

# EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE CULTIVOS COMERCIALES USADOS PARA LA ELABORACIÓN DE QUESOS

## Evaluation of enzymatic activities from comercial starters used in cheesemaking

Lourdes Guerrero\*

Graciela Muset\*\*

Lidís Pacheco\*

\* Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de los Andes Trujillo. Venezuela. Fax: 072-362177

\*\* Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea CITIL-INTI. Buenos Aires, Argentina. Fax: 7542102

### RESUMEN

Se evaluaron las actividades enzimáticas de cultivos comerciales mixtos y puros, los cuales se clasificaron como mesófilos y termófilos de acuerdo al tipo de cepa presente en el mismo. Las actividades fueron medidas como **actividad acidificante** expresada en °D, **actividad proteolítica** sobre la Caseína Hammersten y la **actividad aminopeptidásica** con la Leu-p-Nitroanilida como sustrato. Los resultados señalan que los cultivos mesófilos mixtos presentan actividad proteolítica de acuerdo a la característica del mismo, es decir que para un cultivo de velocidad de fermentación rápida se observan valores altos. Los cultivos mesófilos mixtos y puros utilizados para la producción de aroma dan valores altos de actividad aminopeptidásica. En relación a los cultivos termófilos la interacción entre las cepas del yogurt es más compleja y va a depender del tipo de cepa usada en cada tipo de mezcla. En el presente trabajo se detectaron valores más altos de actividad proteolítica y aminopeptidásica para los cultivos referidos con un alto poder acidificante comparado con el moderado.

**Palabras claves:** Fermentos mixtos, queso, actividad proteolítica, aminopeptidásica, acidificante, aroma.

### ABSTRACT

Enzymatic activities of single and mixed commercial starters classified as mesophilic or thermophilic according to the included strains were evaluated. Different activities were measured such as **acidifying activity** expressed as °D, **proteolytic activity** on Hammersten casein and

**aminopeptidase activity** using Leu-p-Nitroanilide as substrate. The results showed that mesophilic mixed culture starters presented proteolytic activity according to their characteristics, which mean that high values were reported for those cultures with high fermentation speed. High values of aminopeptidase activity were found for single and mixed starters used for aroma production. With respect to the thermophilic starters, the interaction among yogurt strains is complex and depend on the individual strains contained in the mixture. In the present work the higher values of proteolytic and aminopeptidase activities corresponded to those cultures with high acidifying power when compared with moderated acidifying power cultures.

**Key words:** Mixed starters, cheese, proteolytic activity, acidification, aminopeptidases, flavour.

### INTRODUCCIÓN

Los cultivos lácticos o Bacterias Ácido Lácticas (BAL) usadas en productos lácteos han sido definidos por la Federación Láctea Internacional como "Lactic Acid Starter".

Cuando se elige un cultivo láctico óptimo para la elaboración de un producto lácteo específico, se deben tomar en cuenta ciertas características que son importantes. Podemos mencionar algunas de ellas:

- La habilidad para formar ácido láctico
- La propiedad de filante
- La propiedad texturizante
- La producción de compuestos aromáticos y sabor

El último aspecto puede ser dividido en: una directa producción de sabores a partir del metabolismo de la lactosa, ci-

trato y otros compuestos hidrocarbonados y una producción indirecta que está relacionada al sistema enzimático de la bacteria. Por lo tanto, el "screening" de la actividad proteasa/peptidasa de los cultivos debe ser llevada a cabo para evitar cualquier formación de péptidos amargos ya que esto limitará la vida de almacenamiento del producto [1].

El sistema enzimático de las BAL ha sido ampliamente estudiado encontrándose a las proteinasas en todos los espacios celulares y la caracterización y localización de las enzimas que hidrolizan péptidos también han sido bien investigadas [4, 5, 11, 15, 17].

La velocidad de fermentación de un cultivo ácido láctico va a depender de la capacidad que tenga la cepa de hidrolizar las proteínas de la leche en péptidos y aminoácidos para iniciar su transporte a la célula, así como de su sistema de enzimas proteolíticas asociadas a la pared celular. Se ha encontrado que la variante Proteasa negativo (Pr<sup>-</sup>) no es capaz de sintetizar proteínas asociadas a la pared celular; por lo tanto es incapaz de hidrolizar las proteínas de la leche para su normal crecimiento, por lo que en un cultivo puro el crecimiento va a depender de la presencia de moléculas de bajo peso molecular, y en un cultivo mixto del porcentaje de células Proteasa positivo (Pr<sup>+</sup>) presentes en el cultivo. Mientras mayor sea este porcentaje, más alto será el nivel de estimulación de crecimiento de las cepas Pr<sup>-</sup>. Los péptidos formados deben ser posteriormente degradados por endopeptidasas y exopeptidasas localizadas en o fuera de la membrana, a unidades transportables de péptidos pequeños y luego una variedad de peptidasas intracelulares completa la hidrólisis para producir aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular que van a contribuir en el desarrollo del sabor de los quesos [13, 21, 22].

Geis y col. [6] y Mill y Thomas [16] sugirieron que en un cultivo mixto el porcentaje de células Pr<sup>+</sup> debe estar entre un 20-28% para minimizar el desarrollo del amargo en los quesos. Sorensen y col. [20] demostraron que variando el contenido de

Pr<sup>-</sup> en un cultivo mixto desde 0-80% se reduce el número de péptidos amargos y aumenta la calidad del queso.

Debido a que es bien reconocida la importancia de las BAL como una fuente de proteasas y peptidasas, la caracterización según su actividad proteolítica y acidificante es un preámbulo necesario para una buena evaluación de la maduración de los quesos. En este trabajo se presentan los resultados de las actividades enzimáticas medidas como actividad proteolítica, aminopeptidásica y acidificante de cultivos lácticos comerciales mixtos y puros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas utilizadas

Cultivos Lácticos comerciales utilizados en Venezuela para la elaboración de queso, la codificación señalada en las Tablas fue colocada por los autores de este trabajo de acuerdo a las características señaladas por el fabricante

La TABLA I presenta algunas características de cultivos lácticos mixtos:

- Mesófilos Homofermentativos codificados como: FR, FM1, FM2.
- Mesófilos Heterofermentativos codificados como: FMAG y AG
- Termófilos codificados como: AA y AM

La TABLA II presenta algunas características de cultivos lácticos puros:

- Mesófilos Heterofermentativos codificados como: AG1 y AG2
- Termófilos codificados como: VAR y APT

**Medio de Crecimiento:** Thomas y Turner [23] idearon un medio agregándole a 100 ml de casitone (0.5%) 10 g de le-

TABLA I  
CARACTERÍSTICAS DE CULTIVOS LÁCTICOS MIXTOS COMERCIALES

Código	Composición	Características
FR	LI, Lc, St.	Velocidad de fermentación rápida
FM	LI, Lc.	Velocidad de fermentación moderada
FM1	LI, Lc, Ld, St.	Velocidad de fermentación moderada
FM2	LI, Lc, Lm.	Velocidad de fermentación moderada y producción aroma +++ y gas +
AA	St, Ldl.	Alto poder acidificante
AM	St, Ldb.	Moderado poder acificante
AG	Ld, Lm.	Producción aroma +++ y gas +++

LI: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Lc: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Ld: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. Ldb: *Lactococcus delbruecki* subsp. *bulgaricus*. Ldl: *Lactococcus delbruecki* subsp. *lactis*. Lm: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. St: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

che descremada (MERCK) en forma estéril y 3 ml de B -glicerofosfato (3M), para permitir el crecimiento celular a una alta densidad ( $10^9$  ufc/ml) sin que ocurra coagulación del medio.

**Medida de la densidad óptica (D.O.) del cultivo:** La técnica de Kanasaki y col. [12] fue utilizada para determinar la correspondiente densidad celular (peso seco de bacteria mg/ml) por el método de Thomas y Turner [23]. A 0.5 ml de cultivo se le agregaron 4.5 ml de EDTA (0.2%) pH 12 y la turbidez se midió en un espectrofotómetro a 480 nm

### Recuperación celular

**Preparación de la suspensión celular:** Las bacterias al final de la fase logarítmica, se recolectaron por centrifugación y fueron lavadas con buffer B -glicerofosfato 0.05M con  $\text{CaCl}_2$  (20mM) pH7 [16]. El volumen celular precipitado se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0.1M pH 6 dejándolo a una concentración final de 10%. La suspensión celular se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ .

**Recuento del número de células viables como ufc/ml:** Se sembraron las diluciones entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$  en agar M17(peptona, extracto de levadura y carne, lactosa, ácido ascórbico, sulfato de magnesio y  $\beta$ -glicerofosfato de sodio) de los cultivos al final de su crecimiento y de la suspensión celular, quedando estas últimas en todos los casos en el orden de  $10^{10}$  ufc/ml. El agar M17 contiene  $\beta$ -glicerofosfato de sodio como un buffer que neutraliza el ácido producido por las bacterias y permite una alta población de colonias sobre el agar.

**TABLA II**  
**CARACTERÍSTICAS DE CULTIVOS LÁCTICOS**  
**COMERCIALES PUROS**

Código	Composición	Características
AG1	Ld	producción aroma +++ y gas +++
AG2	Ld	producción aroma ++ y gas ++
VAR	St	Velocidad acidificación rápida
APT	St	Elevado poder texturizante

Ld: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetilactis*. St: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

### Caracterización enzimática de las células

**Actividad acidificante:** Veinte ml de leche descremada estéril (10%) fueron inoculados al 1% con la suspensión celular e incubados a  $32^\circ\text{C}$  para los cultivos mesófilos y a  $37^\circ\text{C}$ . para los termófilos. La acidez se determinó por titulación con NaOH 0.1 N a las 0 y 6h y se expresó en  $^\circ\text{D}$

**Actividad proteolítica:** La medida de la actividad proteolítica se realizó a través del método de Hull [9]. A 4.5 ml de Caseína Hammersten (2%) en buffer fosfato de sodio 0.05M pH 7 se le agregaron 0.5 ml de la suspensión celular, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  para hacer una cinética a tiempo 0, 3 y 6h. El color desarrollado con el reactivo de Folin-Ciocalteon se midió en un espectrofotómetro a 650 nm La actividad de la enzima se estimó en términos de densidad óptica (DO) entre 0 y 6h. Bajo estas condiciones 1 unidad de actividad se mide como un incremento de 0.01 DO en 6h.

**Actividad aminopeptidásica:** Se llevó a cabo según el método de Desmazeaud y Juge [3]. La actividad aminopeptidásica se realizó a  $37^\circ\text{C}$  usando como sustrato la Leu-p-nitroanilide (leupNA). Se realizó una cinética a 0, 20, 40 y 60 min, el color desarrollado se midió en un espectrofotómetro a 410 nm. La actividad de la enzima se estimó en unidades de densidad óptica (DO) entre 0 y 60min. Bajo estas condiciones 1 unidad de actividad se mide como un incremento de 0.1 DO en 1h.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad enzimática de cultivos mesófilos

La TABLA III representa las actividades enzimáticas y el crecimiento celular de algunos cultivos mesófilos mixtos comerciales. En la misma, se puede observar que aquellos cultivos con velocidad de fermentación rápida muestran valores superiores de actividad proteolítica ( $>70$ ) comparada con la determinada para aquellos cultivos de velocidad de fermentación moderada (40-50). En este sentido, Julliard y Richard [10] y Sorensen y col. [20] determinaron que el límite crítico de células  $\text{Pr}^+$  que debe existir en un cultivo mixto debe ser de 20%, ya que valores menores disminuyen sensiblemente la actividad proteolítica y la tasa de acidificación en leche. Valores superiores a este porcentaje aumentan la actividad proteolítica pero

**TABLA III**  
**ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE CULTIVOS MESÓFILOS COMERCIALES MIXTOS**

Código	Características Velocidad Fermentación	A. Proteolítica	A. Aminopeptidásica	A. Acidificante
		(6 h.)	(20 min)	( $^\circ\text{D}$ )
FR	Rápida	$>70$	8.0	43.0
FM	Moderada	52	8.1	41.6
FM1	Moderada	40	8.1	42.5
FM2	Moderada	43	8.3	49.1

TABLA IV  
**ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE CULTIVOS TERMÓFILOS COMERCIALES MIXTOS**

Características		A. Proteolítica	A. Aminopeptidásica	A. Acidificante
Código	Poder Acidificante	(6 h.)	(20 min)	(°D)
AA	Alto	33	>9.0	55.5
AM	Moderado	11	3.8	42.3

TABLA V  
**ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE CULTIVOS COMERCIALES PUROS**

Características	A. Proteolítica	A. Aminopeptidásica	A. Acidificante
Código	(6 h.)	(20 min)	(°D)
VAR	22	>9.0	47.3
APT	10	8.4	32.7

no afectan la actividad acidificante, la cual permanece relativamente constante y se reduce también el número de péptidos hidrofóbicos y el nivel de amargo en los quesos.

Los resultados de estos autores permiten sugerir que en el caso estudiado los cultivos que presentan velocidad de fermentación rápida deben tener mayor porcentaje de células Prt<sup>+</sup> dando mayor actividad proteolítica comparada con los cultivos de velocidad de fermentación moderada.

Anteriormente, Guerrero y Muset [8] trabajando con cultivos mesófilos mixtos encontraron valores bajos de actividad proteolítica, lo cual permite clasificarlos como cultivos de fermentación lenta comparada con los analizados en el presente trabajo.

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que no existe variación de la actividad aminopeptidásica entre los diferentes cultivos. En relación a esto, Thomas y Mills [21] demostraron que las células Prt<sup>-</sup> presentan actividad peptidásica y transporte de péptidos similares a la Prt<sup>+</sup>.

#### Actividad enzimática de cultivos termófilos

La TABLA IV muestra los resultados de actividad enzimática para los cultivos termófilos mixtos. Se detectaron valores de actividad proteolítica y aminopeptidásica superiores para el cultivo AA (33 y >9.0) en relación al cultivo AM (11 y 3.8), presentando respectivamente un alto y moderado poder acidificante de acuerdo a las características señaladas por el fabricante. Ghitti y col. [7] y Bouton y col. [2] trabajando con cultivos termófilos reportaron valores similares a los encontrados para el cultivo AA. Estos resultados indican que la interacción entre las cepas de yogurt es muy compleja y va a depender principalmente de la cepa usada en cada una de las mezclas.

Por otro lado, se puede observar en la TABLA V que la cepa VAR (22 y >9.0) presenta valores de actividad proteolítica y aminopeptidásica mayores comparados con la cepa APT (10 y 8.4). En ambos casos la cepa *S. salivarius* subsp. *thermophilus* presenta características diferentes de acuerdo a lo señalado por el fabricante, siendo para la primera de ellas velocidad de acidificación rápida y para la segunda alto poder texturizante. Además se encontraron valores diferentes de actividad acidificante, lo cual, de acuerdo con Zourari y col. [24] depende de la cepa usada.

#### Actividad enzimática de cultivos mesófilos productores de aroma

En la TABLA VI están representados los cultivos productores de aroma. Se detectaron valores mayores de actividad aminopeptidásica para los cultivos indicados como los de mayor producción de aroma de acuerdo a las características señaladas por el fabricante (AG y AG1).

En relación a cultivos productores de aroma y gas, Salvadori [19] señala que la producción de sustancias aromáticas por parte de los fermentos o starter se inserta en el contexto de sus actividades metabólicas, que conducen a la formación de ácidos orgánicos, aminoácido, péptidos, diacetilo y acetoina; además indica que las bacterias lácticas responsables de la formación de algunos de estos productos son fundamentalmente *L. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc*, *L. plantarum* y *L. casei*. Algunas de estas cepas se encontraron formando parte de los cultivos productores de aroma y gas, TABLA VI.

Law y col. [14] y Monnet y col. [18] reportan que las peptidasas son las responsables de la degradación de péptidos amargos y de la liberación de aminoácidos y péptidos pequeños los cuales a su vez son los encargados de los compuestos aromáticos. El último de estos autores señalan que las peptida-

TABLA VI  
ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE CULTIVOS COMERCIALES MIXTOS Y PUROS

Código	Características		A .proteolítica (6 h)	A. Aminopeptidásica (20 min)	A. Acidificante ( °D)
	Producción aroma	Producción gas			
AG	+++	+	13.5	8.1	25.0
AG1	+++	+	13.0	9.5	51.6
AG2	+	+	16.0	5.9	50.8

sas de los *Lactococcus* están compuestas al menos de 3 aminopeptidasas y además señala que toda esta capacidad que tengan las cepas debe ir acompañada de la aptitud de la célula a lisarse.

## CONCLUSIONES

Cultivos mesófilos mixtos con velocidad de fermentación rápida presentaron valores de actividad proteolítica alta.

Cultivos mesófilos mixtos y puros productores de aroma presentaron valores de actividad aminopeptidásica alta.

Cultivos termófilos mixtos con alto poder acidificante presentan valores de actividad proteolítica y aminopeptidásica altos.

Cultivos termófilos puros presentaron valores de actividad aminopeptidásica y proteolítica diferente, lo cual depende de las características de la cepa.

Por lo tanto, la evaluación de las actividades proteolíticas, aminopeptidásicas y acidificantes de los cultivos permite su caracterización.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda un estudio más detallado de la caracterización enzimática para conocer mejor el sistema proteolítico de las BAL, lo cual es de gran importancia en la tecnología quesera. Este trabajo será complementado con ensayos a nivel de maduración y proteólisis en quesos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMANN, F. Cultivos lácticos para productos lácteos. Una estrategia para el desarrollo futuro. **Tecnología Láctea Latinoamericana** 1:31-36. 1995.
- [2] BOUTON, Y.; GUYOT, P.; DASEN, A.; GRAPPIN, R. Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. I. Validation sur minifromages des techniques de laboratoire. **Le Lait** 73: 265-279. 1993.
- [3] DESMAZEAUD, M. J.; JUGE, M. Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidasas et des aminopeptidasas de *Streptococcus thermophilus*. **Le Lait** 56:241-260. 1976.
- [4] EXTERKATE, F.A.; DE VEER G.J.C. Partial isolation and degradation of caseins by cell wall proteinase(s) of *Streptococcus cremoris* HP. **Applied and Environmental Microbiology** 49(2):328-332. 1985.
- [5] EXTERKATE, F.A. Location of peptidasas outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. **Applied and Environmental Microbiology** 47(1):177-183. 1984.
- [6] GEIS, A.; KIEFER, B.; TEUBER, M. Proteolytic activities of lactic acid Streptococci isolated from dairy starter cultures. **Chemi. Microbiol. Technol. Lebensm.** 10:93-95. 1986.
- [7] GHITTI, C.; SALVADORI, B.; ROTTIGNI, C. Il formaggio gorgonzola III. **Scienza e Tecnica Lattiero-casearia.** 47(3): 195-216. 1996.
- [8] GUERRERO, L.; MUSET, G. Observaciones preliminares para una propuesta sobre la caracterización de fermentos según su sistema enzimático. **Revista Científica. Facultad de Ciencias Veterinarias.** VI (3):161-166. 1996.
- [9] HULL, M. E. Studies of milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hidrolisis of the proteins in milk. **J. Dairy Sci.** 30:881-884. 1947.
- [10] JUILLARD, V.; RICHARD, J. Mixed cultures in milk of a proteinase-positive and a proteinase-negative variant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: influence of initial percentage of proteinase-positive cells on the growth parameters of each strain and the rate of acidification. **Le Lait** 74: 3-12. 1994.
- [11] KAMALY, K.M.; MARTH, E.H. Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese: A review. **J. Dairy Sci.** 72:1945-1966. 1989.
- [12] KANASAKI, M.; BREHENY, S.; HILLIER, A.J.; JAGO, C.R. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria 1. A rapid method for

- the estimation of bacterial population on milk. **Aust. J. Dairy Technol.** 30:142-144. 1975.
- [13] LAW, B.A.; KOLSTAD, J. Proteolysis systems in lactic acid bacteria. **Antonie van Leewenhoeck** 49:225-245. 1983.
- [14] LAW, J.; FITZGERALD, G.F.; UNIACKE-LOWE, T.; DALY, C.; FOX, P.F. The contribution of Lactococcal starter proteinases to proteolysis in Cheddar cheese. **J. Dairy Sci.** 76:2455-2467. 1993.
- [15] LAW, J.; FITZGERALD, G.F.; DALY, C.; FOX, P.F.; FARKYE, N.Y. Proteolysis and flavor development in cheddar cheese made with the single starter strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* UC317 or *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP. **J. Dairy Sci.** 75:1173-1185. 1992.
- [16] MILLS, D.E.; THOMAS, T.D. Release of cell wall-associated proteinase(s) from lactic streptococci. **New Zeland J. Dairy Sci. Technol.** 13:209-215. 1978.
- [17] MONNET, V. Proteolytic system of lactic acid bacteria. **Revista Argentina de Lactología** VII (11):25-35. 1995.
- [18] MONNET, V.; CHAPOT-CHARTIER. M.P.; GRIPON, J.C. Les peptidasas des lactocoques. **Le Lait** 73:97-108. 1993.
- [19] SALVADORI, B.B. New types of starters and its utilization in the elaboration of dairy products. **Revista Argentina de Lactología** 5:23-65. 1991.
- [20] SORENSEN. N.K., QVIST K.B.; MULHOLLAND, F. Significance of low molecular weight nitrogen constituents in cheese milk and proteinase-negative variants of a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain on the production and maturation of Danbo cheese. **Int. Dairy Journal** 6:113-128. 1996.
- [21] THOMAS, T. D.; MILLS, D.E. Proteolysis enzymes of starter bacteria. **Neth. Milk Dairy J.** 35:255-273.1981.
- [22] THOMAS, T.D.; PRITCHARD, G.G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. FMS. **Microbiol. Rev.** 46:245-268. 1987.
- [23] THOMAS, T.D.; TURNER, K.W. Preparation of skim milk to allow harvesting of starter cultures. FMS. **Microbiol. Rev.** 46:245-268. 1987.
- [24] ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurth bacteria. A Review. **Le Lait** 72:1-34. 1992.