

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS, ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA, RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y PRODUCCIÓN DE
AMINAS BIÓGENAS EN *LACTOBACILLUS SPP.* AISLADOS DE SUERO
FERMENTOS DE COLONIA, URUGUAY**

“por”

**Sabrina Daiana LACUESTA BENITEZ
Natalia Lorena LEZCANO MARTINEZ**

**TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título
de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección,
Control y Tecnología de los alimentos
de origen animal**

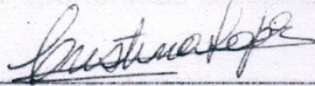
MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

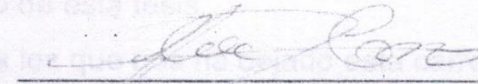
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:



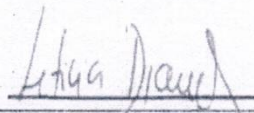
Dra. Cristina López

Segundo Miembro (Tutor):



Dra. PhD. Silvana Carro

Tercer Miembro:



Lic. Leticia Diana

Cuarto Miembro:



Dr. MSc. Dario Hirigoyen

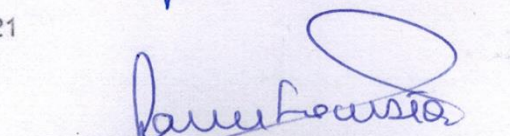
Quinto Miembro:



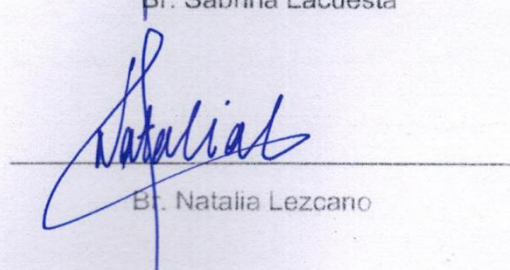
Dr. MSc. Álvaro González Revello

Fecha: 22 de Diciembre 2021

Autores:



Br. Sabrina Lacuesta



Br. Natalia Lezcano

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias y parejas por el apoyo incondicional brindado en todos estos años de carrera.

A nuestra tutora Silvana, por darnos la oportunidad de realizar el trabajo y por su apoyo.

A nuestro Co-tutor Álvaro, por el apoyo, los conocimientos y por los momentos compartidos en el laboratorio.

Al Dpto. de Ciencia y Tecnología de la Leche, a todos, que de una u otra manera nos han ayudado en el transcurso de esta tesis.

A nuestros amigos de siempre y a los que nos ha dejado esta carrera.

En especial, agradecemos que por medio de esta tesis generáramos esta linda amistad.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
Bacterias ácido lácticas (BAL)	8
Género <i>Lactobacillus</i>	9
Propiedades tecnológicas de interés de <i>Lactobacillus spp.</i>	11
Resistencia a los antimicrobianos	13
Aminas biógenas	13
ANTECEDENTES	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo	18
Evaluación de propiedades tecnológicas	18
Determinación de la actividad antimicrobiana	19
Evaluación del perfil de resistencia a los antimicrobianos	21
Determinación de aminas biógenas	21
RESULTADOS	24
Propiedades tecnológicas de interés	24
Resistencia a antimicrobianos	27
Producción de aminas biógenas	29
DISCUSIÓN	31
Propiedades tecnológicas	31
Actividad antimicrobiana	33
Resistencia a antimicrobianos	34
Aminas biógenas	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO	51

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

Tabla 1. Aminoácidos biogénicos, su aminoácido precursor y alimentos asociados a altos niveles de aminoácidos biogénicos.....	14
Tabla 2. Especies de <i>Lactobacillus</i> spp. utilizadas en este trabajo.....	18
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento <i>overnight</i> de las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antimicrobiana <i>well diffusion</i>	20
Tabla 4. Primers utilizados para la reacción de PCR para la detección de los genes <i>hdc</i> y <i>tdc</i> en los <i>Lactobacillus</i> spp. evaluados.....	23
Tabla 5. Acidificación, capacidad proteolítica, lipolítica y producción de diacetilo en aislamientos de <i>Lactobacillus</i> spp.....	24
Tabla 6. Actividad de cada SLC sin neutralizar de <i>Lactobacillus</i> spp. frente a <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Listeria innocua</i> y <i>Escherichia coli</i>	26
Tabla 7. Medidas de halos de inhibición (mm) frente a diferentes antimicrobianos, clasificados en resistente(R), moderadamente sensible (MS) y sensible (S).....	28
Tabla 8. Lista de antibióticos utilizados para evaluar la sensibilidad/resistencia por parte de los aislamientos de <i>Lactobacillus</i> spp. en estudio.....	51
Tabla 9. Puntos de corte utilizados para la clasificación de <i>Lactobacillus</i> spp. en sensibles (S), moderadamente sensibles (MS) o resistentes (R) según la medida del halo (mm) obtenido en la prueba de antibiograma.....	52
Tabla 10. Puntos de corte (mm) utilizados para clasificar a <i>Lactococcus lactis</i> ATCC N°11454 como resistente (R), moderadamente sensible (MS) y sensibles (S) según la medida del halo obtenido en la prueba de antibiograma.....	53
Tabla 11. Concentración de ADN de los aislamientos de <i>Lactobacillus</i> spp. utilizados en este trabajo.....	54

FIGURAS:

Figura 1. Rutas metabólicas de fermentación de glucosa por BAL.	10
Figura 2. Flujo de la técnica agar <i>well diffusion</i> para evaluación de la actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus</i> spp.....	20
Figura 3. Actividad lipolítica y proteolítica en los aislamientos de <i>Lactobacillus</i> spp.	25
Figura 4. Producción de diacetilo en leche UHT de aislamientos de <i>Lactobacillus</i> spp.....	25
Figura 5. Prueba de descarboxilación de aminoácidos en medio caldo base Moeller suplementado con L-histidina o L- tirosina de los aislamientos de <i>Lactobacillus</i> spp..	29
Figura 6. PCR-multiplex para la detección de los genes de las descarboxilasas de histidina (<i>hdc</i>) y tirosina (<i>tdc</i>) en los aislamientos de <i>Lactobacillus</i> spp.....	30

RESUMEN

En nuestro país, para la elaboración de quesos, particularmente los artesanales es frecuente la aplicación de suero fermento natural (SFN) como cultivo iniciador o *starter*. Éste, es una asociación compleja de cepas nativas de microorganismos, y está compuesto principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL) incluyendo especies reconocidas como cultivos *starter* o adjuntos (NSLAB), que mediante sus atributos tecnológicos aportan características sensoriales propias al queso. El objetivo del presente trabajo se enfocó en doce aislamientos de *Lactobacillus* spp. provenientes de SFN de Colonia, Uruguay con la finalidad de determinar sus características *in vitro* como potenciales cultivos *starter* o NSLAB. Se evaluó el perfil tecnológico en cuanto a acidificación, proteólisis, lipólisis y producción de diacetilo. La actividad antimicrobiana se realizó mediante la técnica de agar *well diffusion*, frente a diferentes microorganismos indicadores, con el fin de estudiar la posible producción de bacteriocinas. A su vez, se evaluó el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos mediante el método de Kirby-Bauer. La producción de aminas biógenas: tiramina e histamina fue evaluada fenotípicamente y se realizó mediante PCR, la búsqueda de los genes relacionados con las descarboxilasas respectivas (*tdc* y *hdc*). Los resultados obtenidos indicaron que las cepas de *L. helveticus* (Lh 193/Lh 198) presentaron el mejor perfil como posible cultivo *iniciador* ya que demostraron una alta capacidad de acidificación. Por otra parte, *L. plantarum* (Lp 155) presentó mejor potencial como NSLAB dada su capacidad lipolítica, proteolítica y de producción de diacetilo. En cuanto a la actividad antimicrobiana observada, se limitó a la producción de ácidos orgánicos y frente a un solo microorganismo indicador. Los aislamientos evaluados resultaron sensibles a la mayoría de los antimicrobianos evaluados, no obstante, se observó la presencia de resistencia a cefradina en las especies *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. casei*. Finalmente, no se detectó actividad descarboxilante por parte de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. ni se detectaron los genes relacionados. En conclusión, los resultados obtenidos demostraron que los aislamientos nativos de *Lactobacillus* spp. presentan aptitudes tecnológicas tanto como cultivos *starter* o NSLAB, no producirían aminas biógenas y en general la resistencia a los antimicrobianos fue la esperada.

SUMMARY

In Uruguay, the use of natural whey as a starter culture (NWS) for cheese production is frequent, specifically in artisanal cheeses. NWS is a complex association of native strains of microorganisms composed mainly of lactic acid bacteria (LAB) including species recognized as starter or adjunct cultures (NSLAB), that through their technological attributes contribute their sensory characteristics of the cheeses. The aim of the present work was focused on twelve strains of *Lactobacillus* spp. isolated from NWS from Colonia, Uruguay in which *in vitro* characteristics as a potential starter or adjunct cultures were determined. Also, the technological profile was evaluated through acidification, proteolysis, lipolysis, and diacetyl production. The antimicrobial activity was performed using the agar well diffusion technique, against different indicator strains to screen for bacteriocins production. Additionally, the antimicrobial sensitivity profile was evaluated by the Kirby-Bauer method. The production of biogenic amines: tyramine and histamine was also assessed as well as the related decarboxylases genes (tdc and hdc) by using PCR. The results obtained indicated that *L. helveticus* strains (Lh 193/Lh 198) presented the best profile as a possible starter culture since they showed a high acidification capacity. On the other hand, *L. plantarum* (Lp 155) presented better potential as NSLAB gave its lipolytic, proteolytic, and diacetyl production capacity. Regarding, the antimicrobial activity, it was limited to the production of organic acids and against a single indicator strain. The isolates evaluated were sensitive to most of the antimicrobials tested; however, resistance to cephradine was observed in the species *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, and *L. casei*. Finally, no decarboxylating activity or related genes was detected in the *Lactobacillus* spp. isolates. Therefore, the results showed that the native isolates of *Lactobacillus* spp. present technological aptitudes both as a starter or NSLAB cultures, would not produce biogenic amines and in general the resistance to antimicrobials was as expected.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La fermentación ácido láctica es ampliamente utilizada en la elaboración de diversos productos lácteos, los cuales responden a la actividad metabólica de ciertos microorganismos (bacterias, mohos, levaduras o una mezcla de éstos). Éstos pueden estar presentes naturalmente en la leche o ser agregados como cultivos “starters”, cuyas funciones esenciales son la producción de ácido láctico por medio de la fermentación de la lactosa y la producción de compuestos volátiles que contribuyen al aroma de los productos. Además, el ácido generado, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes (Suarez, 1997).

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas y desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; por lo cual son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad para acidificar y por lo tanto preservar alimentos, sino también su rol en el desarrollo de la textura, sabor y olor de los alimentos fermentados (Axelsson, 2004).

Las BAL constituyen un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, que difieren tanto desde el punto de vista morfológico como filogenético. Se caracterizan por producir ácido láctico como el principal metabolito producto de la fermentación (Axelsson, 2004). Son bacterias no esporuladas, con forma de cocos o bacilos, catalasa negativa, libre de citocromos y tolerantes al ácido y al oxígeno (Atanassova et al., 2003). Pueden crecer en temperaturas entre 5 y 45° C y su pH óptimo de crecimiento es de 5,5 a 6,5. Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales complejos que incluyen aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Vodnar, 2010). En este último siglo, se han estudiado ampliamente a varios géneros de BAL y son considerados seguros para su aplicación en alimentos y consumo humano o “GRAS” (*generally recognized as safe*) (De Angelis y Gobbetti, 2016). Dentro de las BAL existe un grupo de microorganismos llamado cultivos *starter* o iniciadores, estos son cultivos de microorganismos vivos que se agregan con el fin de hacer uso de su metabolismo, produciendo cambios bioquímicos durante la elaboración y maduración de los diversos productos lácteos. Los principales géneros utilizados corresponden a *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Los cultivos *starter* son empleados en la industria láctea para la elaboración de leches fermentadas, quesos, manteca y otros productos que para su obtención requieren ser fermentados (Borbonet, 2001; Hammes, 1990).

La producción de quesos en nuestro país está enfocada principalmente en quesos de pasta dura y semidura y es frecuente que en el proceso de elaboración en quesos artesanales se aplique SFN como cultivo iniciador (Borbonet, 2001; MGAP, 2021). Se ha estudiado en otros países que el SFN está constituido por una microbiota natural que presenta una variedad de géneros y especies dinámica, que influyen en las características del producto final, resaltando sus características sensoriales, debido a la complejidad de su composición (Bottari, Santarelli, Neviani y Gatti, 2010). Para algunos autores, esta microbiota se compone mayoritariamente por diferentes especies de lactobacilos termófilos homofermentativos y en menor medida lactobacilos heterofermentativos y *Streptococcus thermophilus* (Beresford,

Fitzsimons, Brennan y Cogan, 2001; Mucchetti y Neviani, 2006; Parente y Cogan, 2004).

El SFN, que es propio de cada zona geográfica, se produce diariamente en la quesería, aplicándose mediante sucesivos repiques, lo que conlleva a una selección natural de las cepas (Suarez, 1997). Además de su rol en la fermentación, ciertas cepas cumplen funciones durante la maduración de estos productos y resultan de gran importancia en el desarrollo de aromas y textura (Ricciardi et al., 2015). Según Bove et al., (2012) el desarrollo de las NSLAB (por su sigla en inglés “*non starter lactic acid bacteria*”) durante la maduración es debido a su capacidad de usar múltiples fuentes de nutrientes disponibles. En este caso forman parte de los cultivos secundarios o NSLAB que a diferencia de los cultivos *starters* no contribuyen, de manera significativa, en la formación de ácido láctico (Ricciardi et al., 2015). Normalmente comprenden especies de *Lactobacillus* mesófilos y mayoritariamente heterofermentativos (Chamba e Irlinger, 2004; Smit, Smit y Engels, 2005).

Género *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son cocobacilos, catalasa negativa (algunas cepas poseen una pseudocatalasa) acidúricas o acidófilas (Hammes y Vogel, 1995). Si bien su crecimiento óptimo se da en condiciones de anaerobiosis o microaerofilia, la mayoría de las cepas son capaces de desarrollarse en condiciones de aerobiosis (Kandler y Weiss, 1986). Los lactobacilos homofermentativos, producen principalmente, como producto final de fermentación primaria ácido láctico a partir de hexosas. Este grupo está integrado por *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus delbrueckii* (subespecies: *delbrueckii*, *thermophilus*, *bulgaricus*), *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus acidophilus* (Klaenhammer y De Vos, 2011; Sánchez y Ramírez, 2004; Tannock, 2004). Mientras que los heterofermentativos (incluso heterofermentativos facultativos) pueden formar otros productos como acetato, etanol, CO₂, formiato y succinato (Kandler, 1983). Algunas de las especies principales son *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* y *Levilactobacillus brevis* (Blanco y Fragenas, 2006)

En la Figura 1 se ilustran ambas rutas metabólicas.

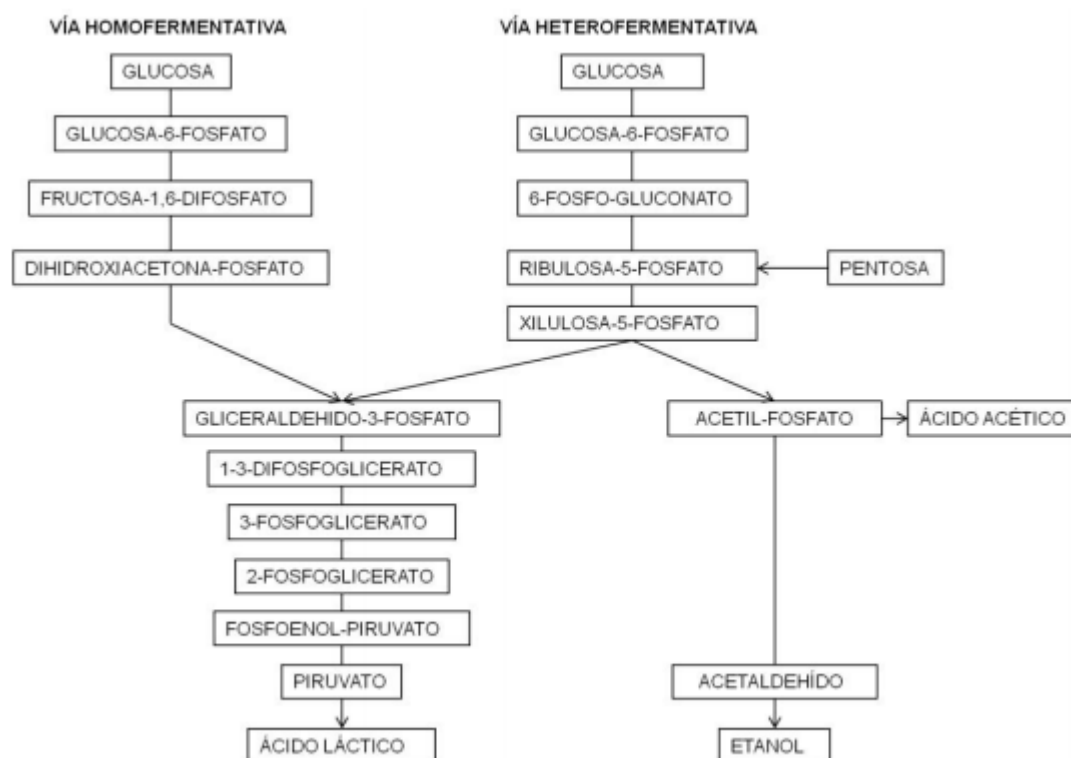


Figura 1. Rutas metabólicas de fermentación de glucosa por bacterias ácido lácticas (Axelsson, 2004).

Es frecuente en la elaboración de productos fermentados como el queso, el agregado de *Lactobacillus*, formando parte del cultivo *starter*, que presentan como principal función la producción de ácido láctico en una etapa inicial y que aportará características sensoriales a estos productos. Las principales especies de *Lactobacillus* en cultivos *starters* para la elaboración de quesos son *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, y *L. fermentum* (Beresford et al., 2001).

A su vez, además de ser utilizados como cultivo *starter*, los *Lactobacillus* pueden encontrarse formando parte del cultivo secundario o NSLAB. Éstos, toman relevancia en procesos más avanzados de la elaboración del queso, ya que durante la maduración comienzan a crecer y generar compuestos que aportan en gran medida al sabor y textura del producto final. *L. paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* son las principales especies de cultivos NSLAB utilizadas (Ricciardi et al., 2015).

Las especies de *Lactobacillus* utilizadas como *starter* son cuidadosamente seleccionadas y las más frecuentes son *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis* y *L. helveticus*. Dichas bacterias son aisladas de quesos de diferentes tipos, tales como Emmental, Parmegiano Reggiano y Gorgonzola, Mozzarella, Provolone y Caciocavallo (Stiles y Holzapfel, 1997).

Durante la maduración de los quesos la microbiota NSLAB comienza a aumentar, en contraposición a la del cultivo *starter*, del que sólo quedan enzimas y compuestos liberados por lisis celular (Bluma y Ciprovica, 2016).

Algunos estudios se han centrado en las capacidades metabólicas de ciertas NSLAB, específicamente sobre su capacidad de producción de compuestos

orgánicos volátiles (COV), ya que estos estarían relacionados al aroma de quesos madurados (Bezerra et al., 2016, Lazzi et al., 2016, Marilley y Casey, 2004; Sgarbi et al., 2013).

Propiedades tecnológicas de interés de *Lactobacillus spp.*

Dentro de los atributos tecnológicos en las BAL en general, se identifican propiedades metabólicas, con importancia directa para los productos lácteos, relacionadas con los procesos bioquímicos de glucólisis, proteólisis, lipólisis, y producción de diacetilo (Belgacem et al., 2010). Son estos procesos más complejos que ocurren durante la elaboración y maduración del queso. Los compuestos volátiles y no volátiles que se producen contribuyen al sabor (Fox, Guinee, Cogan y McSweeney, 2017).

En la elaboración de estos, existen diferentes etapas, cada una de estas afectará en diferentes aspectos y medidas al producto final (Uliescu, Rotaru, Mocanu y Stanciu, 2017). En relación con los cultivos, éstos son agregados en la etapa inicial de la elaboración posterior al tratamiento térmico de la leche, si es que existe y previo al agregado de la enzima coagulante.

Acidificación

La producción de ácido por parte del cultivo *starter*, tiene tres funciones importantes: favorece la actividad de la enzima coagulante (quimosina o cuajo) y el desuerado de la cuajada, reduciendo así el contenido en humedad del queso, y previniendo el crecimiento de bacterias indeseables (Poveda, 2001). La acidificación produce pérdida de humedad, debida a la diferencia de presión parcial de agua entre el interior y el exterior en quesos de pasta semidura y dura (Fox y McSweeney, 2004; Muñoz, Rosero y Cabrera, 2010). La acidificación es un atributo deseado en el cultivo *starter* y esencial en este proceso ya que procura una rápida acidificación de la materia prima y un desarrollo de características sensoriales particulares (Leroy, Verluyten y De Vuyst, 2006).

Propiedades proteolíticas

Durante la maduración, la proteólisis provoca el efecto contrario a la deshidratación, ya que la ruptura de la malla de caseínas, con la liberación de péptidos y aminoácidos, debilita la estructura del queso suavizando su textura y generando quesos de consistencia más blanda (Sánchez, Morales de la Nuez, Morena y Hernández, 2011).

Los péptidos obtenidos durante la proteólisis son utilizados como sustratos precursores para las enzimas bacterianas que los transforman en péptidos más pequeños y aminoácidos libres, que podrían seguir degradándose y formar compuestos volátiles como amoníaco, cetonas ácidas y compuestos azufrados que son los responsables del aroma de la mayoría de los quesos (Panizzolo, Araújo, Taroco, Rodríguez y Schöpf, 2011).

Propiedades lipolíticas

La lipólisis se define como el conjunto de las reacciones de hidrólisis de los triacilglicerolos para producir di o monoacilglicerolos, ácidos grasos libres (AGL) y glicerol (McSweeney, 2011). Durante la maduración, la lipólisis es una reacción minoritaria en comparación a la proteólisis, ésta es esencial, ya que los compuestos generados influyen en gran medida en el aroma y sabor del queso (Molimard y Spinnler, 1996). Esta actividad puede provenir de las enzimas de la leche o ser agregadas, así como también aquellas producidas por microorganismos *starters* y/o NSLAB.

Los AGL de cadena corta y media tienen umbrales de percepción bajos y son los que aportan características sensoriales que influyen de manera positiva o negativa en el queso. Además de aportar flavor por sí mismos, los AGL también pueden ser precursores para formar otros compuestos que impactan fuertemente en este aspecto, entre otros: metilcetonas, lactonas, ésteres, alcanos y alcoholes secundarios (Collins, McSweeney y Wilkinson, 2003; McSweeney y Sousa, 2000).

La lipólisis en ciertos casos puede ser excesiva y generar sabores rancios en los productos lácteos. En los quesos de pasta dura/cocida, la degradación de los triglicéridos es alta debido al elevado período de maduración que presentan estos quesos (Gobetti y Di Cagno, 2003). Generalmente los *Lactobacillus* son considerados débilmente lipolíticos. Liu, Holland y Crow (2004), reportaron actividad lipolítica intracelular en *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus acidophilus*.

Producción de diacetilo

Otros compuestos que pueden generarse en menor medida, mediante el metabolismo bacteriano del cultivo *starter* durante la maduración del queso, son diacetilo y acetoína. Ambos son compuestos estrechamente relacionados, que se caracterizan por aportar un aroma “mantecoso” a los productos.

El diacetilo se encuentra en bajas cantidades en el queso, aunque en varios tipos de quesos, como el Cheddar, Gouda, Emmental, Gruyere, Camembert, Swiss, Maasdam, Quarg, Mexican Chihuahua, Goat Cheese, el diacetilo es clave (Clark y Winter, 2015; Lo, Bansal y Turner, 2018). La producción de diacetilo ha sido ampliamente reconocida en especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* ocurriendo su máxima producción en su fase logarítmica tardía de crecimiento (Branen y Keenan, 1971; El-Gendy, Abdel-Galid, Shalin y Hegazi, 1983). En ciertas cepas de *Lactobacillus* spp., entre ellas *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, el diacetilo además de producirse vía piruvato puede ser producido a partir del citrato (Lo et al., 2018).

Actividad antimicrobiana del género *Lactobacillus*

Varios mecanismos antimicrobianos han sido descriptos para *Lactobacillus* spp., como la producción ácidos orgánicos (láctico, acético y fórmico), diacetilo, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y bacteriocinas. Siendo estas últimas las que han despertado mayor interés (Georgieva et al., 2015; Inglin Stevens, Meile, Lacroix y Meile, 2015). Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen ribosomal que

son secretados al medio extracelular y tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Beshkova y Frengova, 2012; Monroy, Castro, Fernández y Mayorga Reyes, 2009; Preciado et al., 2013). Se ha comprobado que pueden actuar sobre bacterias patógenas, especialmente Gram positivas y en algunas Gram negativas (Cleveland, Montville, Nes y Chikindas, 2001). En la actualidad, la nisina y pediocina PA-1, producida por *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici* respectivamente, son las bacteriocinas más utilizadas en la industria de alimentos con fines de conservación (Chollet, Sebti, Martial-Gros y Degraeve, 2008).

El mecanismo de acción y el rango de actividad de las bacteriocinas depende del tipo específico de bacteriocina producida (Abee, Krockel y Hill, 1995). Con respecto a las bacteriocinas descritas para *Lactobacillus* spp., se ha reportado su actividad contra *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Chen et al., 2019). Las plantaricinas E/F y J/K producidas por *L. plantarum* tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos. La síntesis de la plantaricina es sumamente compleja (Mourad, 2007). La helveticina J, producida por *Lactobacillus helveticus*, presenta una actividad antibacterial contra especies relacionadas. Poco se conoce de las características bioquímicas de dicha bacteriocina y de su modo de acción (Cintas, Casaus, Herranz, Nes y Hernández, 2001).

Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) ha sido identificada como una de las mayores amenazas a la salud humana, estando asociada a un alto costo médico, mayor hospitalización y tasa de mortalidad. Actualmente, existe la necesidad de controlar su propagación y reducir el riesgo en diversos sectores, como los agroalimentarios (Wang et al., 2019). Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes a los antibióticos como resultado de características estructurales o funcionales inherentes (intrínsecas), pero también pueden desarrollarla a través de la mutación de genes cromosómicos o adquisición de ADN exógeno (Nawaz et al., 2011). En el caso de características intrínsecas y las debidas a la mutación cromosómica, existe un bajo potencial de diseminación horizontal, mientras que las que son por adquisición de elementos genéticos móviles (plásmidos o transposones) pueden diseminarse más fácilmente (Manaia, 2017).

Los estudios epidemiológicos previos sobre RAM se han centrado principalmente en las bacterias patógenas clínicamente relevantes. Sin embargo, varios estudios indican que las bacterias no patógenas, como *Lactobacillus* spp., también pueden mostrar resistencia a antibióticos y contribuir a la diseminación de dichos genes a otros microorganismos, incluidos los patógenos humanos. Teniendo esto en cuenta, los productos alimenticios fermentados pueden servir como vía de difusión a la transmisión de RAM por las bacterias no patógenas a consumidores (Gazzola, Fontana, Bassi, y Cocconelli, 2012; Mathur y Singh, 2005; Morandi, Silvetti, Miranda Lopez y Brasca, 2015).

Aminas biógenas

Las aminas biógenas (AB) son compuestos nitrogenados que se producen a partir de aminoácidos por reacciones bioquímicas catalizadas mediante enzimas descarboxilasas. Éstas pueden ser de naturaleza endógena, las cuales se producen

naturalmente en las células animales, o provenir de forma exógena produciéndose por microorganismos (Halász, Barath, Simon-Sarkadi, y Holzapfel, 1994).

Los microorganismos productores de AB pueden ser contaminantes, aunque también pueden ser ciertos cultivos *starters* de la fermentación de alimentos. De hecho, algunas de las especies bacterianas ampliamente utilizadas en la industria láctea, consideradas “seguras” (o cepas “GRAS”) han demostrado ser productoras de AB (Fernández, Linares y Álvarez, 2004; Linares, Martín, Ladero, Alvarez y Fernández, 2011).

La formación de AB, a pesar de ser una característica no muy distribuida entre bacterias, especies de muchos géneros (*Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*) son capaces de descarboxilar aminoácidos.

Determinadas aminos biógenas tales como la histamina, tiramina, triptamina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermina, y espermidina son frecuentemente encontradas en alimentos, principalmente en pescado, carne, huevos, quesos, frutas, vegetales, cerveza y vinos (Ladero, Martinez, Martin Cruz, Fernández y Alvarez, 2010; Park et al., 2010) (Tabla 1). A su vez, pueden causar intoxicaciones alimentarias causadas especialmente por tiramina e histamina (Anastasio, Drasci y Pepe, 2010).

Tabla 1. Aminas biógenas, su aminoácido precursor y alimentos asociados a altos niveles de aminas biógenas.

Aminoácido precursor	Amina biógena	Alimentos que pueden contener elevados niveles de AB
Tirosina	Tiramina	Pasta de soja, soja fermentada, pasta de pescado, queso azul, queso de leche cruda, leche pasteurizada, salami, kéfir, sidra y vino.
Histidina	Histamina	
Lisina	Cadaverina	
Ornitina	Putrescina	
Arginina	Agmatina	

Adaptado de Río, Redruello, Fernández, Ladero y Álvarez, 2020.

Si bien las BAL son consideradas las mayores productoras de aminas biógenas en alimentos fermentados (Landete, Ferrer, Polo y Prado, 2005), la capacidad para producirlas se trata de una característica de cepa y no de especie (Bacus, 1984; Bover-Cid, Hugas, Izquierdo-Pulido y Vidal-Carau, 2000). Así, por ejemplo, *Enterococcus* y *Lactobacillus* se han descrito como responsables de la acumulación de tiramina en alimentos. En particular, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans* se consideran los principales productores de tiramina (Russo et al., 2010).

Por otra parte, a nivel genético, la formación de AB requiere la expresión de al menos dos genes, uno codifica la descarboxilasa y el otro el transportador involucrado en el intercambio de aminoácidos/aminas (Linares et al., 2016). En este sentido, el gen 'hdc' (histidina descarboxilasa) se ha descrito en diferentes cepas de BAL, de distintos orígenes, algunas de éstas son: *Lactobacillus hilgardii*,

Lactobacillus sakei, *Limosilactobacillus reuteri*, *Tetragenococcus muriaticus*, *Tetragenococcus halophilus*, *Lactobacillus saerimneri*, *Lactobacillus buchneri* y *Streptococcus thermophilus* (Trip, Mulder, Rattray y Lolkema, 2011). Así también, el gen 'tdc' (tiramina descarboxilasa) se ha caracterizado en *Enterococcus faecalis* (Connil et al., 2002), *Levilactobacillus brevis* (Lucas, Landete, Coton, Coton y Lonvaud-funel, 2003), *Enterococcus durans* (Fernández et al., 2004) y *Streptococcus thermophilus* (La Gioia et al., 2011).

ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, en nuestro país, el uso de SFN para la producción de quesos artesanales está muy extendido, conociéndose poco de su composición en bacterias ácido lácticas y de su potencial tecnológico. En este contexto, los trabajos nacionales son escasos y se han centrado en el aislamiento e identificación de las BAL y/o el estudio de sus propiedades bacteriocinogénicas (Fraga, Perelmuter, Giacaman, Zunino y Carro, 2013; Reginensi, González, y Bermúdez, 2013).

Por otra parte, las BAL presentes en el SFN en conjunto con la microbiota de la leche cruda, son responsables de la mayoría de las características del queso, teniendo un papel tecnológico, definiendo la calidad del producto, y atribuyéndole particularidades sensoriales y fisicoquímicas únicas (Bottari et al., 2010). En Uruguay tradicionalmente, los SFN son obtenidos y conservados a partir del suero remanente de elaboración de días anteriores, por lo que la composición de BAL sufre varios cambios debido principalmente a modificaciones en las condiciones ambientales (Bottari et al., 2010).

En este marco, entre 2015-2017, se desarrolló en la Unidad Académica de Ciencia y Tecnología de la Leche de Facultad de Veterinaria, el proyecto “Caracterización molecular y conservación de suero fermentos de quesos artesanales”. El objetivo general de este proyecto fue proporcionar al productor, su propio SFN conservado, y caracterizado en sus componentes, de manera de evitar grandes desvíos en la dinámica microbiana poblacional. Se obtuvo una colección de 187 aislamientos de BAL, 105 clasificados como *Lactobacillus* spp. A partir de algunos aislamientos de esta colección, se realiza esta tesis de grado, que busca complementar otros trabajos con información sobre propiedades tecnológicas industriales y aspectos que involucran la inocuidad de las cepas.

HIPÓTESIS

Lactobacillus spp. aislados de SFN de queserías artesanales, presentan propiedades de interés tecnológico.

Lactobacillus spp. aislados de SFN de queserías artesanales no presentan atributos que representen un riesgo en la inocuidad alimentaria.

OBJETIVOS

Objetivo General

En una colección de aislamientos de *Lactobacillus* spp. nativos evaluar propiedades tecnológicas de interés y algunas características inherentes a inocuidad alimentaria.

Objetivos Específicos

- Evaluar las propiedades tecnológicas: capacidad de acidificación, proteolítica, lipolítica y producción de diacetilo.
- Determinar *in vitro* la actividad antimicrobiana frente a los microorganismos indicadores *Streptococcus bovis*, *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.
- Explorar la resistencia a diferentes antimicrobianos de uso clínico.
- Evaluar fenotípicamente la capacidad de descarboxilación de los aminoácidos histidina y tirosina.
- Determinar la presencia de los genes que codifican las enzimas de descarboxilación de los aminoácidos histidina (*hdc*) y tirosina (*tdc*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo

Se utilizaron 12 aislamientos de *Lactobacillus* spp. de las especies que se indican en la Tabla 2, preservados a -20° C en caldo Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (HiMedia, India) suplementado con glicerol al 15% (v/v). *Estos aislamientos se pasaron a caldo MRS y se incubaron en microaerofilia a 37° C por 48 h. Posteriormente, la morfología colonial se confirmó en placas con Agar MRS (HiMedia, India), tinción de Gram y test de catalasa.*

Tabla 2. Especies de *Lactobacillus* utilizadas en este trabajo*

Especie	N° de aislamientos	Códigos
<i>L. rhamnosus</i>	6	Lr 8A, Lr 15, Lr 20A, Lr 117, Lr 139.
<i>L.casei/paracasei</i>	2	Lc 44, Lc 130B
<i>L. plantarum</i>	2	Lp 155, Lp 164B
<i>L. helveticus</i>	2	Lh 193, Lh 198
<i>L. gasseri</i>	1	Lg 59

*Las especies fueron determinadas mediante secuenciación del ARNr 16S por Lozano, (2019)

Evaluación de propiedades tecnológicas

Acidificación

Los aislamientos fueron sembrados en caldo MRS a 37° C por 24 h en anaerobiosis y se inocularon al 1 % (v/v) en leche descremada reconstituida estéril (10% m/v, CONAPROLE, Uruguay) realizándose dos pasajes sucesivos en leche para la activación de las cepas. La capacidad acidificante de cada cultivo se determinó en 100 mL de leche descremada reconstituida estéril (10% m/v, CONAPROLE, Uruguay) sembrando al 1% (v/v) cada caldo e incubando a 37° C por 24 h (Durlu-Ozkaya, Xanthopoulos, Tunail y Litopoulou-Tzanetaki, 2001). Posteriormente se midió el pH utilizando un pH-metro, (Acorn series, Oakton, USA) y la acidez titulable expresada en grados Dörmic.

Capacidad proteolítica

La proteólisis se determinó siguiendo el método propuesto por Franciosi Settanni, Cavazza y Poznanski (2009) el que consistió en sembrar cultivo fresco de cada aislamiento sobre la superficie de placas conteniendo leche en polvo descremada

(10 % m/v, CONAPROLE, Uruguay) con agar bacteriológico al 2 % m/v, (HiMedia, India). Las mismas fueron incubadas a 37° C durante 48 h en anaerobiosis. La actividad proteolítica se constató como una zona clara (halo) alrededor de las colonias. Como controles se utilizaron las cepas de: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (positivo) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (negativo).

Capacidad lipolítica

La lipólisis se evaluó mediante la siembra en estría de cada aislamiento (cultivo activo en MRS a 37° C por 24 h sobre la superficie de placas conteniendo Spirit Blue Agar (Difco®, USA) suplementado con dos fuentes diferentes de ácidos grasos, tributirina (con 3 % v/v de lipase reagent, Difco®, USA) o suplementado con 3 % v/v de una emulsión lipídica de grasa láctea (1 mL Polisorbato 80, 400 mL agua ultra pura y 100 mL de crema de leche con 38% de materia grasa) (Frank, Yousef , Wehr y Frank, 2004). La ventaja de este último medio es que emplea grasa láctea, la cual es uno de los sustratos utilizados por las BAL en los fenómenos de lipólisis de quesos (Nieto-Arribas, Poveda, Seseña, Palop y Cabezas, 2009). Las placas se incubaron a 37° C por 72 h en anaerobiosis. La lectura de las placas se realizó evaluando la aparición de halos alrededor de las colonias. Como controles se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (positivo) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (negativo).

Producción de diacetilo

La producción de diacetilo se determinó utilizando tubos con 10 mL de leche entera UHT (CONAPROLE, Uruguay) que fueron inoculados (1% v/v) con una suspensión bacteriana (crecimiento por 24 h en MRS, centrifugada a 5000 g por 5 min a 4° C, con lavado y re-suspensión en solución buffer fosfato estéril 10 mM, pH 7,4) e incubados a 37° C por 24 h (Franciosi et al., 2009; King, 1948). Para la lectura, a 1 mL del cultivo se adicionó 0,5 mL de una solución de alfa naftol al 1%, (Dinámica®, Brasil) e hidróxido de potasio al 16%, (Merck®, Alemania) y se incubó a 37° C por 10 minutos. La reacción se consideró positiva cuando existió la formación de un anillo rojo en la superficie del tubo. Los resultados fueron clasificados como débiles, moderados o fuertes de acuerdo con la intensidad de color del anillo formado (De Almeida Júnior et al., 2015). Como controles se utilizaron las cepas de *Lactococcus lactis diacetylactis* GU967439 (positivo) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (negativo) (Fraga, Perelmutter, Giacaman, Carro 2013).

Determinación de la actividad antimicrobiana

Mediante la técnica de agar *well diffusion* se evaluó la actividad antimicrobiana de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. frente a los indicadores: *E. coli*, *S. bovis* y *L. innocua*. Se utilizaron como controles caldo MRS (negativo) y *L. Lactis* GU967439 (productora de bacteriocina) (Fraga, Perelmutter, Delucchi, Cidade y Zunino, 2008). Las etapas básicas para el ensayo se indican en la Figura 2.

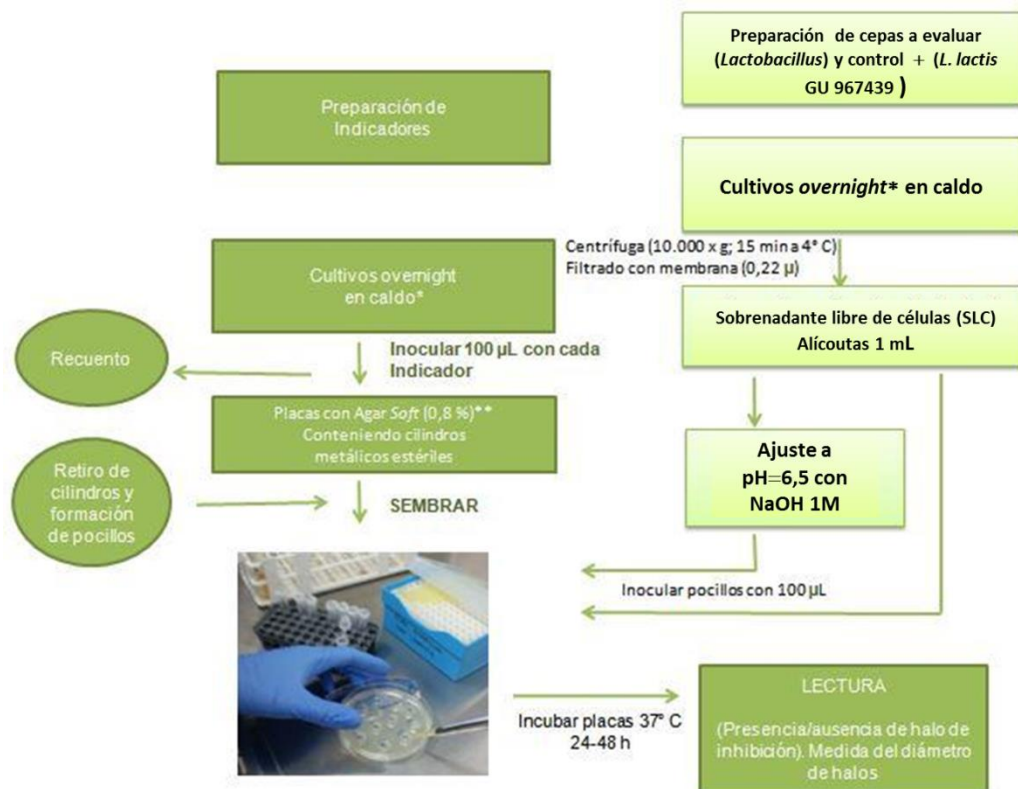


Figura 2.Flujograma de la técnica agar well diffusion para evaluación de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* spp.

**overnight*: crecimiento en estufa 37°C por 12-18 h **0,8 % de agar bacteriológico cada 100 mL de caldo de cultivo.

Para la reactivación de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. y de los indicadores, se procedió a preparar cultivos *overnight*, en las condiciones que se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento *overnight** de las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antimicrobiana *well diffusion*.

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Escherichia coli</i> ATCC N° 25922	Brain Heart Infusion (BHI, Hi-Media, India)	37° C por 12-18 h en aerobiosis
<i>Streptococcus bovis</i> 2.5 Wild Type (WT)	Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (Hi-Media, India)	37° C por 12-18 h en aerobiosis
<i>Listeria innocua</i> ATCC N°33090	Brain Heart Infusion, suplementado 0,6% m/v con extracto de levadura (BHI-Ye)	37° C por 12-18 h en aerobiosis
<i>Lactobacillus</i> spp.	Mann-Rogosa-Sharpe (MRS)	37° C por 12-18 h en microaerofilia
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC N° 11454	M17 (Hi-media, India)	37° C por 12-18 h en aerobiosis

**overnight*: crecimiento en estufa 37°C por 12-18 h.

Para la obtención del SLC se partió de una alícuota de 1 mL de cada cultivo *overnight* de los diferentes aislamientos de *Lactobacillus* spp. y de *Lactococcus lactis* (indicador positivo), se centrifugaron a 10.000 g por 15 minutos a 4° C y luego se retiró el sobrenadante. Para eliminar la posible acción antimicrobiana debida a la producción de ácidos, también se probaron SLC neutralizados con NaOH 1 M de cada aislamiento en estudio.

En cada placa con agar *soft* (0,8 % m/v agar bacteriológico, Hi-Media, India) correspondiente para cada indicador (Tabla 3) se procedió a inocular los SLC de cada aislamiento de *Lactobacillus* y los controles. Luego de incubar a 37° C por 24 h, se realizó la lectura. Se consideró inhibición positiva a las cepas que generaron una zona translúcida o halo de inhibición alrededor del pocillo (Fraga et al., 2008).

Evaluación del perfil de resistencia a los antimicrobianos

Para evaluar el perfil de resistencia a antimicrobianos por parte de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. se utilizó la técnica de Kirby-Bauer, con modificaciones (Charteris, Kelly, Morelli y Collins, 1998), utilizando MRS agar. Colonias aisladas de cultivos puros se suspendieron en diluyente estéril, ajustando la concentración bacteriana a una densidad 0,5 de la escala Mc. Farland (1×10^8 UFC/mL aprox.). Posteriormente, se sembraron placas de agar MRS, por medio de un hisopado en superficie y se colocaron de manera aséptica los discos con los antibióticos utilizados (Tabla 9, Anexo 1). Se incubaron las placas a 37° C por 48 h en microaerofilia y se midieron los halos generados alrededor del disco. Como control de la técnica se utilizó *Lactococcus lactis* ATCC N°11454. Los aislamientos se clasificaron como resistentes, medianamente sensibles y sensibles tomando como referencia a Charteris et al., (1998) y CLSI, (2012) (Tabla 8, Anexo I).

Determinación de aminos biógenas

Prueba de descarboxilación de aminoácidos

Se realizó la prueba conforme a Moeller, (1955) con modificaciones de Partovi et al., (2019). Para ello, tubos con 5 mL de caldo base Moeller (Merck, Alemania), suplementados al 1% con los aminoácidos L-histidina (Sigma, Alemania) y L-tirosina (Sigma, Alemania), se inocularon con 20 µL de una suspensión en diluyente estéril (NaCl 0,85 %) de colonias de cada uno de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. En cada caso se utilizó una concentración ajustada al 0,5 de la escala Mc. Farland (1×10^8 CFU/mL aprox.). Posteriormente, cada tubo fue cubierto con 1 mL de aceite mineral, incubándose a 37° C por 1-4 días. Como controles positivos se utilizaron las cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 (*tdc*⁺) y *L. casei* 130A (*hdc*⁺), cepa nativa caracterizada previamente. Paralelamente fueron incubados tres controles de la técnica, los cuales contenían el medio de cultivo, uno suplementado con el correspondiente aminoácido y sin inóculo, otro sin suplementar con inóculo y por último sólo el medio de cultivo (sin suplementar y sin inóculo). Finalmente, la lectura se realizó posterior a la incubación considerando que las cepas que presentan descarboxilasas, metabolizan el aminoácido presente a su respectiva amina, elevando el pH del medio de cultivo que vira al color púrpura-violeta (indicador

púrpura de bromocresol). Las cepas negativas fermentan la glucosa, manteniendo el pH ácido (color amarillo del medio).

Detección de genes de descarboxilasas

Se realizó la detección de los genes de las descarboxilasas de histidina (*hdc*) y tirosina (*tdc*) en los aislamientos de *Lactobacillus* spp., utilizando la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se realizó la técnica propuesta por Longhi et al., (2003) utilizando ebullición en presencia de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Alemania). A partir de cultivos puros de *Lactobacillus* (37° C por 48 h en caldo MRS), se centrifugó una alícuota de 1mL (5000 g, 5 min, 4°C) para obtener un *pellet* celular. El *pellet* se resuspendió y lavó dos veces con 1 ml de PBS (NaCl 0,1 M, pH 7,4). Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se re-suspendió en 100 µL de PBS + Tween 20 (0,05%) y se llevó a ebullición por 10 min. Luego se centrifugó nuevamente a 16.000 g, 15 min a 4° C. El sobrenadante conteniendo el ADN fue recuperado y almacenado a -20° C hasta su uso. El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, EU). La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Puesta a punto de la PCR

Para la amplificación de los genes *hdc* y *tdc* se realizó la puesta a punto de la técnica de PCR-multiplex, de acuerdo con lo propuesto por Coton y Coton (2005), con modificaciones de Elsanhoty y Ramadan, (2016). Como controles positivos para los genes se utilizó ADN de *Enterococcus faecalis* N° ATCC 29212 (*tdc*⁺) (Coton, Coton, Lucas y Lonvaud-funel, 2004) y de *Lactobacillus casei/paracasei* (Lc 130A, *hdc*⁺). Como control interno de la técnica se incorporó en la PCR-multiplex la amplificación del gen ribosomal 16S (control del ADN genómico) (Coton et al., 2005). Como control negativo se utilizó agua para PCR en lugar de ADN. La secuencia de los *primers*, el tamaño del amplicón y las referencias utilizadas se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. *Primers* utilizados para la reacción de PCR para la detección de los genes *hdc* y *tdc* en los *Lactobacillus* evaluados

Nombre <i>primer</i>	Secuencia del fragmento	Tamaño (pb)	Autor
HDC3	5'- GATGGTATTGTTTCKTATGA-3'	435	(Coton, 1996)
HDC4	5'- CAAACACCAGCATCTTC -3'		
TD2	5'-ACATAGTCAACCATRTTGAA-3'	1133	(Coton y Coton, 2004)
TD5	5'-CAAATGGAAGAAGAAGTAGG3'		
BSF8	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1533	(Lane, 1991)
BSR1541	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'		

Se determinaron las condiciones óptimas de temperatura de *annealing* y concentración de magnesio, realizando una PCR en gradiente de temperatura (44-52° C) y de concentración de MgCl₂ (2, 2,5 y 3 µM). En base a lo anterior, las condiciones finales para la reacción fueron las siguientes: buffer de PCR (1X, KCl, pH=8,8), 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP's (Fermentas, Alemania), 20 pmol de los *primers hdc* y *tdc*, 5 pmol de *primers* BSF8 y BSR1541, 1 U de Taq Polimerasa (Thermo Scientific, USA) y 100 ng de ADN de cada aislamiento en estudio. La reacción se realizó en un termociclador (Sensoquest, Gottingen, Alemania) con el siguiente ciclado: desnaturalización inicial de 95° C x 5 min, seguido de 32 ciclos de 95° C x 45 seg, 52° C x 45 seg y 72° C x 1 min y 15 seg. La extensión final se realizó a 72° C x 5 min. Los productos de PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en Tris-borate-EDTA (TBE) 1X teñido con Sybr® Safe (Thermo Scientific, USA). Para estimar el tamaño de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Fermentas, Alemania). Los productos se visualizaron utilizando un transiluminador UV (Labnet International, Inc. USA).

RESULTADOS

Propiedades tecnológicas de interés

Los aislamientos de *Lactobacillus* spp. fueron evaluados en cuanto a: capacidad de acidificación, proteolítica, lipolítica y de producción de diacetilo. En la Tabla 5 se resumen los principales resultados obtenidos.

Tabla 5. Acidificación, capacidad proteolítica, lipolítica y producción de diacetilo en aislamientos de *Lactobacillus* spp.

Código/ Especie *	Acidificación 37° C 24hs			Capacidad proteolítica	Capacidad lipolítica		Producción de diacetilo***
	pH	Acidez (°D)	Grupos de Acidificación**		Leche	Tributirina	
Lr 8A	5,6	41	Baja	-	+	+	+(1)
Lr 15	5,01	60	Media	-	+	+	-
Lr 20A	5,72	40	Baja	-	+	+	+(3)
Lc 44	5,49	35	Baja	-	+	+	+(1)
Lg 59	4,5	145	Alta	-	+	-	-
Lr 117	4,61	89	Media	+	+	+	-
Lc 130B	4,56	78	Media	-	+	+	-
Lr 139	4,72	46	Media	-	+	+	-
Lp 155	5,14	52	Media	+	+	+	+(1)
Lp 164B	4,87	57	Media	+	+	+	-
Lh 193	3,3	178	Alta	+	+	-	-
Lh 198	3,27	175	Alta	-	+	-	-

*Lr= *Lactobacillus rhamnosus*, Lc=*Lactobacillus casei/paracasei*, Lg=*Lactobacillus gasseri*, Lp=*Lactobacillus plantarum*, Lh=*Lactobacillus helveticus*. **Capacidad acidificante alta= 149,83 °D $\pm$ 21,52; pH 3,71 $\pm$ 0,52. Capacidad acidificante media = 68,50 $\pm$ 14,53; pH= 4,76 $\pm$ 0,24. Capacidad acidificante baja= 38,03 $\pm$ 7,40: pH=5,55 $\pm$ 0,21 (Análisis de clústeres de K-medias (p<0,05) NCSS software) (Lazzarini, 2019). ***Grados de producción de diacetilo: 1-débiles, 2-moderados, 3-fuertes (de acuerdo con la intensidad de color del anillo formado).

En cuanto a la actividad proteolítica y lipolítica en la Figura 3, se indica la detección en los medios de cultivo empleados. La actividad proteolítica encontrada en los aislamientos en general fue baja (4/12 cepas) detectándose en las dos cepas de *L. plantarum* (Lp 155 y Lp 164b), en una cepa de *L. helveticus* (Lh 193) y en una de *L. rhamnosus* (Lr 117). A su vez todas las cepas presentaron lipólisis de la grasa láctea y en menor medida de la tributirina (9/12). La capacidad de hidrolizar la tributirina estuvo ausente en las cepas de *L. helveticus* y *L. gasseri*.

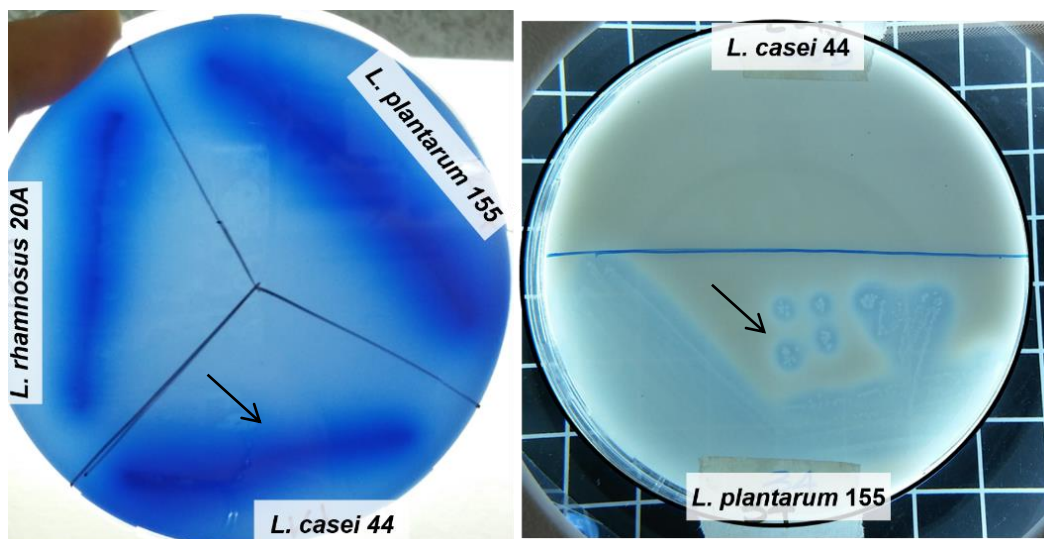


Figura 3. Actividad lipolítica y proteolítica en los aislamientos de *Lactobacillus* spp.
Lipólisis en Spirit Blue agar suplementado con grasa láctea (imagen izquierda), aislamientos positivos (halo azul alrededor de las colonias). Proteólisis de la caseína en agar en agar leche (imagen derecha) cepas *L. plantarum* 155 (Lp 155) (prot+) y *L. casei* 44 (Lc 44) (prot-).

En referencia a la producción de diacetilo, la misma fue evaluada en leche en base a la intensidad de la reacción colorimétrica observada (Figura 4). Sólo cuatro cepas presentaron dicha capacidad: dos de *L. rhamnosus* (Lr 8A y Lr 20A), una de *L. casei* (Lc 44) y una de *L. plantarum* (Lp 155). El grado máximo se evidenció en la cepa *L. rhamnosus* (Lr 20A)



Figura 4. Producción de diacetilo. Producción de diacetilo en leche UHT de aislamientos de *Lactobacillus* spp.
Control positivo: *Lactococcus lactis diacetylactis*. Control negativo: *E. coli*. Aislamiento positivo: *L. rhamnosus* (Lr 8A) grado de producción 1 (bajo).

Aspectos de inocuidad alimentaria

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó utilizando la técnica de *well diffusion* utilizando el SLC de los diferentes aislamientos de *Lactobacillus* spp. El efecto de cada SLC sin neutralizar, inhibió en todos los casos el crecimiento de *Streptococcus bovis*, pero no afectó el de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

Tabla 6. Actividad de cada SLC sin neutralizar de *Lactobacillus* spp. frente a *Streptococcus bovis*, *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

Código*	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>
Lr 8 ^a	16	S/D	S/D
Lr 15	14	S/D	S/D
Lr 20 ^a	17	S/D	S/D
Lc 44	14	S/D	S/D
Lg 59	13	S/D	S/D
Lr 117	18	S/D	S/D
Lc 130B	15	S/D	S/D
Lr 139	14	S/D	S/D
Lp 155	13	S/D	S/D
Lp 164B	13	S/D	S/D
Lh 193	14	S/D	S/D
Lh 198	13	S/D	S/D

*Lr=*Lactobacillus rhamnosus*, Lc=*Lactobacillus casei/paracasei*, Lg=*Lactobacillus gasseri*, Lp=*Lactobacillus plantarum*, Lh=*Lactobacillus helveticus*. S/D=Sin detección.

Por otra parte, cuando se exploró si la actividad se mantenía al neutralizar el ácido, no se observó actividad antimicrobiana por ninguno de los aislamientos de *Lactobacillus* spp.

Resistencia a antimicrobianos

Se evaluó la resistencia a los principales antimicrobianos de uso clínico. En la Tabla 7, se ilustran los resultados obtenidos de la técnica Kirby Bauer, clasificándose los aislamientos de *Lactobacillus* spp. de acuerdo con la evaluación efectuada. Los mismos fueron clasificados en resistentes (R), moderadamente sensibles (MS) y sensibles (S) según los puntos de corte detallados en la Tabla 9 y 10, Anexo I.

Tabla 7. Medidas de halos de inhibición (mm) frente a diferentes antimicrobianos, clasificados en resistente(R), moderadamente sensible (MS) y sensible (S).

Grupo	Nombre	Código antibiótico*	Código <i>Lactobacillus</i> ** (diámetro del halo en mm y clasificación)														
			Lr 8A	Lr 15	Lr 20A	Lc 44	Lg 59	Lr 117	Lc 130B	Lr 139	Lp155	Lp 164B	Lh193	Lh 198	<i>L. lactis</i>		
Grupo 1 inhibidores de la síntesis de la pared celular	Penicilinas	Penicilina G ^a	P10	28 (S)	38 (S)	30 (S)	31 (S)	35 (S)	33 (S)	44 (S)	35 (S)	35 (S)	27 (S)	24 (MS)	24 (MS)	40 (S)	
		Carbenicilina ^b	CAR100	33 (S)	38 (S)	28 (S)	38 (S)	36 (S)	35 (S)	40 (S)	37 (S)	36 (S)	30 (S)	31 (S)	38 (S)	41	
	Cefalosporinas	Cefotaxima ^a	CTX30	25 (S)	25 (S)	25 (S)	19 (MS)	27 (S)	24 (S)	26 (S)	28 (S)	40 (S)	41 (S)	31 (S)	41 (S)	40 (S)	
		Cefradina ^a	CE30	13 (R)	14 (R)	14 (R)	0 (R)	12 (R)	10 (R)	9 (R)	0 (R)	25 (S)	30 (S)	22 (S)	46 (S)	30 (S)	
	Glicopéptidos	Vancomicina ^a	VA5	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0(R)	0 (R)	0 (R)	20	
Grupo 2- inhibidores de síntesis de proteína	Aminoglucósidos	Gentamicina ^b	CN10	30 (S)	30 (S)	36 (S)	30 (S)	24 (S)	32 (S)	26 (S)	24 (S)	26 (S)	23 (S)	21 (S)	31 (S)	28	
		Kanamicina ^a	K30	0 (R)	7 (R)	8 (R)	0 (R)	0 (R)	10 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	21 (S)	
		Estreptomicina ^a	S10	10 (R)	12 (MS)	12 (MS)	0 (R)	11 (R)	13 (MS)	0 (R)	10 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	11 (R)	
	Tetraciclinas	Tetraciclina ^a	TE30	35 (S)	35 (S)	36 (S)	44 (S)	32 (S)	40 (S)	28 (S)	34 (S)	31 (S)	27 (S)	32 (S)	30 (S)	41 (S)	
	Macrólidos	Eritromicina ^a	E15	20 (S)	40 (S)	36 (S)	40 (S)	33 (S)	39 (S)	49 (S)	32 (S)	35 (S)	40 (S)	32 (S)	33 (S)	35 (S)	
	Lincosamidas	Clindamicina ^a	DA2	15 (S)	25 (S)	28 (S)	26 (S)	30 (S)	30 (S)	20 (S)	29 (S)	20 (S)	17 (S)	12 (S)	40 (S)	36 (S)	
	Oxazolidinonas	Linezolid ^b	LZD30	31 (S)	35 (S)	34 (S)	39 (S)	30 (S)	35 (S)	40 (S)	33 (S)	40 (S)	42 (S)	35 (S)	50 (S)	40 (S)	
	Antibióticos individuales	Cloranfenicol ^a	C30	20 (S)	30 (S)	32 (S)	40 (S)	28 (S)	36 (S)	30 (S)	30 (S)	32 (S)	40 (S)	31 (S)	40 (S)	34 (S)	
	Grupo 3- inhibidores de la síntesis de ácido nucleico	Quinolona	Levofloxacina ^b	LEV5	21 (S)	25 (S)	25 (S)	24 (S)	25 (S)	31 (S)	15 (MS)	26 (S)	12 (MS)	11 (R)	8 (R)	10 (R)	28 (S)

* Clindamicina, 2µg (DA2); Linezolid 30 µg (LZD30); Penicilina G 10 µg (P10); Kanamicina 30 µg (K30); Gentamicina 120 µg (CN120); Levofloxacina 5 µg (LEV5); Cefotaxime 30 µg (CTX30); Carbenicilina 100 µg (CAR100); Eritromicina 15 µg (E15); Cefradina 30 µg (CE30); Vancomicina 5 µg (VA5); Tetraciclina 30 µg (TE30); Cloranfenicol 30 µg (C30); Estreptomicina 10 µg (S10).

** Lr= *Lactobacillus rhamnosus*, Lc=*Lactobacillus casei/paracasei*, Lg=*Lactobacillus gasseri*, Lp=*Lactobacillus plantarum*, Lh=*Lactobacillus helveticus*. *L. lactis* = *Lactococcus lactis* ATCC N°11454
Puntos de corte: a=Charteris et al., 1998. b=Clinical and laboratory standards institute, 2012

Producción de aminas biógenas

Se evaluó en las cepas de *Lactobacillus* spp. la capacidad de producir las aminas biógenas histamina y tiramina. Esta capacidad se determinó fenotípicamente (descarboxilación de aminoácidos precursores) y genotípicamente (presencia de genes para descarboxilasas).

Prueba de descarboxilación de aminoácidos

Todos los aislamientos evaluados resultaron negativos en el ensayo, por lo que ninguno fue capaz de descarboxilar la histidina y tirosina. En la Figura 5, se muestran los resultados a la prueba de descarboxilación de los aminoácidos tirosina e histidina en el caldo base Moeller.

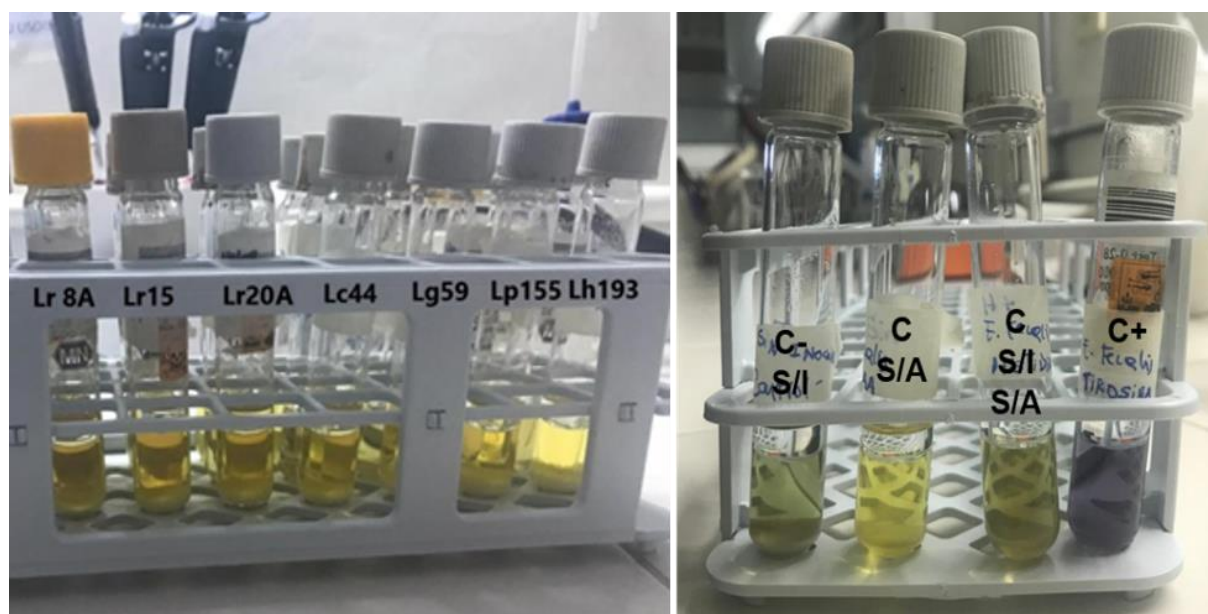


Figura 5. Prueba de descarboxilación de aminoácidos en medio caldo base Moeller suplementado con L-histidina o L- tirosina de los aislamientos de *Lactobacillus* spp.

Izquierda: aislamientos de *Lactobacillus* spp. en estudio= Lr 8A, Lr 15, Lr 20A, Lc 44, Lg 59, Lp 155, Lh 193. Derecha: controles utilizados para la prueba de descarboxilación de L-tirosina. Control negativo sin inóculo (C- S/I). Control negativo sin aminoácidos (C S/A). Control medio de cultivo: sin inóculo y sin aminoácido (C S/I S/A). Control positivo: medio suplementado e inoculado con *E. faecalis* (C+).

Reacción de PCR para amplificación de los fragmentos de los genes *hdc* y *tdc*

En la Figura 6 se ilustra la PCR-multiplex, no habiéndose detectado los genes histidina descarboxilasa (*hdc*) y tirosina descarboxilasa (*tdc*), en ninguno de los aislamientos.

En la Tabla 11, Anexo I se muestran los resultados de concentración y pureza del ADN de los aislamientos en estudio, el cual resultó íntegro y de buena calidad.

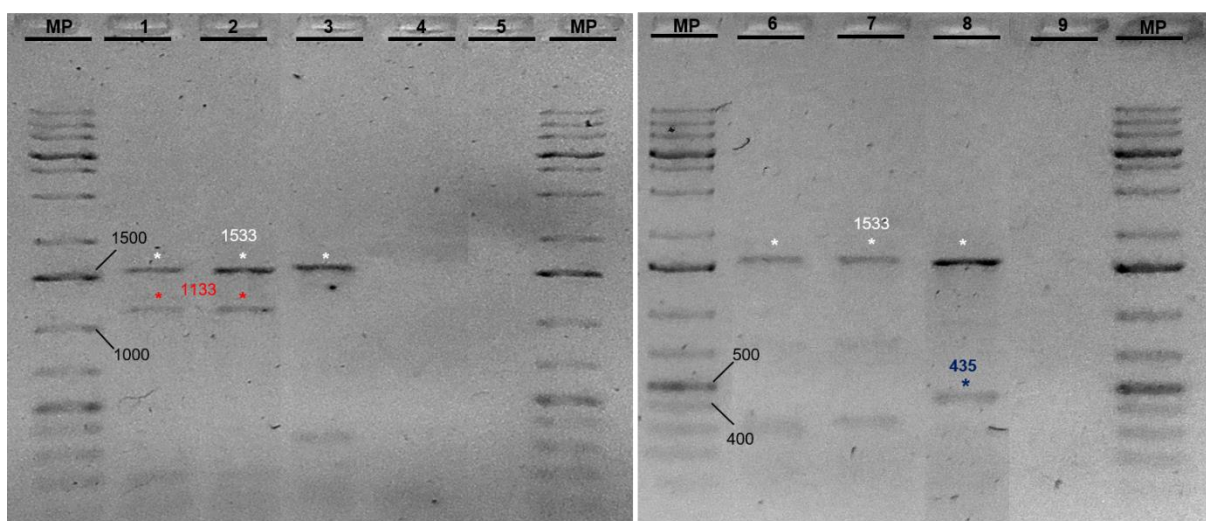


Figura 6. PCR-multiplex para la detección de los genes de las descarboxilasas de histidina (hdc) y tirosina (tdc) en los aislamientos de *Lactobacillus* spp.

Control positivo (*tdc*⁺ /1133 pb/*rojo): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (carriles 1 y 2; diluciones de ADN). Control positivo (*hdc*⁺ /435 pb/*azul): *L. casei* (Lc 130A) (carril 8). Aislamientos negativos: *L. plantarum* (Lp 155) (carril 3), *L. rhamnosus* (Lr 20A) (carril 6), *L. helveticus* (Lh 193) (carril 7). Control interno de PCR: gen ARNr 16 S (BS8-1541/1533 pb/*blanco) amplificación en carriles 1-3 y 6-8. Control negativo: agua ultra pura (carriles 4, 5 y 9). Marcador de peso molecular (MP): 1 Kb Plus (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

DISCUSIÓN

Propiedades tecnológicas

Acidificación

Una de las características deseables en las BAL utilizadas como *starters* es la capacidad de convertir la materia prima en ácido láctico (Akabanda, Owusu-Kwarteng, Tano-Debrah, Parkouda y Jespersen, 2014). Además, la fermentación de la lactosa, aporta propiedades sensoriales específicas, contribuyendo al desarrollo de aromas, texturas y sabores del producto final (Akabanda et al., 2014; Ayad, Nashat, El-Sadek, Metwaly y El-Soda, 2004). En el queso este fenómeno es crucial, fundamentalmente en la fase inicial de la elaboración ya que contribuye en la coagulación de la leche, sinéresis de la cuajada y en la prevención o control del crecimiento de microbiota alterante y/o patógena (Fox et al., 2004; Leroy et al., 2006; Nezhad, Dovom, Najafi, Yavarmanesh y mayo, 2020).

Durante el proceso de fermentación láctica, las cepas que presentan acidificación alta y rápida son consideradas candidatas para integrar cultivos *starters*, mientras que las cepas de acidificación baja y lenta pueden utilizarse como cultivos adjuntos dependiendo de otras propiedades tecnológicas (Ayad et al., 2004). Sin embargo, de acuerdo con Leroy et al., (2006) la acidificación es una propiedad que varía tanto entre especies de *Lactobacillus* spp. como dentro de ella.

En el presente trabajo tres cepas presentaron una capacidad de acidificación alta, con desarrollo de acidez y descenso de pH mayores a los puntos de corte (acidez = $149,8^{\circ} \text{D} \pm 21,5$; pH=3,71). Dos de estas cepas correspondieron a la especie de *Lactobacillus helveticus* (Lh 193 y Lh 198) y una a la especie de *Lactobacillus gasseri* (Lg 59). Probablemente estas especies aisladas de los SFN sean, en parte, las responsables de la acidificación rápida de la leche durante la elaboración de los quesos pasta cocida por ejemplo, tipo Grana.

La cepa Lh 193 fue quien presentó los valores más altos de acidificación de la leche (178°D y pH de 3,2). La capacidad de *L. helveticus* para producir ácido láctico de manera rápida, es ampliamente reconocida. Este microorganismo posee un nicho ecológico adaptado a la leche y a los productos lácteos, siendo así reconocido como un cultivo *starter* especializado para estos productos (Callanan et al., 2008; Slaterry et al., 2010). Es frecuente encontrarlo formando parte de SFN en quesos de tipo Grana Padano, Parmigiano-Reggiano, Pecorino-Siciliano, Provolone-Italiano y Montasio. Además, es incluido dentro de los cultivos comerciales para la elaboración de quesos de tipo Emmental, Gruyere, Sbrinz y Taleggio (Beresford et al., 2001; Coeuret, Dubernet, Bernardeau, Gueguen y Vernoux, 2003; Gatti et al., 2003; Hannon, Kilcawley, Wilkinson, Delahunty y Beresford 2007; Helinck et al., 2004; Kenny, FitzGerald, O'Cuinn, Beresford y Jordan, 2006; Sheehan, Fenelon, Wilkinson y McSweeney, 2007; Widyastuti, Lisdiyanti y Tisnadaja, 2014).

En relación a la cepa de *Lactobacillus gasseri* (Lg 59) también presentó valores altos de acidificación (Acidez= 145°D , pH=4,50), mostrando un buen perfil como cultivo *starter*, lo que concuerda con lo reportado por Jurado-Gámez, Romero-Benavides y Morillo-Garcés (2016). Esta especie perteneciente al grupo de *Lactobacillus acidophilus*, forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales y si bien

se ha descrito su capacidad acidificante, su inclusión en cultivos *starters* comerciales no es habitual (Klein et al., 1998; Reuter, 2001). Sin embargo, estudios recientes se han centrado en la evaluación de propiedades antimicrobianas en quesos o su inclusión como posibles probióticos (Gregoret et al., 2013; Strompfová, Marciňáková, Simonová, Bogovič-Matijašić y Lauková, 2006; Vinderola et al., 2008).

Capacidad proteolítica

En este trabajo cuatro cepas presentaron cualitativamente actividad proteolítica sobre la caseína, dos de ellas pertenecientes a la especie de *L. plantarum* (Lp 155 y Lp 164b), una a *L. rhamnosus* (Lr 117) y una a la de *L. helveticus* (Lh 193). La actividad proteolítica de estas especies es ampliamente conocida, especialmente en *Lactobacillus helveticus*, especie considerada como la de mayor actividad de esta naturaleza, no solo dentro del género *Lactobacillus*, sino dentro de las BAL (Genay, Sadat, Gagnaire y Lortal, 2009; Hébert, Raya y de Giori, 1999; Pederson, Mileski, Weimer y Steele 1999; Scolari, Vescovo, Zacconi y Vescovi, 2006). En este sentido, se han descrito diversas enzimas proteolíticas propias de la especie, siendo su presencia variable a nivel de cepa (Pederson, et al., 1999). Adicionalmente, se ha descrito la capacidad de *L. helveticus* para reducir la aparición de sabores amargos en los quesos, mediante la hidrólisis específica de péptidos hidrófobos o péptidos amargos (Sadat- Mekmene, Genay, Danielle y Gagnaire, 2011).

En relación con los otros aislamientos proteolíticos, *Lactobacillus plantarum* y *rhamnosus*, son también reconocidos por presentar una variedad de enzimas y por su rol durante la maduración del queso. Así, contribuyen no solo a la proteólisis temprana de este producto, sino que también son activos durante la proteólisis tardía en el queso (Di Cagno, Quinto, Corsetti, Minervini y Gobbetti 2006; Pastar, Tonic, Golic, Kojic, Van Kranenburg y Kleerebezem, 2003).

En resumen, es probable que la capacidad proteolítica observada en estas tres especies, en conjunto con otros microorganismos de la leche cruda, contribuyan al desarrollo de aromas y sabores en los quesos semiduros elaborados con el SFN, sin embargo, estudios más detallados sobre esta propiedad deberán ser realizados.

Capacidad lipolítica

La lipólisis interviene en el desarrollo del sabor en una gran variedad de quesos, algunas especies de *Lactobacillus* spp. presentan lipasas y esterases capaces de hidrolizar la grasa láctea, resultando de gran relevancia su adición en productos lácteos fermentados ya que contribuyen a la generación de aromas y sabores (Katz, Medina, Gonzalez y Oliver, 2002; Thakkar, Modi y Prajapati, 2015).

Los ácidos grasos libres son compuestos aromáticos por sí mismos, sin embargo, también son precursores de otros compuestos como metil-cetonas, alcoholes, lactonas, ketonas y ésteres que aportan notas de sabor y aroma al queso (principalmente notas frutales) (Le Quéré, 2011). El aporte de los AGL al sabor final, depende de la cantidad presente, del umbral de percepción y de las interacciones complejas que se den en la matriz del queso. Debido a esto, ciertos ácidos grasos en concentraciones bajas aportan sabores deseables, pero en altas concentraciones pueden generar defectos en el producto final (Collins et al., 2003; Molimard y Spinnler, 1996). En quesos Suizos, el ácido butírico, propiónico y etanoico están

fuertemente asociados a su sabor característico (Vangtal y Hammond, 1986; Zerfiridis, Vafopoulou-Mastrogiannaki y Litopoulou-Tzanetaki, 1984).

Los resultados del presente trabajo demostraron que todos los aislamientos presentan actividad lipolítica, ya que solo tres de ellos no fueron capaces de hidrolizar la tributirina *L. gasseri* (Lg 59) y *L. helveticus* (Lh 193 y Lh 198) el resto de los aislamientos presentaron actividad lipolítica frente a los ácidos grasos de la leche y la tributirina.

Los resultados podrían indicar que estos microorganismos están adaptados a la leche (Edelman et al., 2003). Las especies utilizadas en este trabajo han sido reportadas con actividad lipolítica en leche y productos lácteos (Herreros, Fresno, Gonzalez, Prieto y Tornadijo, 2003; Katz et al., 2002; Medina, Katz, Gonzalez y Oliver, 2001) sin embargo, este hallazgo no es lo más frecuente. En este sentido, numerosos trabajos reportan que esta propiedad no fue detectada en aislamientos de BAL obtenidos de cultivos naturales (Buffa, Morais, Jiménez-Belenguer, Hernández-Giménez y Guamis, 2005; Nieto-Arribas et al., 2009; Pérez, Cardell, E. y Zárate, 2003). Por esta razón, estos resultados motivan a continuar con la profundización en el estudio de esta propiedad, ya que es posible que la capacidad lipolítica de estas cepas contribuyan al desarrollo de sabores en los quesos uruguayos durante la maduración.

Producción de diacetilo

Tradicionalmente las especies productoras de diacetilo, también denominadas aromatizantes, integran cultivos comerciales para la elaboración de quesos, siendo las especies de *Leuconostoc citrovorum* y *Lactococcus lactis* biov. diacetylactis las más utilizadas (Levata-Jovanovic y Sandine, 1996).

La producción de diacetilo está vinculada a aquellas especies capaces de utilizar citrato como fuente de carbono (vía del citrato), cuyo metabolismo contribuye a aumentar la concentración de piruvato intracelular y en consecuencia la posibilidad de producir diacetilo (Palles, Beresford, Condon y Cogan, 1998).

En el presente trabajo cuatro cepas mostraron producción de diacetilo: dos de *L. rhamnosus* (Lr 8A y Lr 20A), una de *L. casei* (Lc 44) y una de *L. plantarum* (Lp 155). En este sentido numerosos trabajos reportan la producción de diacetilo por parte de cepas de *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* (Abouloifa et al., 2020; Jyoti, Suresh y Venkatesh, 2002; Lo et al., 2018), indicando en estas especies la utilización de la ruta metabólica del citrato (Díaz-Muñiz et al., 2006; Jyoti et al., 2003). Adicionalmente, en este trabajo, la cepa Lr 20A presentó semicuantitativamente, el mayor nivel de producción de diacetilo. Esta especie ha sido reportada como altamente productora de diacetilo y acetoína (Pogačić et al., 2016).

Actividad antimicrobiana

El potencial de las BAL como bioconservadores en alimentos lácteos fermentados ha sido motivo de diversos estudios. La producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono y las bacteriocinas son los compuestos con efecto antimicrobiano más difundidos. Las bacteriocinas han despertado un interés especial en la industria, para ser utilizadas como preservadores naturales en alimentos, como posibles sustitutos de aditivos químicos (Lewus, Kaiser, Montville,

1991; O'Bryan, Crandall, Ricke y Ndahetuye, 2015). Algunas cepas de BAL, entre ellas de *Lactobacillus* spp., se ha reportado la producción de bacteriocinas de amplio espectro, capaces de inhibir microorganismos patógenos (Zapata, Muñoz, Ruiz, Montoya y Gutierrez, 2009).

En el presente trabajo todos los aislamientos de *Lactobacillus* spp. evidenciaron en el SLC, capacidad antimicrobiana frente a *Streptococcus bovis*. Sin embargo, dicha actividad no existe cuando el mismo es neutralizado, lo que sugiere que la actividad es debida a la producción de ácidos orgánicos. En este aspecto, es conocido, que la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. está relacionada a la producción de ácidos, especialmente ácido láctico. Estos ácidos, presentan actividad antagonista frente a diversos microorganismos, ya que alteran el pH del medio y a su vez, su forma disociada aumenta su capacidad bactericida al pasar por la membrana celular y disminuir el pH interno de la célula blanco (Nardi et al., 2005).

Por otra parte, ningún aislamiento de *Lactobacillus* spp. presentó actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua* y *Escherichia coli* por algunos de los mecanismos evaluados, incluso la producción de ácidos orgánicos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Herreros et al., (2003) y Hulak et al., (2016) los cuales indican poca o nula actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. (*L. plantarum* y *L. casei*) aisladas de productos lácteos, frente a *L. innocua* y *E. coli*. En contraposición, varias de estas especies han sido reportadas como productoras de bacteriocinas, entre ellas la helveticina J (*L. helveticus*), plantaricina (*L. plantarum*) y la bacteriocina Abp-118 (*L. salivarius*) (Ahmad et al., 2017).

Dado que la producción de bacteriocinas es particular de cada cepa, (mediada por genes que se encuentran en el cromosoma bacteriano y/o en elementos móviles del genoma como transposones o plásmidos), su estudio es relevante al evaluar cepas nativas no caracterizadas (Deegan et al., 2006).

Resistencia a antimicrobianos

En relación con la resistencia fenotípica observada en este trabajo, todos los aislamientos de *Lactobacillus* spp. fueron resistentes a la vancomicina en baja dosis y a los aminoglucósidos kanamicina y estreptomycin, mientras que las cepas de *L. helveticus* y *L. plantarum* resultaron resistentes a la quinolona, levofloxacin. La resistencia a estos grupos farmacológicos ha sido descrita como de origen cromosómico e intrínseco en el género *Lactobacillus* spp. y presenta un bajo riesgo de propagación horizontal (Levy y Marshall, 2004; Normark y Normark, 2002).

La vancomicina es un glucopéptido, que en bacterias sensibles actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular (Danielsen y Wind, 2003; Das, Shankar, Johnson y Thomas, 2020). Impide la polimerización de los precursores de los peptidoglicanos, uniéndose a estos mediante las enzimas ligasas: D-alanil-d-alanina. En *Lactobacillus* spp. el mecanismo de resistencia está dado por la presencia de enzimas ligasas modificadas, el precursor del peptidoglicano de la pared celular termina en vez de D-alanil-D-alanina en D-alanil-D-lactato, por el cual la vancomicina tiene baja afinidad para unirse, perdiendo su efecto inhibitorio. Estas enzimas están relacionadas con la presencia de grupos de genes *van*, los que se encuentran en las bacterias resistentes a la vancomicina (Anisimova y Yarullina, 2019; Das et al., 2020; Tynkkynen, Singh y Varmanen, 1998).

En relación con la resistencia a los aminoglucósidos es reportada como intrínseca en el género y puede estar dada por varios mecanismos, entre ellos, por la ausencia de transporte de electrones mediado por citocromos que media la absorción del antimicrobiano (Charteris, Kelly, Morelli y Collins, 2001). A su vez, la pared celular de *Lactobacillus* spp. presenta una baja permeabilidad a los aminoglucósidos (Anisimova y Yarullina, 2019). Ciertos genes como *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6)* and *aph(3')-III* están relacionados a la resistencia a los aminoglucósidos en especies de *Lactobacillus* spp. La presencia de los genes *aadA* y *aadE* son algunos de los responsables de la resistencia a la eritromicina (Anisimova y Yarullina, 2019).

La resistencia a las quinolonas por *Lactobacillus* spp. es considerada intrínseca, asociada a una baja permeabilidad de la pared celular o a la presencia de mecanismos de eflujo (Hummel, Hertel, Holzapfel y Franz, 2007). A su vez, puede estar dada por mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* en la región de resistencia a quinolonas del genoma (QRDR), y a bombas de salida de eflujo, reportada en la especie *L. fermentum* que presentan resistencia a estos fármacos (Das et al., 2020).

En este trabajo se observó, además, que las cepas de *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. gasseri* fueron resistentes a Cefradina (cefalosporina de primera generación) pero no a la Cefotaxima (cefalosporina de tercera generación) ni a otros antimicrobianos inhibidores de la síntesis de la pared celular. No está claro con certeza el mecanismo por el cual son resistentes, sin embargo, se ha detectado la presencia de betalactamasas en el genoma de *Lactobacillus* spp. La resistencia a las cefalosporinas por producción de betalactamasas es variable entre las generaciones de cefalosporinas, las de primera generación son más sensibles a betalactamasas, por lo que este mecanismo podría ser el responsable de la resistencia observada (Ammor, Flórez y Mayo, 2007).

Estos resultados deberán ser confirmados a través de estudios genéticos que confirmen la presencia de genes asociados a la producción de betalactamasas.

Aminas biógenas

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos nitrogenados formados por la descarboxilación de aminoácidos y que presentan actividad biológica (Shalaby, 1996). En bacterias, el rol fisiológico de la descarboxilación de aminoácidos se da como un mecanismo para resistir pH externos ácidos (Rhee, Ryu, y Choi, 2002). El consumo de alimentos con un alto contenido de AB, representa un riesgo para la salud debido a su acción toxicológica, ya que la ingesta de grandes cantidades o la falla en su metabolización resultan en la acumulación de éstas en el organismo (Sanlı y Senel, 2014).

La producción de AB se encuentra asociada a genes dispuestos en regiones móviles del genoma, que pueden o no estar presentes en una cepa de la misma especie. En este sentido, su presencia debe ser evaluada a la hora de seleccionar cepas para incluir en alimentos (Calles-Enríquez et al., 2010; Marcobal, Rivas, Moreno-Arribas y Muñoz, 2006; Río, Redruello, Fernández, Ladero y Álvarez, 2020; Romano, Ladero, Álvarez y Lucas, 2014; Wüthrich et al., 2017).

En relación con los productos lácteos, los quesos han sido reportados como los de mayor implicancia en intoxicaciones por AB, principalmente histamina (Roig-Sagués et al., 2002), siendo las BAL, las principales responsables de su acumulación

(Bover-Cid, Hugas, Izquierdo-Pulido y Vidal-Carou, 2000; Linares et al., 2011). En este sentido, ciertas cepas de *Lactobacillus* spp. como *L. plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. brevis* fueron reportadas como productoras de AB, en especial histamina, putrescina y tiramina (Río et al. 2020; Roig-Sagués et al., 2002).

En el presente trabajo todos los aislamientos evaluados resultaron negativos a la descarboxilación de los aminoácidos histidina y tirosina, lo que se confirma con lo observado genotípicamente, ya que en ningún aislamiento se detectaron los genes involucrados (*hdc* y *tdc*). En contraposición a nuestros resultados, Burdychova y Komprda (2007) reportaron la presencia del gen *hdc* en cepas de *L. helveticus* provenientes de quesos, los que posteriormente confirmaron de manera fenotípica la producción de histamina. A su vez, Lorencová et al., (2012), reportaron la producción de tiramina, en especies de *Lactobacillus* spp. aisladas de productos lácteos, entre ellos *L. casei/paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus* y *L. plantarum*.

Teniendo en cuenta estos resultados, los aislamientos de *Lactobacillus* spp. evaluados presentarían aspectos de inocuidad favorables en cuanto a la producción de AB, característica imprescindible para ser incluidos en cultivos para la producción de alimentos fermentados seguros.

CONCLUSIONES

- Dada su alta capacidad acidificante, las cepas de *L. helveticus* (Lh 193/Lh 198) resultaron como mejores candidatas a ser utilizadas como cultivos *starters*. Mientras que la cepa de *L. plantarum* (Lp 155) presentó el mejor perfil como cultivo adjunto, con capacidades de proteólisis, lipólisis y producción de diacetilo.
- Los aislamientos de *Lactobacillus* spp. no presentaron actividad antimicrobiana frente a los indicadores evaluados. La actividad antimicrobiana frente a *S. bovis* (BAL estrechamente relacionada) se limitó a la producción de ácidos orgánicos.
- La resistencia a Cefradina observada en las cepas de *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. gasserii* podrían indicar la producción de betalactamasas y deberá ser evaluada en otros estudios.
- Ninguno de los aislamientos evaluados presentó actividad de descarboxilación de los aminoácidos histidina y tirosina, no detectándose los genes que codifican descarboxilasas de histidina y tirosina (*hdc* y *tdc*).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abee, T., Krockel, L. y Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of food microbial*, 28(2), 169-185.
- Abouloifa, H., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Hasnaoui, I., Gaamouche, S., Ghabbour, N., y Saalaoui, E. (2020). Technological properties of potential probiotic *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermenting green olive. *Journal Microbiology, Biotechnology Food Science*, 9(5), 884-889.
- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., y Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1-11.
- Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Parkouda, Ch., y Jespersen, L. (2014). The Use of Lactic Acid Bacteria Starter Culture in the Production of Nunu, a Spontaneously Fermented Milk Product in Ghana. *International Journal of Food Science*, 2014, 721067.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., y Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Anastasio, A., Drasci, R., y Pepe, T. (2010). Development of biogenic amines during the ripening of Italian dry sausages. *Journal Food Protection*, 73:114-118.
- Anisimova, E. A., y Yarullina, D. R. (2019). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. *Current Microbiology*, 76(12), 1407-1416.
- Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgarrondo, M., Chobert, J-M., Xavier, D., Ivanova, I., y Haertlé, T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal Food Microbiology*, 87(1-2), 63-73.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology*, 139, 1-66.
- Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly H., y El-Soda, M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21(6), 715-725.
- Bacus, J. (1984). Update: meat fermentation. *Food Technology*, 38, 59-63.
- Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., y Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., y Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International dairy Journal*, 11(4-7), 259-274.

- Beshkova, D., y Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 419–432.
- Bezerra, T. K., de Araujo, A. R., do Nascimento, E. S., de Matos Paz, J. E., Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., y Madruga, M. S. (2016). Proteólisis en queso de cabra “coalho” suplementado con bacterias probióticas del ácido láctico. *Química alimentos*, 196, 359-366.
- Blanco, S., y Fragenas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*, 32, 131-144.
- Bluma, A., y Ciprovica, I. (2016). Diversity of lactic acid bacteria in raw milk. *Latvia University of Agriculture*, 1, 157-161.
- Borbonet, S. (2001). *Historia de la quesería en Uruguay*. Montevideo: LATU.
- Bottari, B., Santarelli, M., Neviani, E., y Gatti, M. (2010). Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: culture-independent approach. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1676–1684.
- Bove, C. G., De Angelis, M., Gatti, M., Calasso, M., Nerviani, E., y Gobbetti, M. (2012). Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *Proteomics*, 3206–3218.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., y Vidal-Carou, M. C. (2000). Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *Journal Food Protection*, 237-243.
- Branen, A. L., y Keenan, T. W. (1971). Diacetyl and acetoin production by *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 22(4), 517–521.
- Buffa, M., Morais, J., Jiménez-Belenguer, A., Hernández-Giménez, E., y Guamis, B. (2005). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw ewes' milk for cheese making. *Milchwissenschaft*, 61, 404–407.
- Burdychova, R., y Komprda, T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 149-155.
- Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., ... y Ross, R. P. (2008). Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 727-735.
- Calles-Enríquez, M., Eriksen, B. H., Andersen, P. S., Rattray, F. P., Johansen, A. H., Fernández, M., ... y Alvarez, M. A. (2010). Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential *hdcA* expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6231-6238.
- Chamba, J. F., e Irlinger, F. (2004). Secondary and adjunct cultures. *Cheese Chemistry Phy y Microbiology, General Aspects*, 1, 191-206.

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., y Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 759-768.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., y Collins, J. K. (2001). Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food protection*, 64(12), 2007-2014.
- Chen C-C., Lai C-C., Huang H-L., Su Y-T., Chiu Y-T., Toh H-S., ...Lu Y-C. (2019). Antimicrobial ability and mechanism analysis of *Lactobacillus* species against carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Frontiers in microbial*, 10, 789.
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., y Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19(10), 982-989.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., y Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*, 7(4), 281-305.
- Clark, S., y Winter, C. K. (2015). Diacetyl in foods: a review of safety and sensory characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 634-643.
- Cleveland, J., Montville, T., Nes, I., y Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal Food Microbiology*, 71(1), 1-20.
- CLSI, C. (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement*. Wayne: Clinical Lab Standards Institute.
- Collins, Y., McSweeney, P., y Wilkinson, M. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841-866.
- Connil, N., Breton, Y. L., Dousset, X., Auffray, Y., Rince, A., y Prevost, H. (2002). Identification of the *Enterococcus faecalis*, tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3537-44.
- Coton, E. (1996). *Etude de l'histidine de carboxylase de Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni)*. Aspects physiologiques, enzymologique et génétique. Conséquences Knologiques (Tesis de doctorado). Université de Bordeaux II, Burdeos.
- Coton, E., y Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal microbial methods*, 63(3), 296-304.
- Coton, M., Coton, E., Lucas, P., y Lonvaud-Funel, A. (2004). Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology*, 21(2), 125-130.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., y Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, 83(4), 269-306.

- Danielsen, M., y Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal Food Microbiology*, 82, 1-11.
- Das, D. J., Shankar, A., Johnson, J. B., y Thomas, S. (2020). Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition*, 69, 110567.
- De Almeida Júnior, W. L. G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M., y Dias, F. S. (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 96-103.
- De Angelis, M., y Gobbetti, M. (2016). *Lactobacillus* SPP. General Characteristics. En *Reference Module in Food Science*. Amsterdam: Elsevier.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., y Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058-1071.
- Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., y Gobbetti, M., (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*, 16, 119–130.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., y Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 861-870.
- Edelman, M. J., Bauer, K., Khanwani, S., Tait, N., Trepel, J., Karp, J., ... y Van Echo, D. (2003). Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 51(5), 439-444.
- El-Gendy, S., Abdel-Galid, H., Shalin, Y., y Hegazi, F. (1983). Acetoin and diacetyl production by *Lactobacillus casei subsp pseudoplantamm*. *Journal Food Protection*, 46, 537-541.
- Elsanhoty, R. M., y Ramadan, M. F. (2016). Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food control*, 68, 220-228.
- Fernández, M., Linares, D. M., y Álvarez, M. A. (2004). Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *Journal Food Protection*, 67(11), 2521-2529.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., y Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacterial from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19, 3-11.
- Frank, J. F., Yousef, A. E., Wehr, H. M., y Frank, J. (2004). *Standard Methods for the Examination of Dairy Product*. Washington: American Public Health Association.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., y McSweeney, P. L. (2017). *McSweeney Fundamentals of cheese science* (pp. 121-183). New York: Springer.
- Fox, P. y McSweeney, P. L. (2004). Cheese: An overview. *Chemistry. Physics & Microbiology*, 1(3), 9-45.

- Fraga, M., Perelmutter, K., Delucchi, L., Cidade E., y Zunino, P. (2008). Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93, 71-78.
- Fraga, M., Perelmutter, K., Giacaman, S., Zunino, P., y Carro, S. (2013). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology*, 33, 801-804.
- Gatti, M., Lazzi, C., Rossetti, L., Mucchetti, G., y Neviani, E. (2003). Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 463-470.
- Gazzola, S., Fontana, C., Bassi, D., y Cocconelli, P. (2012). Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture dependent and independent methods. *Food Microbiology*, 30(2), 348-354.
- Genay, M., Sadat, L., Gagnaire, V., y Lortal, S. (2009). prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3238-3249.
- Georgieva, R., Yocheva, L., TserovskaL., Zhelezova, G., Stefanova, N., y Atanasova, A. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology Equip*, 29, 84-91.
- Gregoret, V., Perezlindo, M. J., Vinderola, G., Reinheimer, J., y Binetti, A. (2013). A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. *Food Microbiology*, 34(1), 19-28.
- Gobetti, M., y DiCagno, R. (2003). Hard Italian Cheeses. En H. Roginski (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 378-3885). Amsterdam: Elsevier.
- Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Roseli, R., y Khosroushahi, A.Y. (2014). Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*, 30, 51-59.
- Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., y Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends of Food Science Technology*, 5, 42-49.
- Hammes, W. (1990). Bacteria starter cultures in food production. *Food Biotechnology*, 4, 389-397.
- Hammes, W. P., y Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. En *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 19-54). Glasgow: Blackie Academic & Professional,
- Hannon, J. A., Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., Delahunty, C. M., y Beresford, T. P. (2007). Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 17(4), 316-327.
- Hébert, E., M., Raya, R., y de Giori, G., S. (1999). Characterization of cell-envelope proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, 21, 831-834.

- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D., y Yvon, M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3855-3861.
- Herreros M. A., Fresno J. M., Gonzalez Prieto, M. J., y Tornadijo M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13(6), 469-479.
- Hulak, N., Maksimovic, A Z., Kaic, A., Skelin, A., y Fuka, M M. (2016). Indigenous strains of *Lactobacillus* isolated from the Istrian cheese as potential starter cultures. *Mljekarstvo*, 66(4), 282-292.
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., y Franz, C. A. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 730-739.
- Inglis, R. C., Stevens, M. J., Meile, L., Lacroix, C., y Meile, L. (2015). High throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *Journal Microbial Methods*, 114, 26-29.
- Jurado-Gómez, H. A., Romero-Benavides, D. A., y Morillo-Garcés, J. A. (2006). *Inhibición de Lactobacillus gasseri sobre Yersinia pseudotuberculosis bajo condiciones in vitro*. Pasto: Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño.
- Jyoti, B. D., Suresh A K., y Venkatesh K V. (2003). Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5), 509-514.
- Kandler, O., y Weiss, N. (1986). Regular Non-Sporing Gram- Positive Rods. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp.1208-1234). Baltimore: Williams and Wilkins
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224.
- Katz, M., Medina, R., Gonzalez, S., y Oliver, G. (2002). Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe's Milk and Cheese. *Journal Food Protection*, 65, 1997–2001.
- Khemariya, P., Singh, S., Nath, G., y Gulati, A. K. (2013). Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of nisc *Lactococcus lactis* from dairy and non-dairy sources. *Czech Journal Food Science*, 31, 323–331.
- Kenny, O., FitzGerald, R. J., O'Cuinn, G., Beresford, T., y Jordan, K. (2006). Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 16(7), 797-804.
- Klaenhammer, T. R., y De Vos, W. M. (2011). An incredible scientific journey. The evolutionary tale of the lactic acid bacteria. En A. Ledebor, J. Hugenholtz J. Kok, W. Konings, J. Wouters, (Eds), *The 10^o LAB symposium. Thirty years of research on lactic acid bacteria*. Rotterdam: 24 Media Labs.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., y Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 41, 103-125.
- King, N. (1948). Modification of Vogues Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. *Dairy Industry*, 13, 860-866.

- La Gioia, F., Rizzotti, L., Rossi, F., Gardini, F., Tabanelli, G., y Torriani, S. (2011). Identification of a tyrosine decarboxylase (tdcA) gene in *Streptococcus thermophilus* 1TT45: Analysis of its expression and tyramine production in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1140-1144.
- Ladero, V., Martinez, N., Martin Cruz, M., Fernández, M., y Alvarez, M. A. (2010). qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Research International*, 43(1), 289-295.
- Landete, J. M., Ferrer, S., Polo, L., y Prado, I. (2005). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 53(4), 1119-1124.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. *Nucleic Acid Technique in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Lazzarini, F. (2019). *Atributos tecnológicos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero fermentos naturales de quesos de pasta dura del Uruguay* (Tesina). Universidad Católica del Uruguay, Montevideo.
- Lazzi, C., Povo, M., Locci, F., Bernini, V., Neviani, E., y Gatti, M. (2016). Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 20-28.
- Leroy, F., Verluyten, J., y De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 106(3), 270-85
- Levata-Jovanovic, M., y Sandine, W. E. (1996). Citrate utilization and diacetyl production by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 79(11), 1928-1935.
- Levy, S. B., y Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12), S122-S129.
- Le Quéré, J. L. (2011). Cheese. Cheese Flavor. En J.W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2ª ed., pp. 675-684). San Diego: Academic Press.
- Lewus C.B., Kaiser A., y Montville T.J., (1991) Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (6), 1683–1688.
- Linares, D. M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M. A., y Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 691-703.
- Linares, D. M., del Rio, B., Redruello, B., Ladero, V., Martín, M. C., Fernández, M., y Alvarez, M. A. (2016). Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chemistry*, 197(Pt. A), 658-663.
- Liu, S., Holland, R., y Crow, V. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 14, 923-945.
- Lo, R., Bansal, N., y Turner, M. S. (2018). The genetic basis underlying variation in production of the flavour compound diacetyl by *Lactobacillus rhamnosus* strains in milk. *International Journal Food Microbiology*, 265, 30-39.

- Longhi, C., Maffeo, A., Penta, M., Petrone, G., Seganti, L., y Conte, M. P. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian style soft cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 879-885.
- Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., y Buňka, F. (2012). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2086-2091.
- Lorenzo Loureiro, G., y Raffo Serra, M. (2015.). *Lactococcus lactis* nativo: caracterización de la producción de bacteriocinas, propiedades tecnológicas y efecto antimicrobiano sobre *Listeria innocua* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Lozano, J. (2019.). *Identificación y caracterización de cepas de Lactobasillus spp. potencialmente productoras de ácido γ -aminobutírico en cultivos iniciadores naturales de quesería de producción nacional* (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Lucas, P. M., Landete, J., Coton, M., Coton, E., y Lonvaud Funel, A. (2003). The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: Characterization and conservation in tyramine producing bacteria. *FEMS Microbiology Let*, 229, 65-71.
- Manaia, C. M. (2017). Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. *Trends Microbiology*, 25(3), 173-181.
- Marilley, L., y Casey, M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal Food Microbiology*, 90(2), 139-159.
- Mathur, S., y Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. A review. *International Journal Food Microbiology*, 105(3), 281-295.
- McSweeney, P., y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80, 293-324.
- McSweeney, P. (2011) *Biochemistry of Cheese Ripening*. *Encyclopedia of Dairy Science*, (Vol. 1. pp. 667-675). Londres: Elsevier Academic Press.
- Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S., y Oliver, G. (2001). Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, 64(4), 559-563.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (2021). *Anuario estadístico agropecuario 2021*. Montevideo: DIEA. Recuperado de <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf>.
- Moeller, V. (1955). Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathology Microbiology Scandinavica*, 36(2), 158-172.
- Molimard, P., y Spinnler, H. E. (1996) Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal Dairy Science*, 79, 169-184.

- Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. J., y Mayorga Reyes, L. (2009). Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contacto S*, 73, 63-72.
- Morandi, S., Silveti, T., Miranda Lopez, J. M., y Brasca, M. (2015). Antimicrobial activity, antibiotic resistance and the safety of lactic acid bacteria in raw milk Valtellina Casera cheese. *Journal Food Safe*, 35(2), 193-205.
- Mourad, K. (2007). Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9.6 Kb plasmid (pOL15). *Grasas y Aceites*, 58(2), 136-141.
- Mucchetti, G., y Neviani, E. (2006). *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia*. Milano: Tecniche nuove.
- Muñoz, D., Rosero, J. L., y Cabrera, G. (2010). Rangos de Control de Humedad Relativa y Temperatura en Cavas de maduración de Quesos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), 68-73.
- Nardi, R. M. D., Santoro, M. M., Oliveira, J. S., Pimenta, A. M. C., Ferraz, V. P., Benchetrit, L. C., y Nicoli, J. R. (2005). Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. *Journal Applied Microbiology*, 99(3), 649-656.
- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., y Xu, J. (2011). Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62(3), 1081-1089.
- Nezhad, S. J. E., Dovom, M. R. E., Najafi, M. B. H., Yavarmanesh, M., y Mayo, B. (2020). Technological characteristics of *Lactobacillus* spp. isolated from Iranian raw milk Motal cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 133, 110070.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J. M., Seseña, S., Palop, L., y Cabezas, L. (2009). Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, 20(12), 1092–1098.
- Normark, B. H., y Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91-106.
- O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Ricke, S. C., y Ndaetuye, J. B. (2015). Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Analytical methods and applications. En T.M. Taylor (Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (pp. 137-151). Cambridg: Woodhead.
- Palles T., Beresford T., Condon S., y Cogan T.M. (1998) Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal Applied Microbiology*, 85,147–154
- Panizzolo, L. A., Araújo, A. C., Taroco, L. V., Rodríguez, A., y Schöpf, G. (2011). Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos Dambo elaborados con distintos cultivos iniciadores. *INNOTECH*, (6 ene-dic), 24–27.
- Parente, E., y Cogan, T. M. (2004). Starter cultures: General aspects. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1, 123–1.
- Park, J., Lee, C. H., Kwon, E. Y., Lee, H. J., Kim, J. Y., y Kim, S. H. (2010). Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Control*, 21(9), 1219-1226.

- Partovi, R., Gandomi, H., y Basti, A. A. (2019). Safety aspects of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Siahmazgi cheese. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 66(4), 337-342.
- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., Van Kranenburg, R., y Kleerebezem, M., (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5802-5811.
- Pederson, J.A., Mileski, G.J., Weimer, B.C., y Steele, J.L., (1999) Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal Bacteriology*, 181, 4592-4597.
- Pérez, G., Cardell, E., y Zárate, V. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *International Journal of Food Science y Technology*, 38(5), 537-546.
- Pogačić, T., Maillard, M. B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Valence, F., y Thierry, A. (2016). *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatilomes in cheese conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2335-2346.
- Poveda, J. (2001). *Efecto de la utilización de distintos cultivos iniciadores en la proteólisis del queso manchego Otros aspectos de la maduración* (Tesis). Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real .
- Preciado, G. M., EscalanteMinakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., y Herrera, R. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64-70.
- Reginensi, S. M., González, M. J., y Bermúdez, J. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Brazilian Journal Microbiology*, 44(2), 427-430.
- Reuter, G. (2001) The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* micro- flora of the human intestine: composition and succession, *Current. Issues Intest. Microbiology*, 2, 43–53
- Rhee, J. E., Ryu, J. H., y Choi, S. H. (2002). Identification of the cadBA operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiology Letters*, 208, 245-251.
- Ricciardi, A., Guidone, A., Janniello, R. G., Cioffi, S., Aponte, M., Pavlidis, D., y Parente, E. (2015). A survey of non-starter lactic acid bacteria in traditional cheeses: culture dependent identification and survival to simulated gastrointestinal transit. *International Dairy Journal*, 43, 42-50.
- Río, B. del, Redruello, B., Fernández, M., Ladero, V., y Álvarez, M. A. (2020). Aminas biógenas en alimentos: métodos moleculares para la detección e identificación de bacterias productoras. *Arbor*, 196 (795), 545.
- Russo, P., Spano, G., Arena, M. P., Capozzi, V., Fiocco, D., Grieco, F., y Beneduce, L. (2010). Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food? *Current Research, Technology and Education Topincs in Applied Microbiology and microbial Biotechnology*, 2, 1087-1095.

- Roig Sagues, A. X., Molina, A. P., y Hernández Herrero, M. M. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215, 96-100.
- Romano, A., Ladero, V., Alvarez, M. A., y Lucas, P. M. (2014). Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *International Journal of Food Microbiology*, 175, 14-19.
- Sánchez Macías, D., Morales de la Nuez, A., Morena Indias, I., y Hernández Castellano, L. E. (2011). Lipolysis and proteolysis profiles of fresh artisanal goat cheese made with raw milk with 3 different fat contents. *Journal Dairy Science*, 94(12), 5786-5793.
- Sadat- Mekmene, L., Genay, M., Danielle, A., y Gagnaire, V. (2011) Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 1-13.
- Sánchez, N., y Ramírez, D. (2004). *Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico* (Proyecto de Grado). Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Şanlı, T., y Şenel, E. (2014). Formation of biogenic amines in cheese. En V. Preedy (Ed.), *Processing and impact on active components in foods* (pp. 223-230). Amsterdam: AP.
- Scolari, G., Vescovo, M., Zacconi, C., y Vescovi, F. (2006). Extraction and partial characterization of proteolytic activities from the cell surface of *Lactobacillus helveticus* Zuc2. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3800-3809.
- Sgarbi, E., Lazzi, C., Tabanelli, G., Gatti, M., Neviani, E., y Gardini, F. (2013). Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *Journal Dairy Science*, 96(7), 4223-4234.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human. *Food Research International*, 29, 675-690.
- Sheehan, J. J., Fenelon, M. A., Wilkinson, M. G., y McSweeney, P. L. (2007). Effect of cook temperature on starter and non-starter lactic acid bacteria viability, cheese composition and ripening indices of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *International Dairy Journal*, 17(6), 704-716.
- Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G. F., Beresford, T., y Ross, R. P. (2010). Invited review: *Lactobacillus helveticus*—a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4435-4454.
- Smit, G., Smit, B. A., y Engels, W. J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Review*, 29, 591-610.
- Stiles, M. E., y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.

- Strompfová, V., Marciňáková, M., Simonová, M., Bogovič-Matijašić, B., y Lauková, A. (2006). Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe*, 12(2), 75-79.
- Suarez, V.B. (1997). *Caracterización de cultivos naturales de sueros (suero fermentos) para elaboración de quesos de pasta cocida* (Tesis de grado). Facultad de Ingeniería Química, Argentina.
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3189-1394.
- Thakkar, P., Modi, H A., y Prajapati, J B. (2015). Isolation, characterization and safety assessment of lactic acid bacterial isolates from fermented food products. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 4(4), 713-725
- Trip, H., Mulder, N. L., Rattray, F. P., y Lolkema, J. S. (2011). HdcB, a novel enzyme catalysing maturation of pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. *Molecular Microbiology*, 79(4), 861-871.
- Ture, M., y Boran, H. (2015) Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus* sp. strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59, 37-42.
- Tynkkynen, S., Singh, K. V., y Varmanen, P. (1998). Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *International Journal of Food Microbiology*, 41(3), 195-204.
- Uliescu, M., Rotaru, G., Mocanu, G., y Stanciu, V. (2017). Study of the probiotic telemea cheese maturation. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati*, 4, 92-99.
- Vangtal, A., y Hammond, E. G. (1986). Correlation of the flavor characteristics of Swiss-type cheeses with chemical parameters. *Journal of Dairy Science*, 69(12), 2982-2993.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., y Reinheimer, J. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1678-1688.
- Vodnar, D. Y. (2010). Lactic Acid Production by *Lactobacillus paracasei* in Discontinuous fermentation using lucerne green juice as nutriente substitute. *Chemestry Engineering Technology*, 33, 468-474.
- Wang, K., Zhang, H., Feng, J., Ma, L., de la Fuente- Núñez, C., Wang, S., y Lu, X. (2019). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. *Journal of Agriculture and Food Research*, 1, 100006
- Widyastuti, Y., Lisdiyanti, P., y Tisnadjaja, D. (2014). Role of *Lactobacillus helveticus* on flavor formation in Cheese: Amino Acid Metabolism. *Annales Bogorienses*, 18(1), 1-11.
- Wüthrich, D., Berthoud, H., Wechsler, D., Eugster, E., Irmeler, S., y Bruggmann, R. (2017). The histidine decarboxylase gene cluster of *Lactobacillus parabuchneri* was gained by horizontal gene transfer and is mobile within the species. *Frontiers in Microbiology*, 8, 218.

- Zapata, S., Muñoz, J., Orlando S., Ruiz, O., Montoya, I., y Gutiérrez, P.A. (2009) Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1), 75-82.
- Zerfiridis, G. K., Vafopoulou-Mastrogiannaki, A., y Litopoulou-Tzanetaki, E. (1984). Changes during ripening of commercial Gruyère cheese. *Journal of Dairy Science*, 67(7), 1397-1405.

ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 8. Lista de antibióticos utilizados para evaluar la sensibilidad/resistencia por parte de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. en estudio

Nombre	Código	Concentración	Grupo	Familia
Clindamicina	DA2	2ug	Lincosamida	
Linezolid	LZD30	30ug	Oxazolidinonas.	
Penicilina g	P10	10 UI	Betalactámico	
Kanamicina	K30	30 ug	Aminoglicosidos	
Gentamicina	CN120	120 ug	Aminoglicosidos	
Levofloxacin	LEV5	5ug	Quinolona	
Cefotaxima	CTX30	30 ug	Betalactámico	Cefalosporinas de 3 ^{era} generación
Carbenisillin	CAR100	100 ug	Betalactámico	Carboxipenicilinas
Eritromicina	E15	15 ug	Macrólidos	
Cephadrine	CE30	30 ug	Betalactámico	Cefalosporinas de 1 ^{era} generación
Vancomicina	VA5	5 ug	Glucopéptido	
Tetraciclina	TE30	30 ug	Tetraciclina	
Cloranfenicol	C30	30 ug	Cloranfenicol	
Estreptomycin	S10	10 ug	Aminoglicosidos	

Tabla 9. Puntos de corte utilizados para la clasificación de *Lactobacillus* spp. en sensibles (S), moderadamente sensibles (MS) o resistentes (R) según la medida del halo (mm) obtenido en la prueba de antibiograma, basado en Charteris et al., (1998)

Codigo antibiotico	R (medidas en mm)	MS (medida en mm)	S (medida en mm)
DA2	8	9--11	12
LZD30	14 *	15-19	20
P10	≤19	20-27	≥28
K30	13	14-17	18
CN120	14 *	15-19	20
LEV5	14 *	15-19	20
CTX30	14	15-19	23
CAR100	14 *	15-19	20
E15	13	14-17	18
CE30	14	15-17	18
VA5	14	15-16	17
TE30	14	15-18	19
C30	13	14-17	18
S10	11	12--14	15

Clindamicina, 2ug (DA2); Linezolid 30ug (LZD30); Penicilina G 10ug (P10); Kanamicina 30ug (K30); Gentamicina 120ug (CN120); Levofloxacina 5ug (LEV5); Cefotaxima 30ug (CTX30); Carbenicilina 100 ug (CAR100); Eritromicina 15 ug (E15); Cefradine 30 ug (CE30); Vancomicina 5ug (VA5); Tetraciclina 30ug (TE30), Cloranfenicol 30ug (C30); Estreptomicina 10ug (S10). *Punto de corte establecido por *Clinical And Laboratory Standards Institute* (2012)

Tabla 10. Puntos de corte (mm) utilizados para clasificar a *Lactococcus lactis* ATCC N°11454 como resistente (R), moderadamente sensible (MS) y sensibles (S) según la medida del halo obtenido en la prueba de antibiograma.

Código antibiótico	Nombre antibiótico	R	MS	S
DA2	Clindamicina ^b	12,4	15,5-17,4	17,5
LZD30	Linezolid ^d	20	21-22	23
P10	Penicilina G ^c	19	20-27	28
K30	Kanamicina ^a	sh	10	10-35
CN10	Gentamicina ^e			
LEV5	Levofloxacin ^d	13	14-16	17
CTX30	Cefotaxima ^c	14	15-22	23
CAR100	Carbenisillina ^e			
E15	Eritromicina ^a	sh	10	10-35
CE30	Cephadrine ^c	14	15-17	18
VA5	Vancomycin ^e			
TE30	Tetracycline ^b	12	13-15	16
C30	Chloranphenicol ^b	12,4	12,5-17,4	17,5
S10	Streptomycin ^c	11	12--14	15

a= Khemariya, Singh, Nath y Gulati, 2013. b= CLSI, 2007 citado por Haghshenas et al., 2014. c= Charteris et al., 1998. d=CLSI 2013 citado por Ture y Boran, 2015. e= No se encontraron referencias

Tabla 11. Concentración de ADN de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. utilizados en este trabajo.

Código	Abs. 260-280	Abs. 230	Concentración *
Lr 8A	2.25	1.67	470.9
Lr 15	2.22	1.50	577.1
Lr 20A	2.28	1.79	733.3
Lc 44	2.31	1.70	348.7
Lg 59	2.07	1.45	72.4
Lr 117	2.23	1.55	469.7
Lc 130B	1.82	1.59	279.0
Lr 139	2.11	1.81	687.5
Lp 155	2.52	1.62	157.1
Lp 164B	2.38	1.70	182.9
Lh 193	2.38	1.31	244.5
Lh 198	2.11	1.87	1409.6

*medidas tomadas en espectrofotómetro (NanoDrop® ND1000).