctica se conservara a lo largo de las generaciones. ⁽¹⁾

En el transcurso de los años el hombre se organizó en asentamientos fijos y fue necesario almacenar alimentos en los períodos de abundancia que en épocas de escasez eran consumidos, la fermentación de la leche y otros alimentos contribuyó a satisfacer este requerimiento. ⁽²⁾

Existen registros en las tumbas de los faraones del Antiguo Egipto que relatan el proceso de manufactura de los quesos, y en el Libro de Job del Antiguo Testamento también se hace referencia a éste. ^(2, 3) Hay otras menciones en las escrituras bíblicas que adjudican la longevidad de Abraham al consumo de leche fermentada y se indica que Moisés consideraba al vino y a la leche fermentada regalos de Dios. ⁽⁴⁾

Hace aproximadamente 2500 años en la cultura griega, Hipócrates y otros filósofos pensaban que había una relación entre la alimentación y la salud, empleaban el yogur como remedio para enfermedades estomacales, hepáticas e intestinales. ^(1,4)

En el siglo XVIII agricultores de África, Asia y Europa estudiaron el comportamiento de la leche cruda en los meses cálidos, encontrando que el sabor de la leche una vez coagulada era en algunas ocasiones agradable y comenzaron a seleccionar las de mejor sabor para inocular la leche del próximo día. ⁽⁵⁾

Entre 1857 y 1863 L. Pasteur estudió la fermentación ácido láctica y diez años más tarde J. Lister obtuvo el primer cultivo puro de una bacteria ácido láctica. En 1890 en Dinamarca fue el comienzo de la comercialización de cultivos iniciadores procedentes de leche cruda para la producción de quesos y leches fermentadas. ^(6, 7)

A principios del siglo XX E. Metchnikov estudió los efectos benéficos del consumo de leche fermentada al apreciar la longevidad y buena salud de los campesinos búlgaros que consumían grandes cantidades de yogur, y concluyó que las bacterias lácticas aportadas por la misma favorecían la flora intestinal y generaban sustancias que impedían el desarrollo de bacterias patógenas. A causa de su investigación Metchnikoff recibió el Premio Nobel en 1908. ^(1, 4, 8)

En 1919 O. Jensen realiza la primera clasificación de las bacterias ácido lácticas en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas, de acuerdo a los productos resultantes de la fermentación. ^(4, 6, 9)

En 1930 M. Shirota seleccionó una nueva cepa de *Lactobacillus casei* capaz de alojarse en el intestino y beneficiar a la salud del individuo al colaborar con su flora intestinal, esta cepa la llamó *Lactobacillus casei* cepa *shirota*, y con ella en 1935 elaboró la bebida láctea fermentada denominada Yakult. ^(1, 10)

Entre 1930 y 1940 se desarrolló el concepto de cultivos iniciadores de una única cepa pura y se descubrió que cultivos de bacterias lácticas infectados con bacteriófagos pueden desarrollar una fermentación lenta en quesos. ^(4, 6)

A partir de 1970 se empezó a estudiar el efecto probiótico de las bacterias lácticas, a causa de las investigaciones realizadas la industria se interesó en la elaboración de productos lácteos con efecto probiótico siendo en la actualidad una tendencia mundial en crecimiento. ^(1, 11)

Al presente las bacterias lácticas no sólo tienen importancia por su papel en la producción de alimentos fermentados sino también por la capacidad antimicrobiana de las bacteriocinas que éstas producen y que ha sido objeto de investigación durante las dos últimas décadas. ^(9, 12)

2.2 Importancia de las bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) no sólo resultan de importancia por su empleo a nivel de la industria alimentaria en la elaboración de productos fermentados que en forma genérica son: derivados lácteos, vegetales y frutas fermentadas, salchichas, carnes y pescado fermentado; también presentan importancia para la industria farmacéutica por la síntesis de sustancias denominadas nutracéuticos, cuyo consumo aporta un efecto benéfico sobre la salud humana, entre los cuales se hallan los exopolisacáridos, los cuales además se emplean en productos comestibles para mejorar su consistencia. ^(9, 13, 14)

Otros fines que tiene el cultivo de bacterias ácido lácticas es la obtención de saborizantes, espesantes, ácido láctico y bacteriocinas. En el caso de las bacteriocinas en la actualidad la industria las utiliza en los alimentos como bioconservantes logrando extender la vida útil de éstos y evitando el agregado de sustancias químicas para su conservación, aunque también se suele adicionar las bacterias lácticas para que ellas sinteticen las bacteriocinas en los productos. ^(9, 12, 15)

El empleo de bacterias lácticas en la elaboración de productos lácteos fermentados resulta central por las propiedades características de aroma, sabor y textura que éstas desarrollan, como también por la seguridad microbiológica a causa del bajo pH, presencia de bacteriocinas y otros productos con actividad antimicrobiana, ejemplo el peróxido de hidrógeno,

resultante de su metabolismo, lo que permite prolongar la vida útil del producto. (16, 17, 18, 19)

La industria alimentaria también ha mostrado interés en el uso de dichos fermentos por el efecto benéfico que estos microorganismos tienen sobre la salud del consumidor, dicho efecto puede deberse a productos resultantes de su actividad microbiana, este es el caso de los péptidos bio-activos generados en el proceso de proteólisis, o a los microorganismos en sí, como ocurre en los alimentos probióticos, productos que proveen microorganismos propios de la flora intestinal, a nivel del cual impiden la instalación de microorganismos exógenos como los patógenos, gracias a mecanismos como la influencia en el peristaltismo del intestino. (11, 20, 21, 22)

2.3 Productos lácteos fermentados.

Los productos lácteos fermentados tienen determinadas propiedades organolépticas que obedecen a los cultivos lácticos empleados para su producción, así como el proceso de manufactura, el tipo de leche ya que la composición de ésta varía de acuerdo al mamífero del que se obtiene y los aditivos que se empleen. (7, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29)

2.3.1 Yogur

De los derivados lácteos fermentados el yogur es el que presenta el mayor consumo a nivel mundial. (11, 23, 30) Se lo puede definir como una leche fermentada que resulta de la acidificación y coagulación de la leche por acción de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* que son los cultivos iniciadores empleados, y tiene un recuento bacteriano de al menos 10^7 u.f.c./mL de dichas bacterias lácticas y un pH $\leq 4,6$.

La elaboración de yogur requiere un proceso inicial de calentamiento de la leche entre 80 y 85 °C por 30 minutos o entre 90 y 95 °C durante 5 minutos para que se desnaturalicen sus proteínas solubles y se asocien con las micelas de caseína lo que favorece la formación de una red proteica. Al descender el pH por el agregado de los fermentos ocurre la coagulación de las caseínas de la leche aportando textura al producto final, también el proceso térmico sirve para destruir los patógenos presentes en la leche. (9, 23, 24) Luego del agregado de los cultivos iniciadores se incuban a 45°C por 4 horas. (7, 9, 23)

Inicialmente la acidificación es llevada a cabo por *St. salivarius* subsp. *thermophilus* que predomina con respecto a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pero debido al gradual descenso del pH por la acumulación del ácido láctico, la relación se invierte y pasa a dominar *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Cuando el pH se acerca a 4,6 las micelas de caseína se aglomeran formando la red tridimensional responsable de la textura y se obtiene un coágulo que retiene el suero. Es importante aclarar que si las cepas empleadas son productoras de exopolisacáridos estos también contribuyen a la viscosidad del producto final mejorando la textura del yogur. (7, 23, 31)

Los cultivos iniciadores se agregan en una relación 1:1 para que los parámetros de sabor, aroma, acidez y consistencia del producto final sean los adecuados y una vez que las características desarrolladas son óptimas se detiene la fermentación sometiendo el yogur a una temperatura menor a 8°C. (7, 23)

Con respecto a los tipos de yogures, éstos se pueden someter a un proceso de pasteurización que si bien destruye las bacterias lácticas aumenta la vida útil de los mismos, por lo que es posible distinguir entre yogures pasteurizados y no pasteurizados. El contenido graso permite diferenciar tres tipos de yogures: enteros con un contenido mayor al 2%, semidescremados en los cuales la materia grasa ronda entre 0,5% y 2% y descremados que tienen un contenido graso menor al 0,5%.

La consistencia es otro parámetro que aporta variación y se modifica de acuerdo a la concentración de sólidos totales y que permite las siguientes variantes: firmes, que tienen una consistencia semisólida y cuya fermentación ocurre en el recipiente de envasado, batidos, que son menos consistentes que los anteriores y se obtienen rompiendo el coágulo antes de envasarlo y yogures líquidos que contienen menos del 11% de sólidos totales y presentan la viscosidad mas baja. (11, 23)

2.3.2 Kefir

Otro derivado lácteo que se obtiene por fermentación es el kefir, una bebida láctea fermentada que se prepara con leche a la que se añade granos de kefir o un cultivo madre preparado a partir de éstos, dichos granos contienen una comunidad microbiana de levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas que fermentan la leche y generan productos tales como ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono y compuestos aromáticos, obteniéndose una bebida de sabor ácido, ligeramente gasificada y alcohólica. (32, 33)

El grano de kefir es una masa gelatinosa de color blanco amarillento que se parece a las florescencias del coliflor cuyo tamaño ronda entre 3 y 30 mm y consiste en una matriz llamada complejo kefirano formada por un polisacárido soluble denominado kefirano junto con otros azúcares complejos, proteínas y lípidos. Las bacterias lácticas y acéticas y las levaduras se encuentran en el grano de kefir en una asociación simbiótica en la cual intercambian sus productos metabólicos como fuente de energía y/o factores de crecimiento. La composición de la comunidad microbiana varía, habiendo algunos microorganismos que siempre se hallan y otros cuya presencia depende del origen del grano, el tiempo de cultivo y las condiciones del mismo. (32, 34, 35, 36)

En lo que respecta a las bacterias ácido lácticas de la microflora del kefir, se han identificado varias especies del género *Lactobacillus*, como: *Lactobacillus kefiranofaciens* y *Lactobacillus kefiri*, del género *Lactococcus* ha sido aislado *Lactococcus lactis*, también se ha reportado la presencia de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Enterococcus durans* y *Leuconostoc mesenteroides*. (32, 33, 35, 37, 38)

En relación a las especies de levaduras que se han aislado se hallan las pertenecientes al género *Kluyveromyces* como: *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces lactis*, otras son del género *Candida*, ejemplo: *Candida inconspicua*, también se han identificado especies del género *Saccharomyces*, tales como: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces unisporus*, además se han encontrado especies de otros géneros entre ellos: *Pichia*, *Torulaspota* y *Issatchenkia*. En cuanto a las bacterias ácido acéticas se han reportado miembros del género *Acetobacter* como *Acetobacter aceti* y *Acetobacter rasens*. (25, 32, 35, 36, 38)

El kefir es considerado un alimento probiótico ya que aporta microorganismos vivos que se establecen en el tracto digestivo y contribuyen en la digestión. Investigaciones realizadas indican que presenta efecto antitumoral, hipocolesterolémico e inmunomodulador y que tiene actividad antibacteriana sobre un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas, también se ha notificado actividad antifúngica. Desde el punto de vista nutricional aporta minerales, aminoácidos esenciales y vitaminas y sus proteínas son de fácil digestión. (32, 33, 37, 38)

En forma tradicional el kefir se prepara a partir de leche cruda que es hervida y luego enfriada hasta llegar a una temperatura entre 20 y 25 °C momento en que se agrega un 2 a 10 % de granos de kefir. A continuación se deja fermentar a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 18 a 24 horas, finalmente se filtran los granos de kefir y el kefir se conserva a 4°C. (32, 33, 34)

A nivel industrial la elaboración consiste en homogeneizar la leche cruda al 8% de materia seca, luego se pasteuriza a una temperatura entre 90 y 95 °C durante 5 a 10 minutos, después se enfría hasta los 18 a 24°C que es cuando se adiciona un 2 a 8% de los cultivos del kefir y se deja fermentar por 18 a 24 horas a una temperatura entre 18 y 24 °C. El coágulo resultante es envasado, luego madurado durante 24 horas entre 12 y 14 °C o 3 y 10°C y finalmente se almacena a 4°C. (33)

2.3.3 Kumis

El kumis es una bebida láctea fermentada levemente alcohólica, efervescente, de consistencia cremosa y sabor algo agrio. (27, 39) Tradicionalmente se elabora con leche cruda de yegua o camella aunque en la actualidad también se prepara con leche de vaca, es considerado un alimento probiótico con efecto benéfico sobre los sistemas: circulatorio, nervioso, endócrino e inmune. (1, 27, 40, 41)

La fermentación de la leche se atribuye a BAL y levaduras que forman parte de la microflora de la leche, las BAL son las mayores responsables de la fermentación e inciden en la acidez, la textura y el aroma del kumis, por su parte, las levaduras generan dióxido de carbono, por lo cual la bebida es efervescente, y etanol cuya concentración en el kumis es del 2%. (27, 39, 42)

Las BAL dominantes que se han identificado en el kumis son distintas especies de *Lactobacillus*, así como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Con respecto a las levaduras estas son: *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces unisporus*. (43, 44)

El sabor característico del kumis se debe a compuestos como el ácido acético, ésteres y alcohol que se desarrollan durante la fermentación de la leche, este proceso también genera que el pH del kumis sea menor a 4,0. (27)

Para la elaboración del kumis en forma artesanal se parte de leche cruda a la que se agrega kumis preparado anteriormente, luego se incuba por tres a ocho horas a temperatura entre 20 y 30 °C en un saco de piel animal y se bate regularmente. Se considera que el kumis está listo al observar que el producto presenta mucha espuma y el sabor del mismo es agrio. (27, 43)

2.3.4 Bioyogur

El bioyogur es un producto lácteo de reciente comercialización que surgió con la intención de aportar microorganismos de la flora intestinal en estado viable, siendo por lo tanto un alimento probiótico. (45, 46, 47)

Básicamente es un yogur que además de los microorganismos iniciadores que se emplean en la elaboración del mismo, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, presenta microorganismos probióticos que se adicionan al producto.

Los microorganismos probióticos pueden ser: *Lactobacillus acidophilus*, mezclas de especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp. o *Lactobacillus acidophilus* junto con alguna especie de *Bifidobacterium*, en esta última variante el bioyogur también se denomina yogur-AB siendo *Lactobacillus acidophilus* el cultivo-A y la especie del género *Bifidobacterium* el cultivo B. (45, 46, 48, 49)

Para considerar que el producto presenta efecto terapéutico se exige un mínimo de 10^6 - 10^7 u.f.c./g de las especies de *Lactobacillus* o *Lactobacillus acidophilus* y/o especie de *Bifidobacterium* que se emplee en el mismo. (46, 47, 48)

La viabilidad de las bacterias probióticas se reduce en el producto y varía según las cepas, dicha pérdida obedece a los siguientes factores: pH, oxígeno disuelto, contenido de ácido láctico y acético, tiempo de fermentación, periodo de almacenamiento del producto y condiciones del mismo. (45, 46, 47)

A causa de la pérdida de viabilidad de los cultivos probióticos se busca favorecer su crecimiento suplementando la leche empleada en la elaboración de bioyogur con componentes que estimulan la viabilidad de los mismos, así como con prebióticos que favorecen el crecimiento de estos y la etapa de incubación que sigue al agregado de los cultivos a la leche se realiza en el

rango de temperatura entre 37 y 40 °C que es el óptimo para el desarrollo de los microorganismos probióticos. ^(46, 48)

2.3.5 Leche acidófila

La leche acidófila es una bebida láctea probiótica fermentada que se obtiene por fermentación de la leche con *Lactobacillus acidophilus*, el cual presenta un recuento mínimo de 10^7 u.f.c./g. ^(50, 51)

Existen tres variantes del producto de acuerdo al contenido de materia grasa de la leche con que se prepara, estas son: entero, semi-descremado y descremado. Desde el punto de vista de la textura puede ser firme o batido rompiendo el coágulo obtenido. ^(52, 53)

La elaboración de leche acidófila requiere realizar un tratamiento térmico intenso a la leche que consiste en someterla dos veces a 90°C durante 20 minutos o solo una vez a 140°C por dos segundos, este tratamiento además de eliminar los microorganismos patógenos, sirve para reducir la carga microbiana del resto de los microorganismos presentes en la leche que podrían competir con *Lactobacillus acidophilus* que tiene actividad acidificante y crecimiento en leche lentos. ^(36, 51, 54)

Luego de efectuado el tratamiento térmico la leche se enfría hasta los 37°C y se agrega un 2 a 5 % del cultivo iniciador de *Lactobacillus acidophilus* y se incuba a dicha temperatura mas de 24 horas hasta que el pH del producto es cercano a 4,5; el gel obtenido se rompe (si el producto final es batido) y luego se enfría y madura a 5°C. ^(36, 51, 53, 55)

Existe otra variante del producto que se llama leche acidófila dulce, esta bebida láctea a diferencia de la leche acidófila no es fermentada por lo que no tiene etapa de incubación, sino que se agrega una concentración alta de *Lactobacillus acidophilus* viable. Tiene la ventaja de carecer de la alta acidez y el gusto de la leche acidófila conservando el efecto terapéutico. ^(51, 53, 55, 56)

Para elaborar leche acidófila dulce a la leche se le realiza el mismo tratamiento térmico que se emplea en la producción de leche acidófila, para que el producto sea estable desde el punto de vista microbiológico durante su almacenamiento. ⁽⁵¹⁾

2.3.6 Queso

Los quesos son concentrados de proteínas esencialmente caseínas, que se obtienen por un proceso de coagulación de éstas a pH ácido y un posterior proceso de deshidratación (sinéresis). ^(2, 57, 58)

La coagulación de las caseínas de la leche resulta en la generación de un gel en el que queda retenida materia grasa, vitaminas y minerales, dicho proceso ocurre por acción del cuajo que consiste en un extracto enzimático de aspartoproteasas o proteinasas ácidas como la quimosina que hidrolizan la

κ-caseína, en conjunto con la acidificación desarrollada por microorganismos de la flora nativa de la leche o cultivos iniciadores, este proceso se denomina coagulación mixta. ^(2, 58, 59)

En el caso de los quesos con ojos, como los de tipo suizo, se emplean cultivos constituidos por un 85 a 90% de bacterias acidificantes y un 10 a 15% de bacterias aromatizantes, siendo *Lactococcus lactis* el responsable de la acidificación y *Leuconostoc* spp. el que aporta las características aromáticas. Los ojos en la masa del queso se deben al dióxido de carbono generado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovariedad *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp. al metabolizar citrato y por fermentación de la lactosa. En algunos tipos de quesos la formación de ojos se debe al empleo de cultivos del género *Propionibacterium* que producen dióxido de carbono a partir de lactato, dichas bacterias también generan ácido propiónico y acético que adjudican sabor dulce y picante a los quesos. ^(60, 61, 62, 63, 64, 65)

En el proceso de desuerado o deshidratación que se inicia con el corte del gel resultante en la coagulación ocurre la sinéresis que consiste en la liberación de lactosuero y con éste de proteínas solubles, lactosa y componentes salinos. Este fenómeno trae como consecuencia la separación de las fases sólida y líquida obteniéndose la cuajada. El desuerado se acelera por agitación, tratamiento térmico, salado y prensado de la cuajada. ^(2, 57, 58)

Luego del proceso de desuerado se procede a moldear y posteriormente prensar la cuajada, el moldeado permite dar forma a los quesos y el prensado ayuda a eliminar el lactosuero remanente, por lo que es una etapa de regulación de la humedad del producto, al igual que lo es el proceso de desuerado. ^(2, 57, 58)

El proceso de elaboración se detiene luego de la etapa de prensado en el caso de los quesos frescos, mientras que para obtener quesos maduros se realizan dos pasos más en su elaboración, éstas son el salado y la maduración. ⁽²⁾

El salado se realiza sumergiendo los quesos en salmuera o por salado en seco. El cloruro de sodio al favorecer la disminución de la actividad del agua controla el crecimiento microbiano y la actividad enzimática, por lo que tiene efecto en la conservación y la textura de los quesos. La sal además favorece la formación de la corteza y contribuye al sabor. ^(2, 57, 58)

La maduración de los quesos se realiza en cámaras con temperatura y humedad relativa controlada. Los procesos de lipólisis, proteólisis y glucólisis que tienen lugar generan compuestos que aportan sabor y aroma tales como aminoácidos, ácidos grasos volátiles, cetonas y ésteres, también hay evaporación de agua y formación de la corteza. En esta etapa los denominados microorganismos no iniciadores, aquellos que no intervienen en forma directa en la etapa de acidificación, presentan un papel más importante mientras que los cultivos iniciadores intervienen en forma secundaria. ^(2, 57, 58, 66)

Con respecto a los tipos de quesos, existen variados criterios para su clasificación, entre ellos el contenido de humedad, de grasa, proceso de elaboración y maduración. ^(9, 57, 59, 60, 67, 68)

La clasificación de acuerdo al contenido de humedad es en: frescos si es de 60 a 80%; blandos cuando se encuentra entre 55 y 57 %; semiduros si es de 42 a 55% y duros si se presenta entre 20 y 40%.

Según el contenido de materia grasa se distinguen en: magros, para lo que debe ser menor al 10%; semi-desnatados, cuando se halla entre 10 y 25%, semi-grasos, si oscila entre 25 y 45%; grasos, donde se ubica entre el 45 y 60% y extra-grasos si es mayor al 60%.

Los quesos también pueden ser clasificados según su maduración y el proceso de manufactura. Si no hay etapa de maduración los quesos se denominan frescos ejemplo: Cottage, mientras que los madurados se distinguen en: semi-duros, duros y extra-duros cuya maduración se debe al desarrollo bacteriano en el interior de la masa del queso, ejemplos de estas tres categorías son: Monterey Jack (semi-duro), Cheddar (duro) y Grana Padano (extra-duro).

Los quesos con ojos son los de tipo Suizo y los de tipo Holandés, ejemplo: el queso Emmental. Los de pasta hilada como el Mozzarella son los elaborados sumergiendo la pasta en agua caliente a 80°C, estirándola y enfriándola antes de colocarla en salmuera. Una variedad de quesos, dentro de la cual se encuentra el queso Feta, comprende a aquellos que presentan alto contenido de sal como resultado de una maduración en salmuera.

Otras variedades son: quesos que tienen hongos en su superficie, ejemplo: Brie; los de pasta azul, que presentan vetas debidas al crecimiento del hongo *Penicillium roqueforti*, caso del queso Stilton; quesos con maduración en su superficie, ejemplo: Munster y los fundidos resultantes del fusión de distintos tipos de quesos que son descortezados, molidos, mezclados y calentados entre 80 a 90°C.

2.4 Caracteres generales de las bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, no pigmentadas, catalasa negativas, mayoritariamente nitrato reductoras negativas y capaces de crecer en el rango de pH entre 4,0 y 4,5; anaerobias facultativas o microaerófilas, cuyo metabolismo es fermentador y que dependiendo si da como único producto de fermentación ácido láctico o está acompañado por la generación de otros compuestos se distinguen en bacterias homolácticas o heterolácticas, respectivamente.^(9, 18, 21, 69, 70, 71)

Las bacterias lácticas homofermentativas generan como producto principal de la fermentación ácido láctico, estos microorganismos son todos los miembros del género *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y varias especies de *Lactobacillus*.

Con respecto a las bacterias heterolácticas, durante la fermentación además de ácido láctico producen dióxido de carbono, ácido acético, ácido fórmico y etanol. Este tipo de fermentación ocurre en bacterias del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos auxótrofos, es decir, requieren una serie de componentes (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas tales como la vitamina B, el ácido pantoténico, la biotina y el ácido fólico) que no pueden ser sintetizados por ellos mismos, debido a lo cual deben encontrarse en el medio de crecimiento. El elevado requerimiento nutritivo (mayor al de los seres humanos) y la cantidad de energía que pueden obtener por fermentación, condicionan los hábitats naturales que son propicios para el desarrollo de estas bacterias, siendo los mismos: la leche y los productos derivados de la misma, el intestino y las mucosas de humanos y animales así como también plantas intactas y en descomposición. ^(9, 72, 73)

Con respecto a las temperaturas en que se desarrollan estos microorganismos, los hay: mesófilos, que crecen entre 25-30°C y termófilos, cuyo rango de temperatura se encuentra entre 40-44°C. ^(3, 52, 58, 72, 73, 74, 75)

Desde el punto de vista filogenético se han definido doce géneros de bacterias lácticas y estos son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Alloicoccus* y *Weissella*. ⁽⁵⁸⁾ Dichos géneros se ubican taxonómicamente dentro del phylum Firmicutes, en la clase Bacilli, orden Lactobacillales. ⁽⁶⁾



Figura 1: Árbol filogenético de los géneros de bacterias ácido lácticas, basado en la secuencia del gen del ARNr 16S. ⁽²⁰⁾

2.4.1 Géneros de bacterias ácido lácticas.

2.4.1.1 *Lactococcus* spp.

El género *Lactococcus* pertenece a la Familia *Streptococcaceae* y está integrado por seis especies. Desde el punto de vista morfológico estas bacterias son cocos esféricos u ovoides cuyo diámetro oscila entre 0,5 y 1 μm y se los suelen encontrar de a pares, formando cadenas cortas o en forma simple (véase la figura 2).

Los *Lactococcus* son microorganismos mesófilos, no móviles capaces de crecer a 10°C pero no a 45°C, están descritos como BAL homofermentativas, aunque existen miembros de este género que son heterofermentativos, en la fermentación generan L-ácido láctico. El rango de pH óptimo para el crecimiento de este género es entre 6,0 y 6,5; algunas especies son capaces de crecer a pH 4,4 pero ninguna a pH 9,6. (2, 5, 6, 7, 9, 52, 69, 71, 76, 77, 78, 79, 80)

2.4.1.2 *Lactobacillus* spp.

Este género pertenece a la Familia *Lactobacillaceae* y en la actualidad está constituido por 116 especies, algunas de las especies actuales son anaerobias estrictas. Morfológicamente estas bacterias Gram-positivas presentan forma de bastón cuyo tamaño varía entre: 0,5 a 1,2 μm por 1,0 a 10,0 μm ; pero también pueden encontrarse como cocobacilos, bastones curvados o coriniformes, se suelen disponer en cadenas y de manera simple.

Existen algunas especies que son móviles gracias a la presencia de flagelos peritricos, otra excepción es que ciertos miembros de este género pueden ser nitrato reductores. Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento los *Lactobacillus* pueden ser mesófilos o termófilos. Existe variación a nivel de especie con respecto a la capacidad de crecer a 10 y 45 °C.

En cuanto a la fermentación, pueden generar L-ácido láctico, D-ácido láctico o una mezcla de ambos isómeros, y se los distinguen en tres categorías: homofermentativos estrictos, heterofermentativos estrictos y heterofermentativos facultativos. En referencia al pH óptimo de crecimiento este oscila entre 4,5 y 6,2. Algunas especies pueden crecer a pH 3,2 y otras a pH 9,6. (2, 5, 6, 7, 9, 20, 52, 71, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83)

2.4.1.3 *Leuconostoc* spp.

Taxonómicamente este género pertenece a la Familia *Leuconostocaceae* y está constituido por once especies. Se trata de cocos Gram-positivos, no móviles, de forma esférica o lenticular que se disponen de a pares y constituyendo cadenas cortas, también pueden disponerse solos. De las BAL aisladas de los alimentos representan un grupo minoritario a causa de su lento crecimiento y baja capacidad acidificante.

Estos microorganismos no hidrolizan arginina. Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento son mesófilos y presentan crecimiento a 8°C pero no 45°C. En cuanto al pH, requieren que sea mayor a 4,5, hay algunas especies que pueden crecer a pH superior a 9,5. Desde el punto de vista de la

fermentación son heterofermentativos y producen D-ácido láctico. (5, 6, 7, 9, 52, 71, 76, 78, 79, 80, 84, 85)

2.4.1.4 *Pediococcus* spp.

El género *Pediococcus* forma parte de la Familia *Lactobacillaceae* y presenta once especies. Estas bacterias Gram-positivas son cocos esféricos, jamás ovoides o elongados, tienen 0,5 a 0,8 μm de diámetro y no son móviles, se disponen de a pares, pero también en tétradas debido a que se dividen en dos planos.

Pediococcus spp. está constituido por especies homofermentativas estrictas y heterofermentativas facultativas, que generan L-ácido láctico o L-ácido láctico y D-ácido láctico como producto de la fermentación.

Pueden crecer a pH 5,0, pero no a pH 9,0. Son microorganismos mesófilos, la mayoría de las especies pueden crecer a 35°C; a 10 y 45°C la capacidad de crecimiento varía según la especie. (2, 5, 6, 7, 9, 52, 71, 76, 77, 84, 86, 87, 88)

2.4.1.5 *Streptococcus* spp.

Este género se halla dentro de la Familia *Streptococcaceae* y está integrado por 67 especies, algunas de ellas patógenas, a diferencia de éstas la especie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* se considera GRAS, sigla que en inglés significa generalmente reconocido como seguro, ya que ha perdido o se han inactivado los genes característicos de las especies patógenas.

Morfológicamente se trata de cocos Gram-positivos ovoides que se disponen de a pares o en cadenas. Con respecto a la fermentación, son homofermentativos y generan L-ácido láctico.

Son microorganismos no móviles, mesófilos incapaces de crecer a 10°C; algunas especies crecen a 45°C, en el caso de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* el crecimiento continúa hasta los 50°C. El pH óptimo para el crecimiento es de 6,5 y no pueden desarrollarse a pH 4,4 ni 9,6. Algunas especies son capaces de hidrolizar la arginina y otras no. (2, 5, 6, 7, 9, 52, 71, 77, 78, 84, 89)

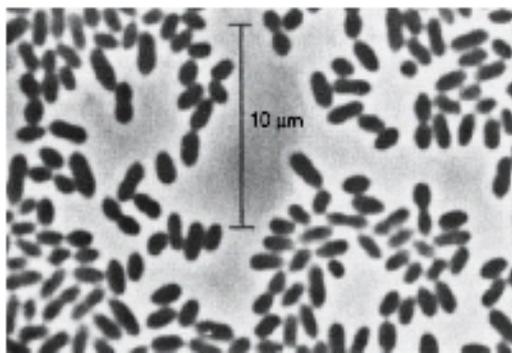


Figura 2: Microscopía de contraste de fase de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Las bacterias se hallan dispuestas de a pares. (69)

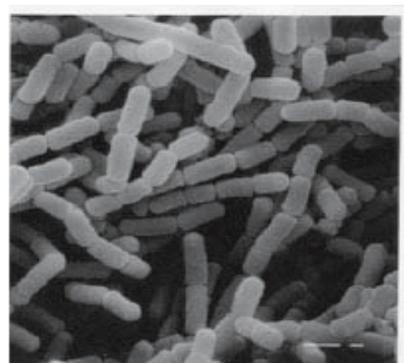


Figura 3: Microscopía electrónica de *Lactobacillus casei*. (20)

2.5 Características deseadas en las bacterias ácido lácticas de acuerdo a los productos elaborados.

La selección de bacterias ácido lácticas para formular cultivos iniciadores se hace en base a que éstas presenten ciertas propiedades: una capacidad de acidificación que no sea lenta , correcta producción de aroma y sabor, habilidad para obtener la textura adecuada , ausencia de patogeneidad , fácil preservación y propagación y que sea capaz de prevalecer sobre la microflora competitiva, pues se busca obtener un cultivo iniciador cuya tasa de viabilidad sea adecuada ,que esté libre de contaminación y sea altamente activo en las condiciones de producción. ^(3, 58)

2.5.1 Fermentación.

En el proceso de fermentación los microorganismos emplean carbohidratos y compuestos relacionados como fuente de energía que son oxidados parcialmente generándose ácidos orgánicos, la oxidación es incompleta porque el aceptor final de electrones no es externo, sino que, se trata de un compuesto orgánico resultante de la ruptura de los carbohidratos, con lo cual los microorganismos solo aprovechan una parte de la energía disponible en el sustrato. ^(71, 90)

Durante la fermentación los ácidos orgánicos resultantes se acumulan y se produce un gradual descenso del pH, el bajo pH (menor a 4,5-5,0) combinado con la alta concentración de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y de la mayoría de los microorganismos que alteran el producto, de esta forma además de lograr que el producto sea seguro desde el punto de vista microbiológico se extiende su tiempo de vida útil. ^(2, 7, 14, 78, 91, 92)

Por otra parte el ácido láctico producido favorece el desarrollo de la textura del producto, ya que, la disminución del pH provoca la desestabilización de las micelas de caseína principalmente por solubilización del fosfato de calcio asociado a éstas, al descender el pH hasta 4,6-4,7 se alcanza el punto isoeléctrico de las caseínas y éstas precipitan con lo cual se produce la coagulación de la leche. ^(3, 7, 78, 93)

La generación de ácido láctico favorece la pérdida de agua de hidratación, este fenómeno que se denomina sinéresis ayuda en el desarrollo de la textura de los quesos; la pérdida de agua también contribuye con la seguridad microbiológica y la conservación del producto al reducirse la actividad del agua en el mismo. ^(58, 93, 94)

El ácido láctico también confiere el sabor ácido y fresco de las leches fermentadas, pero además en la fermentación se pueden generar otros compuestos que contribuyen a las propiedades organolépticas al aportar sabor y aroma, con lo que se aumenta la diversidad del producto final. ^(2, 3, 7, 92, 95)

Los alimentos fermentados tienen mayor contenido de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas por lo que presentan mayor valor nutricional, por otra parte, la fermentación favorece la digestibilidad de las proteínas y de la fibra alimentaria, además de aumentar la disponibilidad de micronutrientes. ^(2, 91)

Como se indicó en el apartado 1.3 las bacterias ácido lácticas se pueden clasificar de acuerdo a los productos resultantes de su fermentación. Se denominan homolácticas a las BAL que sólo producen ácido láctico como producto único o principal de la fermentación y heterolácticas a aquellas que generan ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético en cantidades equimolares. ^(3, 6, 71, 80, 96)

Existen cepas lácticas homofermentativas que al modificar las condiciones de crecimiento, variando por ejemplo la concentración de los nutrientes esenciales, el pH o la concentración de glucosa pueden comportarse como heterofermentativas. ⁽⁷¹⁾

Las bacterias heterolácticas despiertan más interés que las homolácticas porque durante la fermentación producen compuestos de aroma y sabor como diacetilo, acetoina y acetaldehído que contribuyen a las propiedades organolépticas del producto. ^(71, 93)

Las especies de los distintos géneros de BAL difieren en su capacidad fermentadora y dentro de una misma especie existen variaciones a nivel de cepa que se deben a la capacidad específica de éstas para asimilar los nutrientes del medio. ^(93, 97, 98, 99, 100, 101)

2.5.1.1 Cultivos iniciadores.

La capacidad acidificante de las BAL es una propiedad de interés tecnológico para la industria alimentaria, de hecho se utiliza el concepto de cultivos “starters” o iniciadores en referencia a cultivos puros o mezclas de bacterias ácido lácticas que se emplean en la elaboración de productos fermentados por su gran actividad acidificante. ^(7, 71)

El cultivo “starter” siempre presenta una especie homoláctica y cuando se requieren componentes de aroma y gusto incluye una heteroláctica como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. ⁽⁷¹⁾

Los cultivos iniciadores que se suelen emplear están constituidos mayoritariamente por especies de los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. ^(102, 103)

Se suele clasificar a los cultivos iniciadores de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias ácido lácticas que los constituyen, existiendo tres tipos: mesófilos, termófilos y mixtos. Los cultivos mesófilos son empleados en procesos fermentativos cuyas temperaturas óptimas se ubican entre 20-30°C, mientras que los cultivos termófilos son utilizados cuando el rango de temperatura se encuentra entre 30-50°C. En cuanto a los cultivos mixtos, se los emplea en procesos fermentativos que ocurren entre 30-40°C. A su vez, los

cultivos iniciadores pueden ser: puros (compuestos por una única cepa), mixtos (es decir, una mezcla de cepas de bacterias ácido lácticas definidas) o artesanales (mezcla indefinida de bacterias ácido lácticas nativas de la leche). La comercialización de los fermentos puede ser como: liofilizados, deshidratados, congelados o líquidos. (3, 7, 58, 60, 72)

2.5.2 Proteólisis.

La proteólisis es un proceso de degradación proteica que puede ocurrir naturalmente en la leche debido a enzimas propias de ésta (la más importante la plasmina), así como también por microorganismos nativos de la leche que poseen enzimas capaces de hidrolizar las proteínas, entre los microorganismos con actividad proteolítica se hallan las bacterias ácido lácticas.

En el caso de los derivados lácteos, por ejemplo quesos, la degradación proteica es un fenómeno deseado, debido a que interviene en los perfiles de sabor, aroma y textura que son obtenidos. (2, 3, 21, 58, 79) Esto es impartido por BAL durante el proceso de elaboración de los quesos o durante su maduración etapa en que ocurre la autólisis de BAL como sucede con las cepas de *Lactococcus*. (61, 104)

Las proteínas de la leche pueden ser clasificadas dentro de tres grupos: caseínas, proteínas séricas y proteínas asociadas a la membrana del glóbulo butiroso. Siendo las caseínas de gran importancia en el desarrollo de las propiedades organolépticas resultantes en los derivados lácteos mediante la degradación de las mismas. (104, 105, 106, 107)

Las caseínas están agrupadas según su movilidad electroforética como: α -s₁-caseína, α -s₂-caseína, β -caseína y κ -caseína; todas presentan en mayor o menor medida cierta degradación de origen bacteriano. (104, 107, 108, 109)

El sistema por el cual las bacterias ácido lácticas degradan las proteínas implica una proteinasa que se encuentra asociada a la pared celular, la misma genera oligopéptidos como producto de la degradación que luego son internalizados mediante sistemas de transportes de oligopéptidos y permeasas y una vez en el interior celular son degradados por peptidasas intracelulares, dando como resultado aminoácidos y péptidos pequeños. De esta forma, si bien las bacterias ácido lácticas no poseen la capacidad de sintetizar ciertos aminoácidos, cuya naturaleza y número varía según la cepa considerada, logran obtenerlos por medio de su actividad proteolítica a partir de las proteínas del medio en que se desarrollan. (3, 21, 110)

2.6 Objetivo.

2.6.1 Objetivo general:

Caracterizar propiedades de interés tecnológico en cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la cadena láctea provenientes de diferentes establecimientos bovinos, ovinos y caprinos.

2.6.2 Objetivos específicos:

- ♦ Determinar la capacidad acidificante de las cepas de bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.
- ♦ Evaluar cinéticas de crecimiento y actividad proteolítica de las diferentes cepas de bacterias ácido lácticas.
- ♦ Determinar la actividad proteolítica de las diferentes cepas de bacterias ácido lácticas por SDS-PAGE.

3. Materiales y métodos:

3.1 Microorganismos.

Se seleccionaron 17 cepas de BAL autóctonas de leche bovina, ovina y caprina provenientes de diferentes puntos de la cadena láctea. Las BAL en estudio provienen de la colección del Laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos (U.T.A.), Facultad de Agronomía.

La pureza se determinó para cada cepa BAL en agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960, Oxoid ⁽¹¹¹⁾) incubándose a las temperaturas adecuadas para cada una de las bacterias en condiciones de microaerofilia.

En la tabla 1 se detallan las cepas BAL utilizadas en este estudio, incluyendo los géneros de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

Tabla 1: Cepas empleadas en la caracterización tecnológica.

Cepa	Número
<i>Lactococcus lactis</i>	37
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	82
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	104
<i>Lactococcus lactis</i>	106
<i>Lactococcus lactis</i>	107
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	108
<i>Lactococcus lactis</i>	975
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	45
<i>Pediococcus</i> spp.	57
<i>Pediococcus</i> spp.	60III
<i>Pediococcus</i> spp.	63I
<i>Lactobacillus helveticus</i>	66
<i>Lactobacillus helveticus</i>	71
<i>Lactobacillus helveticus</i>	100p
<i>Lactobacillus helveticus</i>	974
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	196
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	982

3.2 Evaluación de propiedades de interés tecnológico.

3.2.1 Estudio de la actividad acidificante.

Las cepas de BAL analizadas en este estudio fueron activadas en caldo MRS y crecidas en caldo MRS por 24 horas a 37°C para su posterior evaluación.

Los estudios de la actividad acidificante se realizaron para cada cepa BAL en seis tubos por duplicado con 9 mL de leche UHT descremada reesterilizada a 0,70 Kg/cm² por 10 minutos. Se inocularon con 200 µL del cultivo en MRS previamente descripto.

Las variaciones de pH fueron determinadas a las 3, 5 y 6 horas de inoculación con un pHmetro (HANNA, Instruments, Padova, Italy)

Se determinó el recuento inicial de las BAL en agar MRS por dilución decimal en tubos con solución salina fisiológica (SSF, 0,85% NaCl).

3.2.2 Cinéticas de crecimiento en leche UHT descremada estéril.

Las cepas BAL fueron cultivadas por 24 horas en caldo MRS a 37°C. Luego, se inocularon 800 µL del cultivo en cuatro matraces Erlenmeyer de 100 mL con 80 mL de leche UHT descremada y esterilizada como se indicó en el ítem anterior. Incubándose a 37°C.

A las 2, 4, 6 y 8 horas de iniciar la incubación se realizaron diluciones seriadas 1/10 en tubos de solución SSF. Se sembraron 100 µL en placas de agar MRS para determinar el recuento microbiano perteneciente a dichas horas, las placas se incubaron en microaerofilia a 37°C.

La determinación del recuento inicial del inóculo se determinó a partir de caldos de MRS incubados por 24 horas por recuento de bacterias viables en placa (u.f.c./mL) con agar MRS incubadas en condiciones microaerofílicas a 37°C.

3.2.3 Estudio de la actividad proteolítica.

La evaluación de la actividad proteolítica se realizó a partir de los matraces de leche UHT descremada que se emplearon en el estudio del crecimiento de las cepas BAL. Se procedió a tomar muestras de los mismos a las horas 2, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 de haber sido inoculados, para posterior análisis de las muestras

con el fin de evaluar el deterioro enzimático de las proteínas (caseínas) a lo largo del tiempo por electroforesis en geles de SDS-PAGE⁽¹¹²⁾.

Para realizar la electroforesis en gel de SDS-PAGE se empleó:

Tabla 2: Reactivos empleados en los geles de SDS-PAGE.

Reactivos	Gel separador (15%)	Gel de apilamiento (5%)
H ₂ O destilada	2,3 mL	1,4 mL
mezcla acrilamida/bis acrilamida 30%	5 mL	0,33 mL
Tris 1,5M (pH 8,8)	2,5 mL	—————
Tris 1,0M (pH 6,8)	—————	0,25 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,02 mL
Persulfato de amonio 10%	0,1 mL	0,02 mL
TEMED	0,004 mL	0,002 mL

Buffer de corrida, pH 8,3 (x5):

Tris.....15 g
 Glicina.....72 g
 SDS.....5 g
 Agua bidestilada desion. csp. 100 mL

En el momento de usarlo, se diluyeron 100 mL del buffer x5 en 400 mL de agua destilada.

Buffer de muestra, pH 6,75 (x2):

Tris.....1,51 g
 Glicerol.....20 mL
 SDS.....4 g
 2-Mercaptoetanol.....10 mL
 Azul de bromofenol.....0,05 g
 Agua bidestilada desion. cps. 100 mL

Preparación de las muestras:

Se diluyeron 125 µL de las muestras de leche de las distintas horas así como de la leche control (leche UHT descremada, sin inóculo) en 875 µL de agua destilada, de estas diluciones se tomaron 10 µL para diluir en igual volumen de buffer de muestra.

Condiciones de las corridas electroforéticas:

Una vez preparadas las muestras se procedió a sembrar 10 µL de las mismas en los geles. Las corridas se efectuaron en el buffer de corrida x1 cuya composición es detallada previamente en un equipo BIO-RAD Mini-Protean 3, a voltaje constante (150 V) y temperatura ambiente hasta que el frente de corrida llegó casi al extremo inferior de los geles.

Luego de realizar las corridas, los geles fueron sumergidos en la solución de tinción que se expone a continuación durante un mínimo de tres horas.

Solución de tinción:

Ácido acético.....	10%
Metanol.....	50%
Agua.....	40%
Azul de Coomassie R25.....	0,2% (concentración final)

Finalmente los geles fueron desteñidos realizando sucesivos lavados con la siguiente solución:

Solución de desteñido:

Ácido acético.....	80 mL
Etanol.....	250 mL
Agua.....	650 mL

Los geles se conservaron en la solución de desteñido hasta que fueron escaneados, fotografiados y sometidos a análisis utilizando el programa de análisis SCION-IMAGE® para detectar deterioro de las diferentes caseínas.

4. Resultados y discusión.

4.1 Actividad acidificante.

Los resultados obtenidos por el análisis de la actividad acidificante de las bacterias ácido lácticas (BAL) se detallan en la Tabla 3. A las seis horas de transcurrido el estudio las BAL con mayor actividad acidificante fueron: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (82, 37, 106, 975), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (982) y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (196).

Tabla 3: Estudio de la actividad acidificante de las cepas lácticas. Se indica el pH correspondiente a las horas 0, 3, 5 y 6 de las leches sembradas, el inóculo inicial (u.f.c./mL) y la diferencia de pH (Δ pH) existente entre las horas 0 y 6.

Actividad acidificante de las cepas lácticas:							
Cepa	Número	Recuento inicial (u.f.c./mL)	pH				Δ pH
			0	3	5	6	
<i>Lactococcus lactis</i>	37	2,83E+08	6,31	6,11	5,88	5,63	0,68
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	82	1,70E+08	6,31	5,91	5,42	5,28	1,03
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	104	1,20E+09	6,31	6,03	6,00	5,91	0,4
<i>Lactococcus lactis</i>	106	5,30E+07	6,31	6,13	5,79	5,69	0,62
<i>Lactococcus lactis</i>	107	1,70E+08	6,31	6,02	5,82	5,76	0,55
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	108	5,36E+07	6,31	6,09	5,88	5,8	0,3
<i>Lactococcus lactis</i>	975	2,80E+08	6,31	6,05	5,87	5,69	0,62
<i>Pediococcus</i> spp.	60III	1,90E+08	6,31	6,04	5,94	5,9	0,41
<i>Pediococcus</i> spp.	63I	3,60E+08	6,31	6,12	6,11	6,08	0,23
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	45	3,50E+08	6,31	6,03	5,92	5,89	0,42
<i>Pediococcus</i> spp.	57	6,20E+08	6,31	5,97	5,89	5,84	0,47
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	982	1,00E+09	6,31	6,04	5,73	5,52	0,79
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	196	7,00E+07	6,31	6,04	5,8	5,55	0,76
<i>Lactobacillus helveticus</i>	66	6,80E+08	6,63	6,46	6,24	6,17	0,46
<i>Lactobacillus helveticus</i>	71	2,79E+08	6,61	6,4	6,19	6,07	0,54
<i>Lactobacillus helveticus</i>	974	3,95E+08	6,58	6,52	6,44	6,41	0,17
<i>Lactobacillus helveticus</i>	100p	6,90E+08	6,58	6,58	6,55	6,56	0,02

En las figuras 4 a 9 se indica la variación de pH a lo largo del tiempo para las cepas BAL de mayor actividad acidificante.

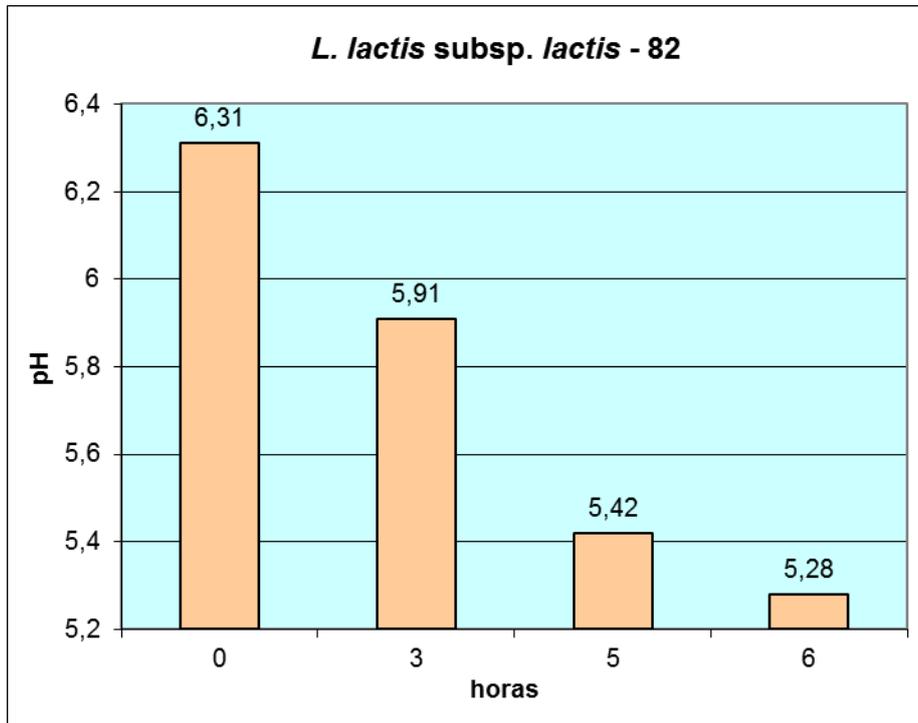


Figura 4: Variación del pH a lo largo del tiempo correspondiente a la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 82.

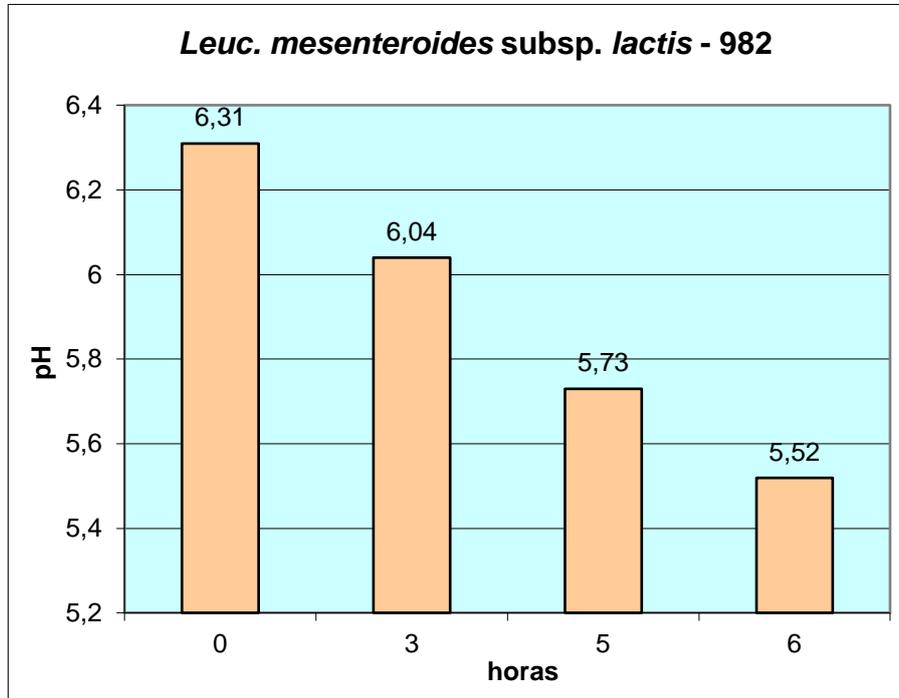


Figura 5: Variación del pH a lo largo del tiempo correspondiente a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactis* 982.

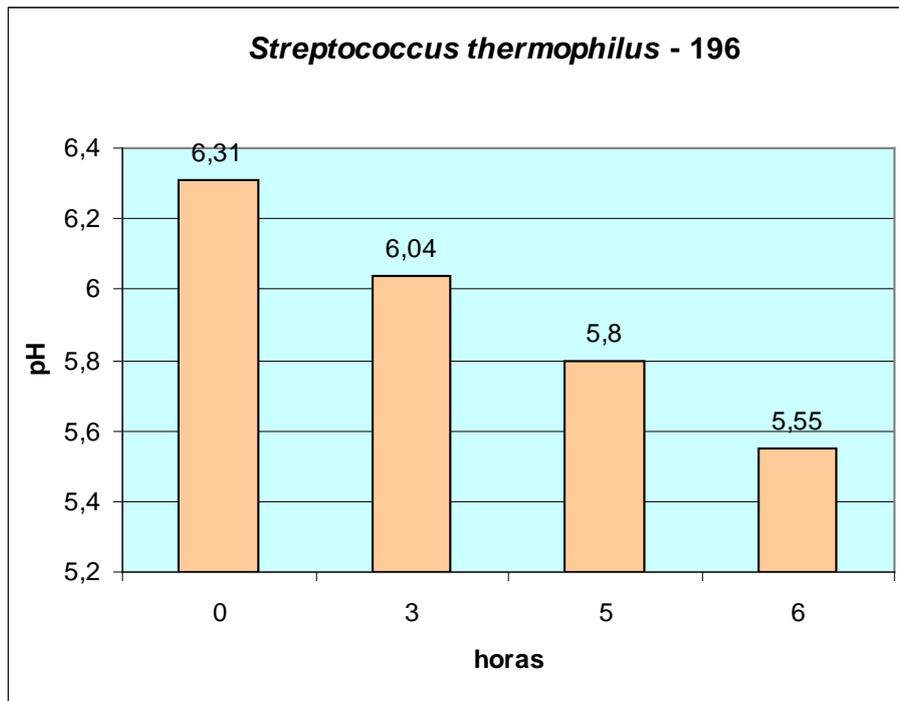


Figura 6: Variación del pH a lo largo del tiempo correspondiente a la cepa *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 196.

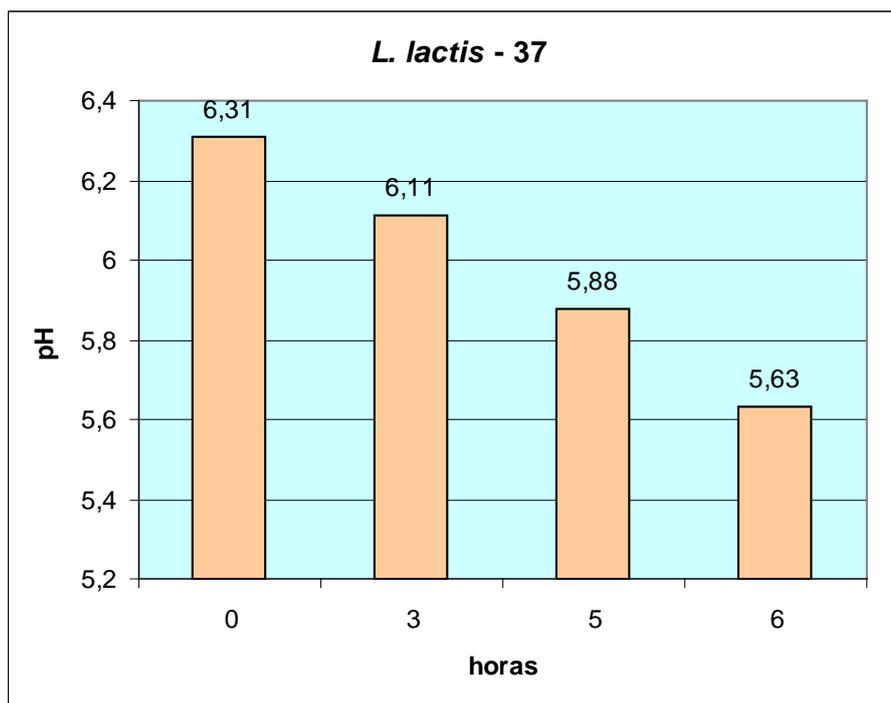


Figura 7: Variación del pH a lo largo del tiempo correspondiente a la cepa *Lactococcus lactis* 37.

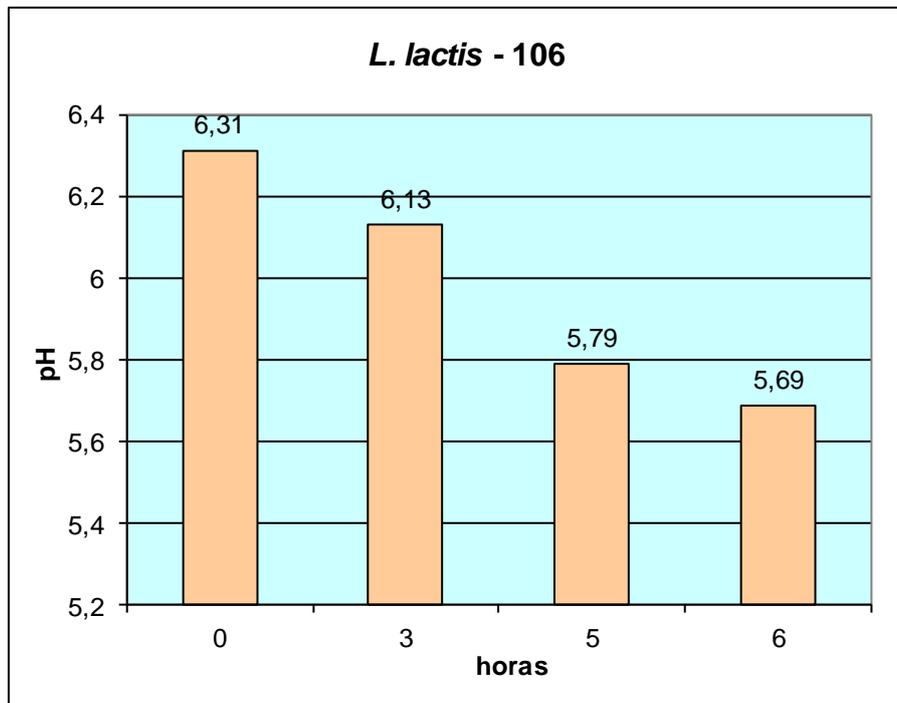


Figura 8: Variación del pH a lo largo del tiempo correspondiente a la cepa *Lactococcus lactis* 106.

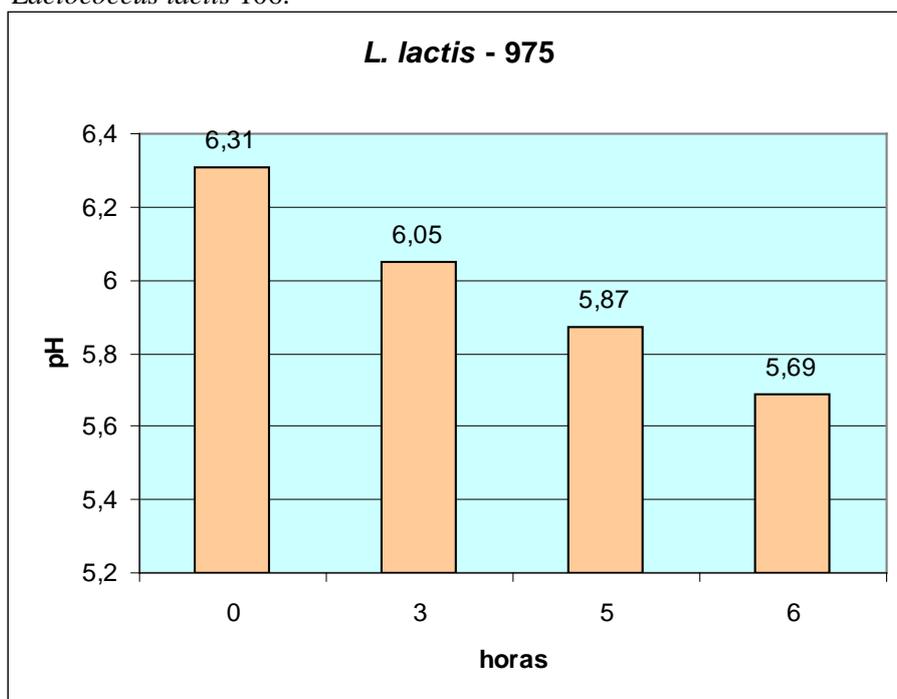


Figura 9: Variación del pH a lo largo del tiempo correspondiente a la cepa *Lactococcus lactis* 975.

En relación a la actividad acidificante detallada en las figuras 4 a 9, ninguna de las cepas puede ser considerada como cepa fermentadora rápida en el tiempo de estudio, a excepción de *Lactococcus lactis* 82, ya que tanto el género *Lactococcus* como *Lactobacillus*, *Leuconstoc* y *Streptococcus* demoraron más de seis horas para generar una diferencia de pH mayor a 1 respecto al pH inicial.

Los resultados obtenidos corresponden a cepas fermentadoras lentas de acuerdo a lo detallado por Huggins y Sandino, 1984 ⁽¹¹³⁾, a excepción de la cepa 82 de *Lactococcus lactis* como se puede observar en la figura 10.

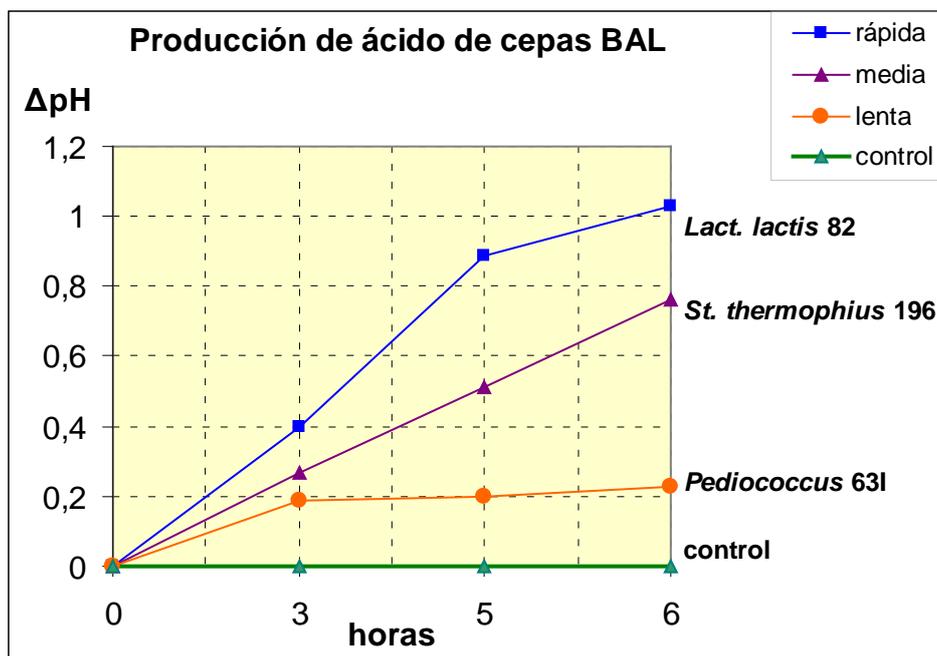


Figura 10: Producción de ácido de diferentes cepas BAL. Se graficaron los valores correspondientes a: *Lactococcus lactis* 82 (variante rápida), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 196 (variante media), *Pediococcus* 63I (variante lenta) y leche sin inocular (control).

Las cepas BAL del género *Lactobacillus* difirieron en su habilidad para reducir el pH de la leche, pero de forma similar a las del género *Pediococcus* todas presentaron baja actividad acidificante.

A nivel artesanal o industrial se buscan cepas BAL rápidas acidificantes que puedan ser candidatas para utilizarlas en los procesos de fermentación como microorganismos integrantes de starters primarios, mientras que las cepas BAL identificadas como lentas acidificantes se pueden utilizar como cultivos adjuntos dependientes de otras propiedades como actividad proteolítica y autolítica.

Los resultados obtenidos revelan que la actividad acidificante de las cepas de *Lactococcus* fue mayor que la de las otras especies analizadas y concuerda con lo expuesto en trabajos previos. ^(16, 28, 58, 102, 114, 115)

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* 196 resultó tener gran capacidad acidificante coincidiendo con lo reportado por otros investigadores. ⁽¹¹⁴⁾

La cepa BAL de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactis* 982 utilizada en este estudio presentó alta actividad acidificante. Se ha reportado que el género *Leuconostoc* tiene baja capacidad acidificante, siendo empleado en los productos lácteos porque contribuye en el desarrollo de sus propiedades organolépticas. ⁽⁷⁸⁾

4.2 Análisis de crecimiento y actividad proteolítica.

En la tabla 4 se detallan los recuentos de BAL a las diferentes horas de incubación.

Tabla 4: Recuentos microbianos efectuados a la hora 0, 2, 4, 6 y 8.

Recuentos microbianos (u.f.c./mL) de las cepas lácticas a lo largo del tiempo:						
Cepa	Número	0hs(inoculo)	2hs	4hs	6hs	8hs
<i>Pediococcus</i> spp.	57	7,7E+08	9,2E+09	1,3E+10	9,8E+09	2,1E+10
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	45	1,7E+09	5,1E+09	2,1E+10	1,7E+11	1,7E+10
<i>Lactococcus lactis</i>	106	1,1E+07	6,5E+08	1,0E+10	1,4E+10	6,5E+10
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	196	3,0E+08	2,5E+08	4,6E+10	3,7E+10	3,9E+10
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	104	1,1E+08	2,7E+08	5,5E+09	3,1E+10	7,9E+10
<i>Lactococcus lactis</i>	37	1,9E+08	2,1E+08	1,2E+10	8,3E+10	1,0E+11
<i>Lactococcus lactis</i>	975	3,2E+08	2,9E+09	9,9E+09	5,1E+10	8,7E+10
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	82	1,5E+07	7,1E+08	4,0E+09	5,9E+10	9,0E+07
<i>Lactococcus lactis</i>	107	4,7E+07	2,7E+09	5,4E+09	1,6E+10	1,5E+10
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	108	9,2E+07	2,2E+09	2,0E+10	1,8E+10	8,0E+09
<i>Pediococcus</i> spp.	60III	5,5E+08	4,0E+08	5,0E+09	3,3E+09	4,9E+09
<i>Pediococcus</i> spp.	63I	2,6E+08	5,3E+09	3,8E+09	1,9E+09	9,0E+08
<i>Lactobacillus helveticus</i>	66	6,0E+08	9,5E+08	1,1E+09	6,0E+09	1,5E+14
<i>Lactobacillus helveticus</i>	100p	9,0E+06	6,0E+07	6,3E+08	3,0E+10	5,0E+12
<i>Lactobacillus helveticus</i>	974	5,1E+07	4,0E+08	7,6E+08	2,0E+09	9,0E+09
<i>Lactobacillus helveticus</i>	71	2,7E+07	3,0E+08	3,8E+08	6,1E+09	9,0E+09

Las BAL con mayor velocidad de crecimiento fueron: *Pediococcus* 57, 60III, 63I, *Pediococcus pentosaceus* 45, *Lactococcus lactis* 82, 107, 108 y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 196.

Las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* fueron las que presentaron menor velocidad de crecimiento.

Con la finalidad de establecer la capacidad proteolítica de las cepas consideradas en la caracterización, se analizaron los diferentes perfiles de la degradación enzimática de las caseínas de la leche en geles de SDS-PAGE (Fig. 16 - 19).

En las figuras 11 a 15 se detalla la cinética de crecimiento para las cepas con mayor actividad proteolítica en las condiciones previstas en leche (*Lb. helveticus* 66, 71; *L. lactis* subsp. *lactis* 104, 82, 106).

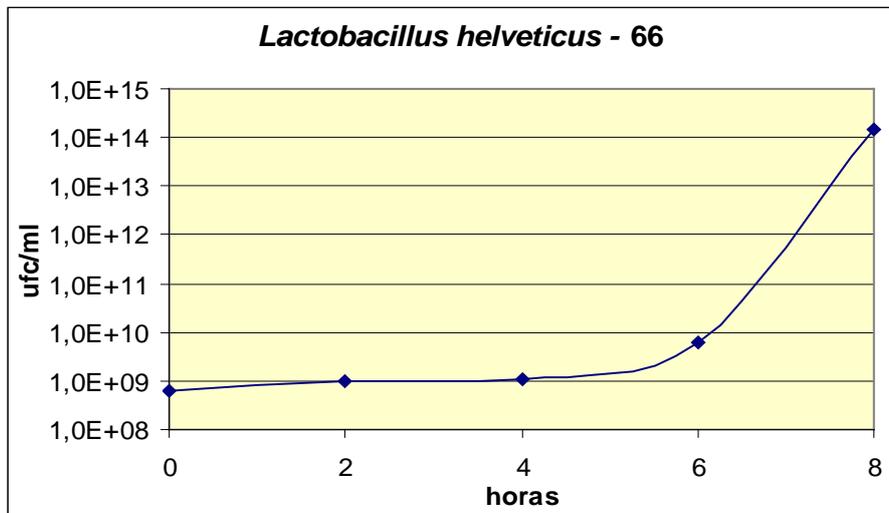


Figura 11: Cinética de crecimiento de la cepa 66 de *Lactobacillus helveticus*.

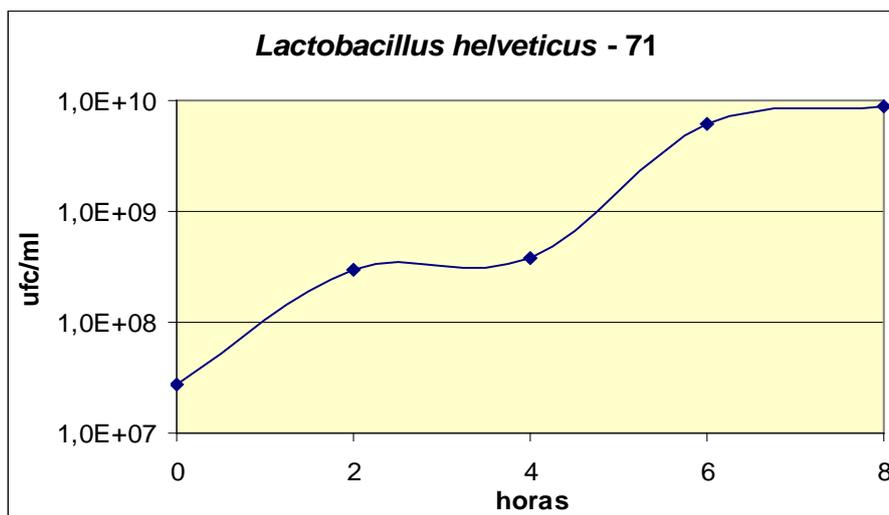


Figura 12: Cinética de crecimiento de la cepa 71 de *Lactobacillus helveticus*.

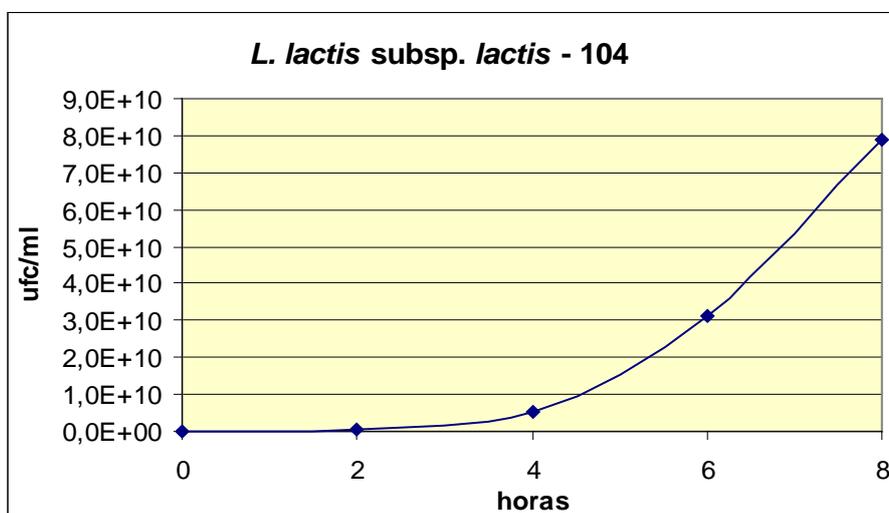


Figura 13: Cinética de crecimiento de la cepa 104 de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

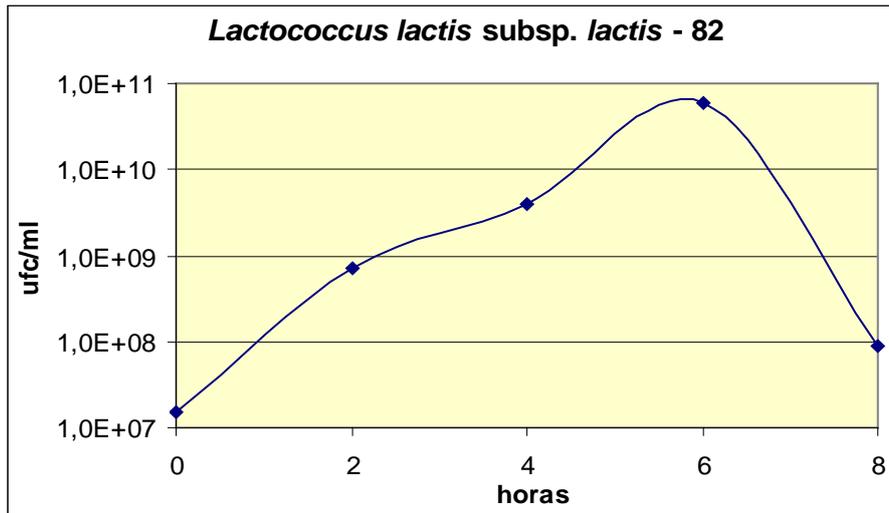


Figura 14: Cinética de crecimiento de la cepa 82 de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

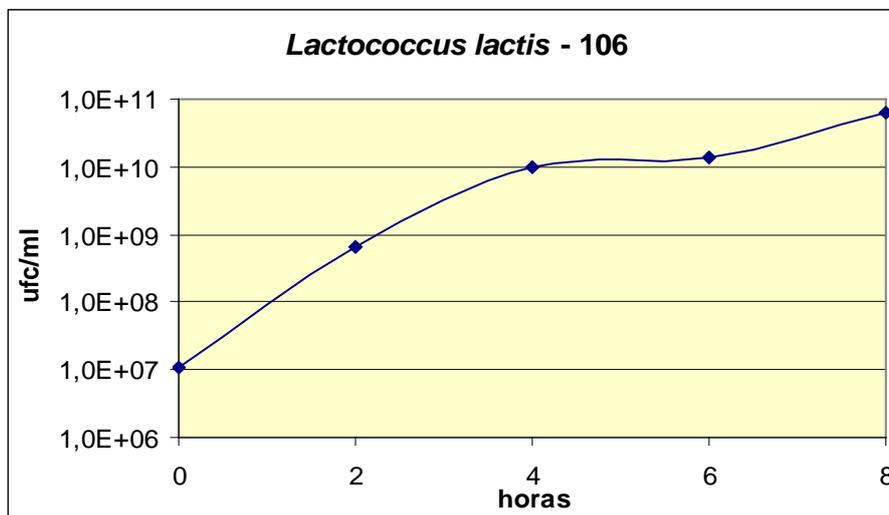


Figura 15: Cinética de crecimiento de la cepa 106 de *Lactococcus lactis*.

Las cepas 66 y 71, ambas de *Lactobacillus helveticus*, fueron las de mayor actividad proteolítica, apreciándose claramente la degradación sobre la κ -caseína de la leche detectada en SDS-PAGE a las 24 horas de crecimiento (Figura 16 y 17).

La cepa 104 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) también presentó actividad proteolítica pero a las 48 horas de haber sido inoculada en la leche, actuando sobre las κ -caseína, α -caseínas y β -caseína (Figura 18).

A estas tres cepas la siguieron en orden de importancia *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 82 cuya acción proteolítica se detectó a las 24 horas de crecimiento sobre la fracción κ -caseína (Figura 18).

La cepa *Lactococcus lactis* 106 fue la que presentó menor actividad proteolítica de las cinco en que dicha propiedad fue detectada, como se observa en la Figura 19 a las 48 horas de crecimiento en leche.

Las BAL pertenecientes al género de *Lactobacillus* resultaron ser más proteolíticas que las de *Lactococcus*, según estudios realizados por otros investigadores sobre la capacidad proteolítica de cepas de bacterias ácido lácticas, las pertenecientes al género *Lactobacillus* tienen mayor capacidad proteolítica que las del género *Lactococcus*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. (16, 116, 117, 118)

A continuación se muestran los geles de poliacrilamida SDS-PAGE en los que se detectó la capacidad proteolítica de cinco cepas.

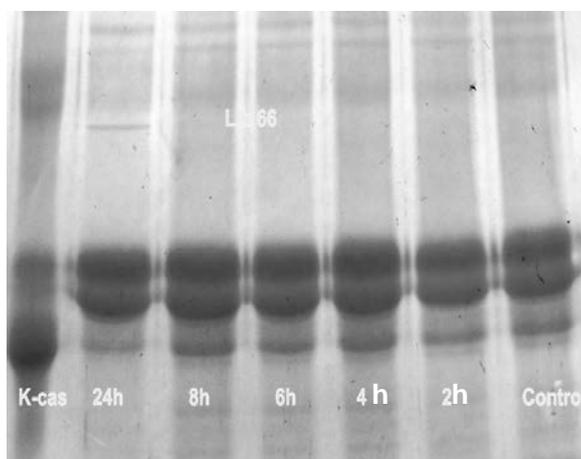


Figura 16: Gel de la electroforesis en SDS-PAGE Carriles 2 – 5: muestras de leche a las horas 2, 4, 6, 8 y 24 luego de ser inoculada con la cepa *Lactobacillus helveticus* 66, carril 1: κ -caseína, carril 7: leche sin inocular

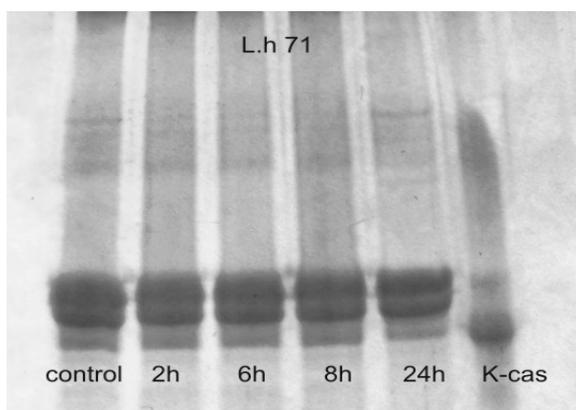


Figura 17: Gel de la electroforesis en SDS-PAGE Carriles 2 – 5: muestras de leche a las horas 2, 6, 8 y 24 luego de ser inoculada con la cepa *Lactobacillus helveticus* 71, carril 1: leche sin inocular, carril 7: κ -caseína.

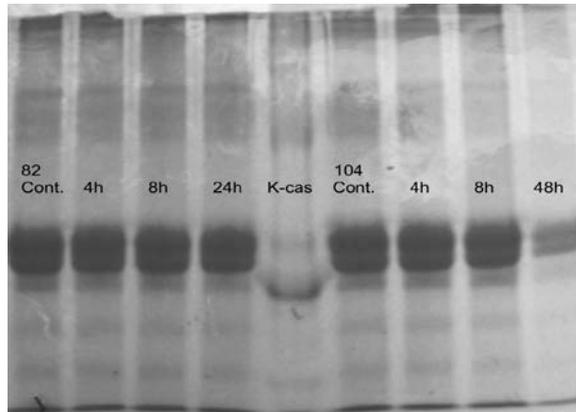


Figura 18: Gel de la electroforesis en SDS-PAGE para las muestras de: leche inoculada con la cepa 82 (carriles 2 al 4 de izquierda a derecha) y leche inoculada con la cepa 104 (carriles 6 al 9 en el mismo orden). Carriles 1 y 6: leche sin inocular, carril 5: κ -caseína.

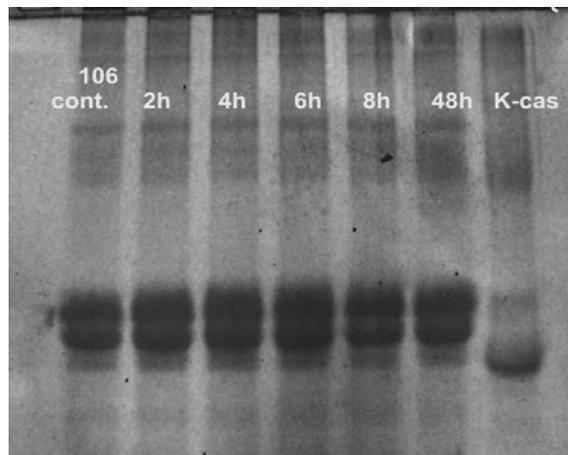


Figura 19: Gel de la electroforesis en SDS-PAGE Carriles 2 – 5: muestras de leche a las horas 2, 4, 6, 8 y 48 luego de ser inoculada con la cepa *Lactococcus lactis* 106, carril 1: leche sin inocular, carril 7: κ -caseína.

Las cepas de *Lactococcus lactis* 106, 104, 82; *Lactobacillus helveticus* 66 y 71 presentaron mayor actividad proteolítica detectada por la técnica de SDS-PAGE, al observar disminución de la concentración de las κ -cas y las caseínas α -s₁, α -s₂ y β .

En estudios posteriores (Pérez, S. y Kurioka, M., 2008⁽¹¹⁹⁾) utilizando el análisis de aminoácidos libres (Church, et. al, 1983⁽¹²⁰⁾) para la evaluación de proteólisis determinaron que las cepas con mayor actividad proteolítica fueron *Lactobacillus helveticus* 66 y 71 con recuentos bacterianos menores a los de otras cepas de *Lactobacillus*. En este estudio analítico, el análisis de aminoácidos libres fue más discriminatorio en relación a los umbrales de detección de proteólisis.

5. Conclusión.

En este trabajo se logró caracterizar distintas cepas de bacterias lácticas desde el punto de vista tecnológico tomando en consideración la capacidad acidificante y proteolítica así como la cinética de crecimiento de las mismas.

De las diecisiete cepas estudiadas seis mostraron importante capacidad acidificante *Lactococcus* (37, 82, 106 y 975), *Leuconostoc* (982) y *Streptococcus* (196).

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (982) puede resultar de importancia a nivel industrial por su actividad acidificante, ya que la acidificación no es una propiedad destacable de *Leuconostoc* spp.. A nivel de la industria quesera sólo se emplean *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactis* en asociación con otras bacterias lácticas como *Lactococcus*, por las características que proporcionan de aroma, sabor, textura y formación de ojos.

Con respecto a la capacidad proteolítica, cinco cepas desarrollaron mayor deterioro de las caseínas, dos del género *Lactobacillus* (66 y 71) y tres del género *Lactococcus* (82, 104 y 106).

Como se indicó en la discusión las cepas de *Lactobacillus helveticus* 66 y 71 presentaron la mayor capacidad proteolítica, esta propiedad podría ser aprovechada por la industria láctea en la elaboración de quesos. Esta especie se utiliza por adjudicar sabor, aroma y textura resultantes de la proteólisis y lipólisis que desarrolla.

Las curvas de cinética de crecimiento permitieron identificar ocho cepas cuyas fases de crecimiento exponencial son prolongadas en el tiempo (entre cuatro y más de ocho horas) entre las que se encuentran cuatro de las cepas con actividad proteolítica (66, 71, 104 y 106).

Las cepas de *Lactococcus lactis* 37, 975 y 106 también presentan fase de crecimiento exponencial larga con lo cual aumenta su importancia como cepas acidificadoras ya que permanece más tiempo creciendo activamente. Dado que *Lactococcus lactis* se emplea en la producción de derivados lácteos tales como manteca cultivada, leches fermentadas, kéfir o quesos, (aclarando que en este último caso se emplean las subespecies *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*), estas cepas podrían resultar de interés para la industria alimentaria por las características antes mencionadas.

De las ocho cepas con fase de crecimiento exponencial de $\leq 4 - 6$ hs. las cepas 82 y 196 producen rápida acidificación y son las que presentan mayor actividad proteolítica al compararlas con las otras seis cepas.

Estas características son de importancia en el momento de seleccionar “starters” o fermentos iniciadores con diferentes usos en la elaboración de productos lácteos de acuerdo a las propiedades tecnológicas aplicables en la industria láctea.

La cepa *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 196 presenta actividad acidificante a partir de tres horas de incubación llegando a finalizar su fase exponencial de crecimiento a las cuatro horas.

Las cepas de *Lactococcus lactis* 82 y 106 se podrían emplear en la producción de los derivados lácteos no sólo por sus capacidades acidificantes sino también por su actividad proteolítica.

Las cepas de *Pediococcus* evaluadas presentaron baja actividad proteolítica y la acidificación fue baja luego de seis horas de crecimiento. *Pediococcus* tiene un papel secundario en productos lácteos con respecto a *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Leuconostoc*, y se lo ha relacionado con el desarrollo de sabor y la maduración de ciertos quesos. *Pediococcus* es usado principalmente en fermentaciones requeridas en productos cárnicos y vegetales.

6. Bibliografía.

1. Campos, L. y Gonzabay, L.. 2007. Proyecto de producción y comercialización del kumis, como un nuevo producto lácteo y una alternativa para la nutrición. Escuela Superior Politécnica del Litoral - Facultad de Ciencias Humanísticas y Económicas, Guayaquil, Ecuador.
2. Martín, A.M.. 2008. Estudio polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Editorial de la Universidad de Granada.
3. Brennan, E. y Reginensi, S.. 2001. Aislamiento, identificación y estudio de características de interés tecnológico de bacterias ácido lácticas nativas de leche pertenecientes a la familia Streptococcaceae. F.Agro., U.de la R..
4. Marques, D.. 2008. Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado. Universidade de São Paulo.
5. Parra, R.A.. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol.8, N°1, Enero-Junio.
6. König, H. and Fröhlich, J.. 2009. Lactic acid bacteria. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. 1st Ed., Ed. Springer, 3-30.
7. Doyle, M.P. and Meng, J.. 2006. Bacteria in food and beverage production. Prokaryotes, Ed. Springer, 3rd Ed., Vol.1, 797-811.
8. Amores, R., Calvo, A., Maestre, J.R. y Martínez, D.. 2004. Probióticos. Revisión. Rev. Esp. Quimioterap., Vol.17, N°2, 131-139.
9. Cabeza, E.A.. 2006. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos eficientes en el sector productivo", Barranquilla, Colombia.
10. Yakult. 2000. Boletín Yakult. Año 1, Número 1, Marzo.
11. Ballesta, S., Velasco, C., Borobio, M.V., Argüelles, F. y Perea E.J.. 2008. Yogures frescos frente a pasteurizados: estudio comparativo de sus efectos sobre los parámetros microbiológicos, inmunológicos y el bienestar gastrointestinal. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., Vol.26, N°9, 552-557.
12. Strahinić, I., Cvetanović, D., Kojić, M., Fira, D.J., Tolinački, M. and Topisirović, L.J.. 2007. Characterization and antimicrobial activity of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGSM1-19. Acta Vet.-Beograd, Vol. 57, N°5-6, 509-521.
13. Aswathy, R.G., Ismail, B., John, R.P. and Nampoothiri, K.M.. 2008. Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. Appl. Biochem. Biotechnol., Vol.151, N°2-3, 244-255.

14. Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratanakornkit, M. and Sikkhamondhol, C.. 2010. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in *plaa-som*, a Thai fermented fish. J. Biosci. Bioengin., Vol.110, N°5, 553-557.
15. Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A. and Campos, C.A.. 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat Sci., Vol.87, N°4, 321-329.
16. Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E.. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw. J. Appl. Microbiol., Vol.91, N°5, 861-870.
17. Vasek, O.M., Fusco, A.J.V. y de Giori, G.S. de. 2004. Elaboración de queso artesanal correntino con cepas salvajes seleccionadas. F.A.C.E.N.A.-U.N.N.E..
18. Guedes, L.G., Souza, M.R., Nunes, A.C., Nicoli, J.R. and Santos, W.L.M.. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal and industrial "coalho" cheese against indicator microorganisms. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Vol.57, N° 2, 245-250.
19. Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y. and Zhang, L.. Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. Food Cont., Vol.22, N°7, 1027-1031.
20. Hammes, W.P. and Hertel, C.. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes, 3rd Ed., Ed. Springer, Vol.4, 320-430.
21. Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen P.. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.71, N°4, 394-406.
22. Fraga, M. y Zunino, P.. 2006. Lactobacilos intestinales: selección para su aplicación como probióticos. I.I.B.C.E., U.delaR..
23. Tojo, R., Leis, R., Barros, J. y Prado, M.. 2006. Productos lácteos fermentados. Probióticos en nutrición infantil. An. Pediatr., Monogr., Vol.4, N°1, 54-66.
24. Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R. and Tzia, C.. 2006. Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. J. Dairy Sci., Vol.90, N°6, 2641-2654.
25. Wang, S.Y., Chen, H.C., Liu, J.R., Lin, Y.C. and Chen, M.J.. 2008. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in taiwanese kefir and vili starters. J. Dairy Sci., Vol.91, N°10, 3798-3805.

26. Küçükçetin, A., Yaygin, H., Hinrichs, J. and Kulozik, U.. 2003. Adaptation of bovine milk towards mares' milk composition by means of membrane technology for koumiss manufacture. *Int. Dairy J.*, Vol.13, N°12, 945-951.
27. Liu, S., Han, Y. and Zhou, Z.. 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented chinese foods. *Review. Food Res. Int.*, Vol.44, N°3, 643-651.
28. González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E., 2010. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional spanish cheese. *Food Microbiol.*, Vol.27, N°5, 592-597.
29. Jolly, L., Vincent, S.J.F., Duboc, P. and Neeser, J.R.. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.*, Vol.82, N°1-4, 367-374.
30. Rojas, W.N., Chacón, A. y Pineda, M.L.. 2007. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. *Agron. Mesoam.*, Vol.18, N°2, 221-237.
31. Guzel, Z.B., Sezgin, E. and Seydim, A.C.. 2005. Influences of exopolysaccharides producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food Cont.*, Vol.16, N°6, 205-209.
32. Lopitz, F., Rementeria, A., Elguezabal, N. and Garaizar, J.. 2006. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev. Iberoam. Micol.*, Vol.23, N°2, 67-74.
33. Otles, S. and Cagindi, O.. 2003. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pak. J. Nutr.*, Vol.2, N°2, 54-59.
34. Grønnevik, H., Falstad, M. and Narvhus, J.A.. 2011. Microbiological and chemical properties of norwegian kefir during storage. *Int. Dairy J.*, Vol.21, N°9, 601-606.
35. Witthuhn, R.C., Schoeman, T. and Britz, T.J.. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *Int. Dairy J.*, Vol.15, N°4, 383-389.
36. Roberts, T.A., Cordier, J.L., Gram, L., Tompkin, R.B. and Pitt, J.I.. 2005. Milk and dairy products. *Microorganisms in foods 6. Microbial ecology of food commodities*, 2nd Ed., Ed. Springer, 643-715.
37. Yüksekdağ, Z.N., Beyatli, Y. and Aslim, B.. 2004. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from turkish kefirs with natural probiotic. *L.W.T. - Food Sci. Technol.*, Vol.37, N°6, 663-667.
38. Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P. and Ibáñez, F.C.. 2005. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chem.*, Vol.90, N°4, 613-620.

39. Chaves, C., Serio, A., Martuscelli, M., Paparella, A., Osorio, E. and Suzzi, G.. 2011. Microbiological characteristics of kumis, a tradicional fermented colombian milk, with particular emphasis on enterococci population. Food Microbiol., Vol.28, N°5, 1041-1047.
40. Wang, J., Chen, X., Liu, W., Yang, M., Airidengcaিকে and Zhang, H.. 2008. Identification of *Lactobacillus* from koumiss by conventional and molecular methods. Eur. Food Res. Technol., Vol.227, N°5, 1555-1561.
41. Chen, Y., Wang, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, H. and Sun, T.. 2010. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from koumiss, a traditional fermented mare's milk. J. Dairy Sci., Vol.93, N°3, 884-892.
42. Hao, Y., Zhao, L., Zhang, H., Zhai, Z., Huang, Y., Liu, X. and Zhang, L.. 2010. Identification of bacterial biodiversity in koumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction. J. Dairy Sci., Vol.93, N°5, 1926-1933.
43. Bornaz, S., Guizani, N., Sammari, J., Allouch, W., Sahli, A. and Attia, H.. 2010. Physicochemical properties of fermented arabian mares' milk. Int. Dairy J., Vol.20, N°7, 500-505.
44. Di Cagno, R., Tamborrino, A., Gallo, G., Leone, C., De Angelis, M., Faccia, M., Amirante, P. and Gobbetti, M.. 2004. Uses of mares' milk in manufacture of fermented milks. Int. Dairy J., Vol.14, N°9, 767-775.
45. Lourens-Hatting, A. and Viljoen, B.C.. 2002. Survival of probiotic bacteria in south african commercial bio-yogurt. S. Afr. J. Sci., Vol.98, N°5-6, 298-300.
46. Akin, M.S. and Güler, M.B.. 2005. Effect of different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt. Ital. J. Food Sci., Vol.17, N°1, 67-74.
47. Sanz, Y., Collado, M.C. and Dalmau, J.. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Pediatr. Esp., Vol.61, N°9, 476-482.
48. Güler, M.B.. 2005. The effects of different incubation temperatures on the acetaldehyde content and viable bacteria counts of bio-yogurt made from ewe's milk. Int. J. Dairy Technol., Vol.58, N°3, 174-179.
49. Kavas, G., Uysal, H., Kilic, S., Akbulut, N. and Kesenkas, H.. 2004. Production and selected properties of bioghurt made from goat milk and cow-goat milk mixtures by ultrafiltration and addition of skim milk powder. Int. J. Food Prop., Vol.7, N°3, 473-482.
50. Comisión del Codex Alimentarius. 2010. Norma del codex para leches fermentadas. Revisión. Codex Standard 243.

51. Heller, K.J.. 2008. Bacterias probióticas en alimentos fermentados. Características de los productos y microorganismos iniciadores. Mundo Lácteo y Cárnico, Julio-Agosto.
52. Universidad de Zulia. 2008. Cultivos iniciadores en leches fermentadas. Mundo Lácteo y Cárnico, Noviembre-Diciembre.
53. Vaclavik, V.A. and Christian, E.W.. 2008. Milk and milk products. Essentials of food science, 3rd Ed., Ed. Springer, 237-269.
54. Banina, A., Vukasinovic, M., Brankovic, S., Fira, D., Kojic, M. and Topisirovic, L.. 1998. Characterization of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. J. Appl. Microbiol., Vol.84, N^o4, 593-599.
55. Villegas, A., Hernández, N. y Santiago, O.. 2006. La leche acidófila: revisión de un producto lácteo fermentado de gran potencialidad en México. Carnilac Industrial, Alfa Editores Técnicos, Junio-Julio.
56. McDonough, F.E., Hitchins, A.D., Wong, N.P., Wells, P. and Bodwell, C.E.. 1987. Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose-intolerant persons. Am. J. Clin. Nutr., Vol.45, N^o3, 570-574.
57. Coker, C., Honoré, C., Johnston, K. and Creamer, L.. 1998. Manufacture and use of cheese products. Chemical processes in New Zealand. The dairy industry, 2^a Ed..
58. Morais, J.. 2004. Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra para la elaboración de queso. Universitat Autònoma de Barcelona.
59. Sanaguano, H., Ribadeneira, E.A. y Galarza, E.J.. 2008. Evaluación de tres niveles de grasa vegetal (aceite de maíz), en reemplazo de la grasa láctea para la elaboración de queso fresco, en el Instituto Técnico Agropecuario de la Sierra Luis A. Martínez.
60. McSweeney, P.L.H.. 2007. Cheese problems solved. 1st Ed., Ed. Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition.
61. Dianda, M.A.. 2005. Elaboración de quesos artesanales. 2^a Ed., Ed. Hemisferio Sur.
62. Cozzano, S. y Delgado, M.. 2003. Estudio del proceso de producción del queso Colonia y evaluación de la retención de sólidos en tres queserías artesanales. F.Agro., U.delaR..
63. Poveda, J.M.. 2001. Efecto de la utilización de distintos cultivos iniciadores en la proteólisis del queso Manchego. Otros aspectos de la maduración. Universidad de Castilla-La Mancha.
64. Menéndez, S. y Rodríguez, J.L.. 2000. Leuconsoctocs en quesería. Alimentación, equipos y tecnología, Julio-Agosto.

65. Contreras, P.A.. 2008. Identificación de bacterias responsables de fenómenos gaseosos indeseables en queso Gauda. Universidad Austral de Chile. Escuela de Ingeniería de Alimentos.
66. Christen, P.. 1995. Producción de aromas por fermentación en medio sólido. Tópicos de investigación y posgrado, Vol.4, N°2, 102-109.
67. Bello, J.M., Lizeldi, B.V., Gonzáles, E., Manzo, A., Nochebuena, X., Quiñónes, E.I. y Vázquez, C.. 2005. Productos lácteos: la ruta de la metamorfosis. Rev. Dig. Univ., Vol.6, N°9.
68. Navarrete, J.C. y Proaño, S.A.. 2006. Proyecto para la producción y comercialización del queso de leche de cabra para el consumo local de la ciudad de Guayaquil. Escuela Superior Politécnica del Litoral - Facultad de Ciencias Humanísticas y Económicas, Guayaquil, Ecuador.
69. Teuber, M. and Geis, A.. 2006. The genus *Lactococcus*. Prokaryotes, 3rd. Ed., Ed. Springer, Vol.4, 205-228.
70. Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E.B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. and von Wright A.. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and the regulation. Trends Food Sci. Technol., Vol.15, N°10, 498-505.
71. Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A.. 2005. Milk, fermentation, fermented and nonfermented dairy products. Modern food microbiology, 7th Ed., Ed. Springer, 149-173.
72. Schlegel, H.G. y Zaborosch, C.. 1997. Fermentación láctica y Lactobacteriáceas. Microbiología General, 7^a Ed., Ed. Omega, 302-309.
73. Serna, L. y Rodríguez, A.. 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. Cien. Tecnol. Aliment., Vol. 5, N°1, 54-65.
74. Gomez, J.C.. 1999. Métodos de control de acidez en yogur. Universidad Autónoma Chapingo.
75. Zambrano, M.C.. 2010. Elaboración de queso fresco con la utilización de un fermento probiótico (*Lactobacillus acidophilus*). Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial.
76. Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A.. 2005. Taxonomy, role, and significance of microorganisms in foods. Modern food microbiology, 7th Ed., Ed. Springer, 13-37.
77. Felis, G.E., Dellaglio, F. and Torriani, S.. 2009. Taxonomy of probiotics microorganisms. Prebiotics and probiotics science and technology, 1st Ed., Ed. Springer, 591-637.

78. Martins, A.A.. 2008. Caracterização molecular de bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico para produção de queijo de coalho no Ceará. Universidade Federal do Ceará.
79. Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. and Rodriguez, E.. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. J. Dairy Res., Vol.64, Nº3, 409-421.
80. Rodriguez, M.R.. 2003. Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.
81. de Vrese, M. and Schrezenmeir, J.. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 1st Ed., Ed. Springer, Vol.111, 1-66.
82. Rivas, C. y Mota. M.. 2006. Bacterias anaerobias. Temas de bacteriología y virología médica, 2^a Ed., Ed. Oficina del Libro FEFMUR, 355-380.
83. Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E. and Egoavil E.. 2007. Production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* L10 on batch and continuous cultivation. Rev. Peru. Biol., Vol.14, Nº2, 271-275.
84. Björkroth, J. and Holzapfel, W.. 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weisella*. Prokaryotes, 3rd Ed, Ed. Springer, Vol.4, 267-319.
85. Hemme, D. y Foucaud, C.. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. Int. Dairy J., Vol.14, Nº6, 467-494.
86. Holzapfel, W., Franz, C.M., Ludwig, W., Back, W. and Dicks, L.M.. 2006. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. Prokaryotes, 3rd Ed., Ed. Springer, Vol.4, 229-266.
87. Franz, C.M., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., De Wachter, M., Cleenwerck, I., Hoste, B., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. and Swings, J.. 2006. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. Int. J. Syst. Evol. Micr., Vol.56, Nº2, 329-333.
88. De Bruyne, K., Franz, C.M., Vancanneyt, M., Schillinger, U., Mozzi, F., Font, G., De Vuyst, L. and Vandamme, P.. 2008. *Pediococcus argentinicus* sp. nov., from argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. Int. J. Syst. Evol. Micr., Vol.58, Nº12, 2909-2916.
89. Hardie, J. and Whiley, R.A.. 2006. The genus *Streptococcus*-oral. Prokaryotes, 3rd Ed., Ed. Springer, Vol.4, 76-107.

90. Resa, P., Bolumar, T., Elvira, L., Pérez, G. and Montero, F.. 2007. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. *J. Food Eng.*, Vol.78, N°3, 1083-1091.
91. Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz, C. and Holzapfel, W.H.. 2008. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr. Microbiol.*, Vol.56, N°4, 315-321.
92. Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S. and Chevallier, I.. 2005. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiol.*, Vol.22, N°6, 529-538.
93. A.A.P.A.. 2004. Introducción a la tecnología de alimentos. 2ª Ed., Ed. Limusa.
94. Duarte, A., Márquez, E., Ferrer, A. y Páez, G.. 1992. Preparación de cultivos iniciadores homolácticos para ser utilizados en la fermentación de productos cárnicos. *Rev. Cient., FCV. de Luz*, Vol.2, N°2, 66-71.
95. Madera, C., García, P., Janzen, T., Rodríguez, A., Suárez, J.E.. 2003. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.86, N°3, 213-222.
96. Kandler, O.. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.*, Vol.49, N°3, 209-224.
97. Chammas, G.I., Saliba, R., Corrieu, G. and Béal, C.. 2006. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.110, N°1, 52-61.
98. Parker, J., Madigan, M.T. y Martinko, J.M.. 2004. Brock Biología de microorganismos. 10ª Ed., Ed. Pearson Alhambra.
99. Oliszewski, R., Van, C., González, S.N. y Pérez, A.B.. 2006. Identificación y caracterización tecnológica de bacterias ácido lácticas aisladas de leche de cabra y quesos artesanales del noroeste argentino. *Rev. Arg. de Lactología*, N° 24.
100. Cheriguene, A., Chougrani, F. and Bensoltane, A.. 2006. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from algerian goat's milk. *Pak. J. Biol. Sci.*, Vol.9, N°7, 1242-1249.
101. De Rossairt, H.B.. 1986. Lactic acid bacteria. In: milks and dairy products: cow, sheep and goat. Ed. Tec. and Doc., Vol.3, 343-408.
102. Alvarado, C., Chacón, Z., Otoniel, J., Guerrero, B. and López, G.. 2007. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. *Rev. Cient., FCV de Luz*, Vol.17, N°3, 301-308.

103. Souza, C.H. and Saad, S.M.. 2009. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. LWT - Food Sci. and Technol., Vol.42, N°2, 633-640.
104. Albillos, S.M.. 2003. Aplicación de la electroforesis capilar para el análisis y seguimiento del grado de maduración de quesos de oveja y mezcla de la provincia de Burgos. Universidad de Burgos.
105. Smyth, E., Clegg, R.A. and Holt, C.. 2004. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles. Int. J. Dairy Technol., Vol.57, N°2-3, 121-126.
106. Swaisgood, H.E.. 1992. Chemistry of the caseins. Advanced dairy chemistry. Appl. Sci., Vol.1, 63-110.
107. Mora, M.T. y Marcos, A.. 1982. Proteólisis del queso manchego: cambios en la distribución del nitrógeno soluble. Arch. Zootec., Vol.31, N°119, 27-36.
108. Farrell, H.M., Jimenez-Flores R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. and Swaisgood, H.E.. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk. 6th Revision. J. Dairy Sci., Vol.87, N°6, 1641-1674.
109. Trujillo, A.J.. 1996. Procesos de proteólisis primaria que intervienen en la maduración del queso de cabra. Universitat Autònoma de Barcelona.
110. Bruinenberg, P.G., Vos, P. and Vos, W.M. de. 1992. Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains: regulation and effect on growth and acidification in milk. Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, N°1, 78-84.
111. de Man, J.D., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol., Vol.23, N°1, 130-135.
112. Robyt J.F. and White, B.J.. 1990. Electrophoretic technique. Biochemical techniques: theory and practice. 1st Ed., Ed. Waveland Press., 129-157.
113. Huggins, A.R. and Sandine, W.E.. 1984. Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci. J. Dairy Sci., Vol.67, N°8, 1674-1679.
114. Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda, M.. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional egyptian dairy products according to production and technological criteria. Food Microbiol., Vol.21, N°6, 715-725.
115. Haddadin, J.S.Y.. 2005. Kinetic studies and sensorial analysis of lactic acid bacteria isolated from white cheese made from sheep raw milk. Pak. J. Nutr., Vol.4, N°2, 78-84.

116. Swearingen, P.A., O'Sullivan, D.J., Warthesen and J.J.. 2001. Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality. *J. Dairy Sci.*, Vol.84, N°1, 50-59.
117. Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N. and Topisirovic, L.. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.122, N°1-2, 162-170.
118. Idoui T., Boudjerda, J., Leghouch E. and Karam N.. 2009. Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: isolation, identification and major technological traits. *Grasas y aceites*, Vol.60, N°2, 177-183.
119. Pérez, S. y Kurioka, M.. 2008. Identificación de cepas de *Lactobacillus* aislados de suero y leche bovina, ovina y caprina. *Pasantía Experimental. Carrera Ingeniería de Alimentos*.
120. Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. and Catignani, L.. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, Vol.66, N°6, 1219-1227.