

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 6 5 5 9 2 1 *

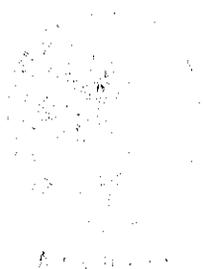
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**DEGRADACIÓN DE PÉPTIDOS HIDRÓFOBOS POR
BACTERIAS LÁCTICAS. APLICACIÓN EN LA
ELIMINACIÓN DEL SABOR AMARGO EN QUESO**

MARÍA JESÚS GÓMEZ DE LA CRUZ

MADRID, 1996

21.164



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEGRADACIÓN DE PÉPTIDOS HIDRÓFOS POR
BACTERIAS LÁCTICAS. APLICACIÓN EN LA ELIMINACIÓN
DEL SABOR AMARGO EN QUESO**

MEMORIA PRESENTADA POR

MARÍA JESÚS GÓMEZ DE LA CRUZ

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR EN CC. BIOLÓGICAS

DIRECTORES: DRAS. MARGARITA MEDINA Y PILAR GAYA

ÁREA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

CIT-INIA

EL DOCTORANDO

VºBº LOS DIRECTORES



MARGARITA MEDINA FERNÁNDEZ-REGATILLO Y PILAR GAYA SICILIA,
INVESTIGADORAS A2 DEL ÁREA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DEL CIT-
INIA,

CERTIFICAN: que la Tesis titulada "Degradación de péptidos hidrófobos por bacterias lácticas. Aplicación en la eliminación del sabor amargo en queso" de la que es autora María Jesús Gómez de la Cruz, ha sido realizada bajo su dirección en el Área de Tecnología de Alimentos del CIT-INIA, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 28 de Junio de 1996

Fdo.: Margarita Medina

Fdo.: Pilar Gaya

*A mis padres,
a mis hermanos*

AGRADECIMIENTOS

A Marga, a Pilar y a Manolo, por su dedicación a lo largo de estos años. A Manolo, por las ideas aportadas en la revisión de este trabajo. A Pilar y, muy especialmente, a Marga, por sus aportaciones en la discusión de los resultados y por el gran esfuerzo realizado en los últimos momentos de la elaboración de esta Tesis.

A Máximo, por su colaboración durante las fabricaciones en quesería.

A Celia, por su ayuda en la determinación de las fracciones nitrogenadas de los quesos.

A Sonia, por su colaboración en la determinación de las caseínas y, sobre todo, por su entusiasmo y su ayuda en todas las tareas del laboratorio.

A todos mis compañeros del Departamento, especialmente a Eva, Javier T., Angel, Gabriel, Javier F., Jose Luis, Estrella, Chiqui, Jesús, Carlos y Esther, por el buen ambiente de trabajo que crearon en el laboratorio, porque siempre estuvieron dispuestos a echar una mano y, sobre todo, por su paciencia y su amistad.

A mi familia, por su confianza y su apoyo durante estos años.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

RESUMEN

El sabor amargo es un defecto relativamente frecuente en el queso, cuya principal causa es la acumulación de péptidos amargos, generalmente hidrófobos. Esta acumulación se produce cuando la velocidad de formación de péptidos amargos es superior a la velocidad de degradación. Las peptidasas de algunas bacterias lácticas son eficientes en la degradación de péptidos hidrófobos.

El limitado número de fermentos que existe actualmente en el mercado con características adecuadas para la fabricación de determinadas variedades de queso hace que la búsqueda de nuevas cepas de bacterias lácticas que puedan ser empleadas como componentes de fermentos para la elaboración de queso cobre una gran importancia, en especial si dichas cepas contribuyen a la mejora de la calidad organoléptica del producto.

En la presente Tesis Doctoral se han estudiado en primer lugar algunas características tecnológicas de 733 aislamientos de bacterias lácticas procedentes de queso Manchego y de queso de Gredos elaborados con leche cruda de oveja y cabra, respectivamente. Los lactococos presentaron mayor actividad acidificante y proteolítica que el resto de los géneros estudiados, e hidrolizaron preferentemente la β -caseína frente a la α_{s1} -caseína.

La actividad aminopeptidásica de 177 aislamientos seleccionados resultó en general reducida, así como sus actividades dipeptidil-aminopeptidásica, dipeptidásica, tripeptidásica, endopeptidásica y carboxipeptidásica.

Se utilizó un fermento compuesto por cuatro aislamientos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en la elaboración de queso Manchego a partir de leche cruda y de leche pasteurizada de oveja. Las características generales y organolépticas de los quesos elaborados con este nuevo fermento resultaron comparables a las de los quesos elaborados con un fermento comercial. Además, se comprobó la disminución del nivel de amargor en los quesos fabricados con el nuevo fermento.

Se seleccionaron cuatro aislamientos con actividad peptidásica más elevada, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, para su empleo como adjuntos a un fermento comercial mesófilo en la elaboración de quesos modelo con Neutrase, preparación comercial de la proteinasa neutra de *Bacillus subtilis*, productora de péptidos hidrófobos a partir de la caseína de la leche. Se observó la disminución del nivel de estos péptidos debida a la adición de los adjuntos. Se ensayaron además nueve fermentos termófilos comerciales con el mismo objetivo. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron los aislamientos *L. plantarum* ESI 144 y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598, así como el fermento termófilo comercial TA 558, por presentar una mayor capacidad de degradación de péptidos hidrófobos en los quesos modelo.

Se elaboraron quesos semiduros de leche cruda y de leche pasteurizada de vaca, con adición de Neutrase y de un 1% de los adjuntos seleccionados. Se investigaron las características microbiológicas, químicas, reológicas y sensoriales de los quesos durante 60 d de maduración. Los quesos de leche pasteurizada presentaron un sabor amargo más acusado que los quesos de leche cruda y los elaborados con Neutrase más que los elaborados sin Neutrase

En los quesos de leche cruda, la adición de *L. plantarum* ESI 144, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 o el fermento termófilo comercial TA 558 como adjuntos al fermento dio lugar a un descenso de los niveles de péptidos hidrófobos, aunque no se detectó ningún efecto en la disminución del amargor del queso, que resultó en general poco intenso.

La adición de *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento en la elaboración de queso semiduro de leche pasteurizada de vaca con adición de Neutrase disminuyó el nivel de péptidos hidrófobos y el amargor del queso. Cuando se empleó *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto al fermento disminuyó el contenido de péptidos hidrófobos y se redujo significativamente el sabor amargo. Sin embargo, el empleo fermento termófilo TA 558 como adjunto en la elaboración de quesos de leche pasteurizada con adición de Neutrase incrementó el nivel de péptidos hidrófobos, aunque disminuyó el amargor del queso. El desarrollo de sabor amargo en

los quesos fue inferior cuando se aplicaron temperaturas más altas en las primeras horas de fabricación para favorecer el desarrollo de los estreptococos termófilos. La mayor formación de N soluble en PTA de los quesos elaborados con Neutrase y el adjunto termófilo podría enmascarar parcialmente el sabor amargo asociado a los niveles elevados de péptidos hidrófobos.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fermentos lácticos en la elaboración de queso	2
1.1.1. Clasificación de los fermentos lácticos	3
1.1.2. Metabolismo	4
1.1.2.1. Metabolismo de la lactosa	5
1.1.2.2. Metabolismo del citrato	6
1.2. Proteolisis en el queso	7
1.2.1. Proteolisis en la fabricación del queso	7
1.2.1.1. Coagulación de la leche	7
1.2.1.2. Coagulantes	9
1.2.2. Proteolisis en la maduración	10
1.2.2.1. Proteinasas de la leche	11
1.2.2.2. Cuajo residual	11
1.2.2.3. Enzimas de la flora secundaria	12
1.3. Enzimas proteolíticas de los fermentos	13
1.3.1. Proteinasas	14
1.3.2. Peptidasas	19
1.4. Sabor amargo en el queso	25
1.4.1. Factores que influyen en el desarrollo del sabor amargo	27
1.4.2. Efecto de la aceleración de la maduración en el sabor amargo	33
1.4.3. Evaluación del sabor amargo	35
1.4.4. Mecanismos de formación del sabor amargo	37
1.4.5. Aislamiento e identificación de péptidos amargos	45
1.4.5.1. Métodos de aislamiento de péptidos amargos de queso	45
1.4.5.2. Identificación de péptidos amargos aislados de queso	46
1.4.6. Relación entre la estructura química de los péptidos amargos y el sabor	47
1.4.7. Eliminación del sabor amargo en el queso	50
1.5. Objetivos	53

2. MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.1. Caracterización de nuevos aislamientos de bacterias lácticas	55
2.1.1. Actividad acidificante	55
2.1.2. Actividad proteolítica	55
2.1.2.1. Actividad proteolítica en leche	55
2.1.2.2. Actividad proteolítica sobre soluciones de caseína	56
2.1.3. Actividad peptidásica	57
2.1.3.1. Obtención de extractos libres de células	57
2.1.3.2. Medida de la actividad aminopeptidásica	58
2.1.3.3. Medida de las actividades dipeptidásica, tripeptidásica y carboxipeptidásica	58
2.1.3.4. Medida de la actividad endopeptidásica	59
2.2. Elaboración de queso Manchego de leche cruda y de leche pasterizada con un nuevo fermento	59
2.3. Elaboración de quesos modelo para la selección de bacterias lácticas con actividad sobre péptidos hidrófobos	60
2.4. Elaboración de queso semiduro de leche cruda y leche pasterizada de vaca con bacterias lácticas seleccionadas como adjunto	62
2.5. Análisis químicos de leche y queso	63
2.5.1. Toma de muestras	63
2.5.2. pH	63
2.5.3. Extracto seco	63
2.5.4. Caseínas residuales	64
2.5.5. Fracciones de nitrógeno soluble	65
2.5.6. Péptidos de la fracción soluble en agua	66
2.6. Análisis microbiológicos de leche y queso	67
2.6.1. Toma y preparación de muestras	67
2.6.2. Recuento de microorganismos viables totales	67

2.6.3. Recuento de lactobacilos	68
2.6.4. Recuento de leuconostocs	68
2.6.5. Recuento de termófilos	68
2.7. Análisis reológico	68
2.8. Análisis organoléptico	69
2.9. Tratamiento estadístico	70
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
3.1. Caracterización de nuevos aislamientos de bacterias lácticas	72
3.1.1. Resultados	72
3.1.1.1. Actividad acidificante	72
3.1.1.2. Actividad proteolítica	74
3.1.1.2.1. Actividad proteolítica en leche	74
3.1.1.2.2. Actividad proteolítica sobre soluciones de caseína	77
3.1.1.3. Actividad peptidásica	81
3.1.2. Discusión	96
3.1.2.1. Actividad acidificante	96
3.1.2.2. Actividad proteolítica	96
3.1.2.3. Actividad peptidásica	98
3.2. Empleo de bacterias lácticas seleccionadas como fermento en la elaboración de queso Manchego	101
3.2.1. Resultados	101
3.2.1.1. Características generales	101
3.2.1.2. Proteolisis	104
3.2.1.3. Péptidos de la fracción soluble en agua	107
3.2.1.4. Reología	107
3.2.1.5. Características sensoriales	112
3.2.2. Discusión	112

3.3. Selección de bacterias lácticas con actividad sobre péptidos hidrófobos para su empleo como adjuntos en la elaboración de queso	118
3.3.1. Resultados	118
3.3.1.1. Lactobacilos como adjuntos al fermento	118
3.3.1.2. Leuconostocs como adjuntos al fermento	122
3.3.1.3. Estreptococos termófilos como adjuntos al fermento	125
3.3.2. Discusión	127
3.4. Actividad desamargante de bacterias lácticas como adjuntos durante la maduración de queso semiduro de leche de vaca	129
3.4.1. Resultados	129
3.4.1.1. Quesos de leche cruda	129
3.4.1.1.1. <i>L. plantarum</i> ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda	129
3.4.1.1.1.1. Microbiología, pH y extracto seco	129
3.4.1.1.1.2. Proteolisis	131
3.4.1.1.1.3. Péptidos de la fracción soluble en agua	131
3.4.1.1.1.4. Reología	136
3.4.1.1.1.5. Características sensoriales	136
3.4.1.1.2. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda	139
3.4.1.1.2.1. Microbiología, pH y extracto seco	139
3.4.1.1.2.2. Proteolisis	139
3.4.1.1.2.3. Péptidos de la fracción soluble en agua	142
3.4.1.1.2.4. Reología	146
3.4.1.1.2.5. Características sensoriales	146
3.4.1.1.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjuntos al fermento en quesos de leche cruda	146
3.4.1.1.3.1. Microbiología, pH y extracto seco	146
3.4.1.1.3.2. Proteolisis	150
3.4.1.1.3.3. Péptidos de la fracción soluble en agua	150
3.4.1.1.3.4. Reología	154
3.4.1.1.3.5. Características sensoriales	154
3.4.1.2. Quesos de leche pasteurizada	158

3.4.1.2.1. <i>L. plantarum</i> ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche pasterizada	158
3.4.1.2.1.1. Microbiología, pH y extracto seco	158
3.4.1.2.1.2. Proteolisis	158
3.4.1.2.1.3. Péptidos de la fracción soluble en agua	160
3.4.1.2.1.4. Reología	167
3.4.1.2.1.5. Características sensoriales	167
3.4.1.2.2. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche pasterizada	170
3.4.1.2.2.1. Microbiología, pH y extracto seco	170
3.4.1.2.2.2. Proteolisis	172
3.4.1.2.2.3. Péptidos de la fracción soluble en agua	172
3.4.1.2.2.4. Reología	179
3.4.1.2.2.5. Características sensoriales	179
3.4.1.2.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjuntos al fermento en quesos de leche pasterizada	182
3.4.1.2.3.1. Microbiología, pH y extracto seco	182
3.4.1.2.3.2. Proteolisis	182
3.4.1.2.3.3. Péptidos de la fracción soluble en agua	185
3.4.1.2.3.4. Reología	185
3.4.1.2.3.5. Características sensoriales	192
3.4.2. Discusión	194
3.4.2.1. Quesos de leche cruda	195
3.4.2.1.1. <i>L. plantarum</i> ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda	195
3.4.2.1.2. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda	196
3.4.2.1.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjunto al fermento en quesos de leche cruda	197
3.4.2.2. Quesos de leche pasterizada	198
3.4.2.2.1. <i>L. plantarum</i> ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche pasterizada	198
3.4.2.2.2. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche pasterizada	201

3.4.2.2.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjuntos al fermento en quesos de leche pasteurizada	203
4. CONCLUSIONES	206
5. BIBLIOGRAFÍA	210

Tabla 1. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso Manchego según su actividad acidificante en leche.	73
Tabla 2. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso de Gredos según su actividad acidificante en leche.	73
Tabla 3. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso Manchego según su actividad proteolítica en leche.	75
Tabla 4. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso de Gredos según su actividad proteolítica en leche.	75
Tabla 5. Valores del coeficiente de determinación (r^2) y nivel de significación de la regresión entre actividad acidificante y actividad proteolítica en leche para cada grupo de bacterias lácticas.	76
Tabla 6. Degradación de caseína por 34 aislamientos de lactococos de queso Manchego tras 6 h de incubación a 30°C.	78
Tabla 7. Degradación de caseína por 45 aislamientos de lactococos de queso de Gredos tras 6 h de incubación a 30°C.	79
Tabla 8. Distribución de 128 aislamientos de lactococos según su actividad aminopeptidásica.	82
Tabla 9. Distribución de 38 aislamientos de lactobacilos según su actividad aminopeptidásica.	82
Tabla 10. Distribución de 9 aislamientos de leuconostocs según su actividad aminopeptidásica.	83

Tabla 11. Actividad aminopeptidásica de los extractos libres de células de 27 aislamientos de lactococos, lactobacilos y leuconostocs con actividad específica frente a Lys-pNA igual o mayor de 50 U/mg.	84
Tabla 12. Actividad dipeptidil aminopeptidásica de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.	85
Tabla 13. Actividad dipeptidil aminopeptidásica de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.	86
Tabla 14. Actividad dipeptidil aminopeptidásica de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.	86
Tabla 15. Actividad endopeptidásica de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.	88
Tabla 16. Actividad endopeptidásica de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.	89
Tabla 17. Actividad endopeptidásica de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.	89
Tabla 18. Actividad dipeptidásica de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.	90
Tabla 19. Actividad dipeptidásica de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.	91
Tabla 20. Actividad dipeptidásica de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.	91
Tabla 21. Actividad tripeptidásica de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.	92

Tabla 22. Actividad tripeptidásica de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.	93
Tabla 23. Actividad tripeptidásica de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.	93
Tabla 24. Actividad carboxipeptidásica de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.	94
Tabla 25. Actividad carboxipeptidásica de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.	95
Tabla 26. Actividad carboxipeptidásica de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.	95
Tabla 27. Microorganismos totales y lactobacilos (log ufc/g) en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.	102
Tabla 28. Valores de pH y extracto seco en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.	103
Tabla 29. Caseínas residuales en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.	105
Tabla 30. Fracciones nitrogenadas en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.	106
Tabla 31. Peptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos, determinados por HPLC en fase reversa a 214 y 280 nm.	110

Tabla 32. Características reológicas el queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.	111
Tabla 33. Características sensoriales del queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos a los 60 días de maduración.	113
Tabla 34. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ESI 207 (Lb) y Neutrased (N), determinados por HPLC en fase reversa.	119
Tabla 35. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased (N), determinados por HPLC en fase reversa.	120
Tabla 36. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrased (N), determinados por HPLC en fase reversa.	123
Tabla 37. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con <i>L. lactis</i> ESI 712 (Leuc) y Neutrased (N), determinados por HPLC en fase reversa.	124
Tabla 38. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con estreptococos termófilos y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa.	126
Tabla 39. Valores de pH y extracto seco en queso de leche cruda elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased.	130
Tabla 40. Caseínas residuales en queso de leche cruda elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased.	132

Tabla 41. Fracciones nitrogenadas en queso de leche cruda elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrase.	133
Tabla 42. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.	134
Tabla 43. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.	135
Tabla 44. Características reológicas del queso de leche cruda elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrase.	137
Tabla 45. Características sensoriales del queso de leche cruda elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrase.	138
Tabla 46. Valores de pH y extracto seco en queso de leche cruda elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	140
Tabla 47. Caseínas residuales en queso de leche cruda elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	141
Tabla 48. Fracciones nitrogenadas en queso de leche cruda elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	143
Tabla 49. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.	144

Tabla 50. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.	145
Tabla 51. Características reológicas del queso de leche cruda elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	147
Tabla 52. Características sensoriales del queso de leche cruda elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	148
Tabla 53. Valores de pH y extracto seco en queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.	149
Tabla 54. Caseínas residuales en queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.	151
Tabla 55. Fracciones nitrogenadas en queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.	152
Tabla 56. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.	153
Tabla 57. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.	155
Tabla 58. Características reológicas del queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.	156

Tabla 59. Características sensoriales del queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased.	157
Tabla 60. Valores de pH y extracto seco en queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased.	159
Tabla 61. Caseínas residuales en queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased.	161
Tabla 62. Fracciones nitrogenada en queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased.	162
Tabla 63. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.	165
Tabla 64. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.	166
Tabla 65. Características reológicas del queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased.	168
Tabla 66. Características sensoriales del queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. plantarum</i> ESI 144 (Lb) y Neutrased.	169
Tabla 67. Valores de pH y extracto seco en queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrased.	171
Tabla 68. Caseínas residuales en queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrased.	173

Tabla 69. Fracciones nitrogenadas en queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	174
Tabla 70. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.	177
Tabla 71. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.	178
Tabla 72. Características reológicas del queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	180
Tabla 73. Características sensoriales del queso de leche pasteurizada elaborado con <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (Leuc) y Neutrase.	181
Tabla 74. Valores de pH y extracto seco en queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.	183
Tabla 75. Caseínas residuales en queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.	184
Tabla 76. Fracciones nitrogenadas en queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.	186

Tabla 77. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm. 189

Tabla 78. Péptidos hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm. 190

Tabla 79. Características reológicas del queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased. 191

Tabla 80. Características sensoriales del queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased. 193

Figura I. Hipótesis de Lowrie y Lawrence (1972).	40
Figura II. Mecanismo de formación del amargor en queso Gouda (Visser, 1977a).	43
Figura III. Modelo propuesto por Lemieux y Simard (1992) para la fabricación de queso Cheddar no amargo.	44
Figura 1. Degradación de β caseína por <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ESI 169 y por <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ESI 174.	80
Figura 2. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso Manchego de 60 d elaborado con un fermento comercial (a) y con fermento ECLAIR (b) a 214 nm.	108
Figura 3. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso Manchego de 60 d elaborado con un fermento comercial (a) y con fermento ECLAIR (b) a 280 nm.	109
Figura 4. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y <i>L. plantarum</i> ESI 144 (b) a 214 nm.	108
Figura 5. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y <i>L. plantarum</i> ESI 144 (b) a 280 nm.	109
Figura 6. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ESI 598 (b) a 214 nm.	175

Figura 7. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y *L.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (b) a 280 nm. 176

Figura 8. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y estreptococos termófilos (TA 558) a 214 nm. 187

Figura 9. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y estreptococos termófilos (TA 558) a 280 nm. 188

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FERMENTOS LÁCTICOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO

Los fermentos, también llamados cultivos iniciadores o starters, son cultivos puros o mezclas de bacterias lácticas con características apropiadas que se utilizan para realizar la fermentación de la leche en la elaboración de diversos productos fermentados.

Los fermentos lácticos metabolizan la lactosa, las caseínas y el citrato de la leche para originar ácido láctico, péptidos, aminoácidos y otra serie de compuestos como diacetilo, CO₂ y acetato que determinan las características organolépticas y la textura del queso.

Los fermentos empleados en la elaboración de quesos están formados por microorganismos pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. En algunos tipos de queso, es frecuente la adición de cultivos secundarios formados por otras bacterias como *Brevibacterium* y *Propionibacterium*, y por mohos y levaduras que confieren características peculiares a las distintas variedades de queso.

Durante muchos años la fabricación de queso se realizó mediante la fermentación de la leche por las bacterias lácticas que aparecían de forma natural en ésta y que provocaban su coagulación. La utilización de leche previamente acidificada para iniciar la fermentación constituyó durante mucho tiempo la fuente tradicional de cultivos mixtos empleados en la fabricación quesera. Este método sigue siendo utilizado en la actualidad en la producción artesanal de diversas variedades de queso, especialmente en el Sur de Europa.

Los fermentos mixtos están formados por microorganismos que poseen diferencias en sus características tecnológicas, como la capacidad de producción de ácido en leche, la capacidad proteolítica y la sensibilidad a los fagos (Andresen *et al.*, 1984; Stadhouders y Leenders, 1984). Debido a la importancia que estas características tienen en la producción de queso se han ido seleccionando, a lo largo del tiempo, aquellos cultivos con cualidades adecuadas con el fin de conseguir tanto la mejora de la calidad como la homogeneidad del producto final.

1.1.1. Clasificación de los fermentos lácticos

Los fermentos lácticos pueden ser clasificados atendiendo a distintas características.

Según el número de cepas que formen parte del fermento se distinguen dos tipos de cultivos. Los fermentos puros, formados por una única cepa, los fermentos múltiples, que son mezclas definidas de varias cepas, y los fermentos mixtos, formados por una mezcla indeterminada de diversas cepas.

Según la temperatura óptima de crecimiento se clasifican en fermentos mesófilos y fermentos termófilos.

Los fermentos mesófilos, con temperatura óptima alrededor de 30°C, son utilizados en la elaboración de los quesos más comunes de pasta prensada, blanda o azul, como el Manchego, Gouda, Cheddar, Edam, Camembert, Bleu, etc.

El fermento puede estar constituido por una única cepa o por dos o más cepas. El fermento siempre contiene bacterias productoras de ácido láctico, y los fermentos múltiples y mixtos suelen contener, además, bacterias productoras de compuestos aromáticos.

Según la naturaleza de las bacterias productoras de aroma y sabor los fermentos múltiples y mixtos se clasifican en cuatro tipos: tipo B o L cuando el productor de aroma es exclusivamente *Leuconostoc* spp.; tipo D cuando el productor de aroma es exclusivamente *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*; tipo BD o DL si incluye *Leuconostoc* spp. y *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* como productores de aroma. Los fermentos tipo O no contienen cepas productoras de aroma.

Todas las cepas que integran los fermentos múltiples y mixtos son evaluadas por su capacidad de producción de ácido a distintas temperaturas, por su sensibilidad a los fagos, por su compatibilidad con otras cepas y por su sensibilidad al NaCl, principalmente.

Los fermentos múltiples y mixtos se utilizan, entre otras razones, por su resistencia a los fagos y deben ser empleados correctamente. Una manipulación inadecuada puede conducir a la dominancia de alguna de las cepas de la mezcla y, por lo tanto, aumentar la susceptibilidad del fermento a los fagos.

Los fermentos termófilos, con temperatura óptima próxima a los 45°C, se usan principalmente en la elaboración de quesos de tipo italiano o suizo, en los que la temperatura de la cuajada durante la fabricación es elevada (50-55°C). Entre los quesos fabricados con estos fermentos se encuentran los quesos de pasta cocida, como el Emmental, Gruyère, Parmesano y Grana.

Los fermentos termófilos suelen estar compuestos por *Streptococcus thermophilus* y varias especies de lactobacilos como *L. helveticus*, *L. lactis* o *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Según la velocidad de producción de ácido los fermentos son clasificados en fermentos rápidos y fermentos lentos.

Según la capacidad de producción de sabor amargo en el queso se distinguen fermentos amargos y fermentos no amargos.

Según su presentación comercial los fermentos pueden ser concentrados congelados, concentrados liofilizados, concentrados liofilizados para su adición directa a cuba y concentrados congelados para su adición directa a cuba.

1.1.2. Metabolismo

Las bacterias lácticas tienen una capacidad biosintética muy limitada y requieren la presencia de aminoácidos y vitaminas para su crecimiento. La mayor parte de su actividad metabólica es actividad catabólica. Las funciones más importantes a nivel industrial son el metabolismo de la lactosa, el metabolismo del citrato y el metabolismo de las proteínas.

1.1.2.1. Metabolismo de la lactosa

La transformación de la lactosa en ácido láctico que realizan las bacterias lácticas es la reacción metabólica de mayor importancia que sucede en la elaboración de queso.

La adición de fermento a la leche supone una población inicial de aproximadamente 10^7 células/ml, población que se incrementa hasta llegar a concentraciones del orden de 10^9 células/g en el queso. Estas elevadas densidades de población aseguran el rápido metabolismo de la lactosa residual que queda en el queso tras el desuerado, aunque esta fermentación está determinada en gran medida por la temperatura y el procedimiento de salado.

El transporte de la lactosa al interior celular para su metabolismo sucede de forma diferente en los distintos grupos de bacterias lácticas. En los lactococos y lactobacilos mesófilos el transporte se realiza mediante el sistema de la fosfotransferasa (PTS), por el que la lactosa es fosforilada a lactosa-6-fosfato a la vez que ésta atraviesa la membrana. La energía necesaria para este proceso procede del fosfoenolpiruvato (PEP) y en la transformación participan dos enzimas específicas inducibles (EII^{lac} y $EIII^{lac}$) situadas en la membrana celular y una enzima constitutiva y una proteína termostable que se localizan en el citoplasma celular (Dills *et al.*, 1980; Poolman, 1993; Postma *et al.*, 1993). En el interior celular la lactosa-6-fosfato es hidrolizada por la fosfo- β -galactosidasa ($p\beta gal$) a glucosa y galactosa-6-fosfato que se metabolizan por la vía glicolítica y por la ruta de la tagatosa, respectivamente. En los lactococos existen dos bifosfato aldolasas, una específica para la fructosa-1,6-bifosfato (FBP) y otra para la FBP y la tagatosa-1,6-bifosfato (TBP) (Crow y Thomas, 1982). El transporte de la lactosa mediante el sistema de la fosfotransferasa en los lactococos está codificado en plásmidos. El transporte de azúcares en las bacterias lácticas termófilas es más sencillo que en los lactococos. Hutkins y Ponne (1991) sugirieron un sistema antiporte lactosa/galactosa para el transporte de lactosa al interior celular en *S. thermophilus*. Sin embargo, Foucaud y Poolman (1992) y Poolman (1993) sugirieron la existencia de un sistema de intercambio lactosa/galactosa mediante fuerza protomotriz para el transporte de lactosa al interior de la célula. En el citoplasma la lactosa se hidroliza mediante la β -galactosidasa para liberar glucosa, que entra en la vía glicolítica, y galactosa, que es

excretada. En el caso de los *Leuconostoc*s se ha clonado el gen que codifica para el transporte de lactosa en *L. lactis* (lac P) (David, 1992). Este sistema de transporte no tiene homologías con ninguna proteína implicada en el transporte de azúcares, pero sí con las proteínas de transporte de histidina y glutamina de las enterobacteriáceas. En *L. lactis* la lactosa es hidrolizada mediante una β -galactosidasa cuya secuencia de aminoácidos guarda gran similitud con la de otras bacterias lácticas (David, 1992). Probablemente la lactosa sea degradada en *Leuconostoc* spp. mediante la ruta de Leloir.

Según la vía de fermentación de la lactosa las bacterias lácticas se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas (Kandler, 1983). Las bacterias lácticas homofermentativas (lactococos, lactobacilos mesófilos y *S. thermophilus*) metabolizan la lactosa por la vía glicolítica, produciendo 4 moles de lactato a partir de 1 mol de lactosa, o 2 moles de lactato en aquellos casos en los que únicamente se metaboliza la glucosa que forma parte de la lactosa. Las bacterias lácticas heterofermentativas utilizan la vía de la fosfoacetolasa para degradar la lactosa, de forma que se obtienen 2 moles de lactato, etanol y CO₂ por cada mol de lactosa metabolizado.

1.1.2.2. Metabolismo del citrato

El metabolismo del citrato sólo tiene un papel relevante en los fermentos mesófilos, y parece no tener importancia en los termófilos. Los microorganismos responsables del metabolismo del citrato son *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp.

La concentración de citrato en la leche es relativamente baja (alrededor de 8 mM). Sin embargo, es el responsable de características importantes en ciertas variedades de queso, como la formación de ojos debido a la producción de CO₂ o el desarrollo de aromas típicos, principalmente debido a la formación de acetoína y diacetilo.

El citrato es transportado al interior de las células mediante una permeasa y es metabolizado rápidamente con formación de diacetilo y acetoína. El comportamiento de *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp. es diferente en cuanto a la

producción de acetoina y diacetilo. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* produce más cantidad de acetoina que de diacetilo a partir del citrato y, además, lo hace desde el inicio de su fase de crecimiento. Sin embargo, *Leuconostoc* spp. no produce estos compuestos hasta que el pH del medio en el que se desarrolla no es relativamente bajo, nunca a pH neutro. El pH óptimo para el metabolismo de citrato en *L. lactis* es 5,4.

1.2. PROTEOLISIS EN EL QUESO

1.2.1. Proteolisis en la fabricación del queso

La leche de vaca contiene 30-35 g/l de proteína. Alrededor del 80% de estas proteínas se encuentran junto a sustancias inorgánicas, principalmente fosfato cálcico, formando micelas. Entre las proteínas presentes en la leche están las caseínas y las proteínas del suero. Las caseínas pueden ser separadas de las proteínas del suero mediante su sedimentación, su precipitación isoelectrica a pH 4,6 y 20°C o mediante la coagulación de las micelas por el tratamiento de la leche con quimosina.

Las caseínas suponen un 76-86% del total de proteínas de la leche. Según su estructura primaria, en las caseínas bovinas se distinguen cuatro fracciones: caseínas α_{s1} , caseínas α_{s2} , caseínas β y caseínas κ . El resto de las caseínas son productos derivados de la fosforilación, de la glicosilación o de la proteolisis limitada de estas caseínas. Las caseínas α_{s1} poseen básicamente tres regiones hidrofóbicas que incluyen los residuos 1-44, 90-113 y 132-199. Las caseínas α_{s2} son las caseínas más hidrofílicas y poseen más residuos de prolina que el resto de ellas. Las caseínas β son las caseínas más hidrofóbicas y la degradación de su extremo C-terminal da lugar a las caseínas γ . La caseína κ se diferencia de las anteriores en que su solubilidad es independiente de los iones Ca^{2+} .

1.2.1.1. Coagulación de la leche

El proceso de coagulación de la leche para obtener la cuajada puede ser realizado mediante dos mecanismos: la coagulación ácida y la coagulación enzimática.

La coagulación ácida tiene lugar por el ácido láctico producido por las bacterias del fermento o mediante la adición de ácidos orgánicos o inorgánicos a la leche. Otros acidulantes como la δ -gluconolactona también han sido utilizados como acidulante para la fabricación de quesos sin adición de fermentos lácticos (O'Keeffe *et al.*, 1975).

La coagulación de las caseínas de la leche por acidificación comienza a pH 5,3 y se completa cuando el pH alcanza su punto isoeléctrico (pH 4,6). La precipitación a un pH tan bajo determina las características de la cuajada, que es granulosa y poco elástica.

La coagulación enzimática de la leche se realiza mediante la acción del cuajo y es llevada a cabo en dos fases. La fase primaria consiste en la degradación de la caseína κ entre los residuos 105 (Phe) y 106 (Met). Así, la caseína κ que se encuentra en la superficie de las micelas y tiene una función estabilizadora de las mismas, da lugar a la para- κ -caseína y al glicomacropéptido. La para- κ -caseína es un compuesto insoluble, muy hidrofóbico y en presencia de iones divalentes (principalmente de calcio, magnesio, fosfatos y/o citratos) agrega para formar un coágulo. Por el contrario, el glicomacropéptido, que corresponde al fragmento carboxilo terminal de la κ -caseína, es soluble y se pierde en el desuerado del queso.

La fase primaria de la coagulación de la leche fue apuntada en primer lugar por Hammersten a finales del siglo pasado y por Linderstrom-Lang en la década de los 20, pero fue cuando Waugh y von Hippel (1956) aislaron la molécula de κ -caseína cuando se tuvo una visión más completa de todo el proceso. Wake (1959) demostró que durante esta fase de la coagulación se rompía únicamente el enlace Phe(105)-Met(106).

Las cuajadas que se obtienen mediante la coagulación enzimática de la leche son más suaves y elásticas que las que se obtienen por coagulación ácida ya que, en este caso, la coagulación se produce a un pH menos ácido (5,8 - 6,6).

En la fase secundaria las micelas de caseína, que se mantienen en la leche dispersas en forma coloidal mediante la repulsión estérica y electrostática que provoca la carga negativa del extremo carboxilo terminal de la molécula de κ -caseína (Napper, 1983; Walstra, 1990), se desestabilizan. Cuando la repulsión desaparece debido a la

escisión del extremo carboxilo terminal de la κ -caseína, las micelas se desestabilizan, y si la temperatura y la concentración de iones calcio en la leche son adecuadas se inicia el proceso de coagulación. En el coágulo formado quedan atrapados el resto de los componentes de la leche.

La etapa de formación del coágulo es fundamental, ya que si ésta no se completa totalmente la cuajada que se obtendrá no será firme y algunos componentes de la leche como la grasa, las proteínas y ciertos productos de degradación se perderán con el suero.

En la formación del coágulo influyen varios factores entre los que cabe destacar la cantidad y tipo de la enzima coagulante empleada para conseguir la coagulación de la leche, la temperatura, el tiempo de almacenamiento de la leche antes de la coagulación, la concentración de grasa en la leche, el pH alcanzado en la leche durante la coagulación, la cantidad de proteínas del suero presentes en la cuajada y las interacciones de los aminoácidos cercanos al enlace Phe(105)-Met(106) de la κ -caseína que pueden provocar una degradación incompleta de ésta.

1.2.1.2. Coagulantes

Los cuajos utilizados para la coagulación enzimática de la leche son enzimas proteolíticas que actúan degradando las proteínas de forma que éstas se hacen insolubles y precipitan formando un coágulo que contiene el resto de los ingredientes de la leche. La mayoría de las enzimas coagulantes son aspartil-proteinasas con gran actividad a pH bajo.

Desde hace siglos los cuajos de origen animal y vegetal han sido los más empleados en la elaboración de quesos, pero actualmente también se utilizan cuajos de origen fúngico y bacteriano.

El cuajo animal se obtiene principalmente a partir del cuajar de los terneros jóvenes y está formado por quimosina (80%) y pepsina (20%). La quimosina es una aspartil-proteasa que ataca los enlaces Phe-Leu de la κ -caseína de la leche. Recientemente se ha comercializado quimosina producida por cepas de *Escherichia coli*,

Kluyveromyces lactis o *Aspergillus niger* en las que se ha clonado el gen de la quimosina B bovina.

El cuajo vegetal es utilizado en la elaboración de algunas variedades de queso, como es el caso del queso de La Serena que se elabora con extracto de *Cynara cardunculus*. Estos coagulantes pueden ser obtenidos a partir de diversas especies vegetales.

En cuanto a los cuajos microbianos, se ha estudiado la acción de distintos coagulantes obtenidos a partir de diversas especies de hongos y bacterias. Ha sido descrita la acción de una proteasa de *Mucor miehei* capaz de romper los enlaces Phe-Val, Leu-Tyr, Phe-Phe y Phe-Tyr de las caseínas α y β cuando el pH está comprendido entre 5,5 y 7,5. Asimismo, se ha descrito la elevada actividad proteolítica de extractos de *Mucor pusillus* y de *Endothia parasitica* que, en ambos casos, tienen una elevada tendencia a producir sabor amargo en el queso.

1.2.2. Proteolisis en la maduración

La proteolisis es uno de los principales factores que determinan la textura y las características organolépticas del queso madurado.

La correcta degradación de las proteínas de la cuajada, principalmente de las caseínas en aminoácidos y pequeños péptidos, es absolutamente necesaria si se quiere obtener un producto final con características organolépticas adecuadas (Exterkate, 1987; Law, 1982; Thomas y Mills, 1981; Thomas y Pritchard, 1987). Muchos de estos productos de degradación son los responsables directos del sabor y aroma del queso o son precursores de este tipo de compuestos.

Durante la etapa de maduración son varias las enzimas proteolíticas que actúan, como las proteinasas de la leche, el cuajo residual, las enzimas de la flora secundaria del queso y, en mayor proporción, las proteinasas y peptidasas de los fermentos usados en la elaboración del queso.

1.2.2.1. Proteinasas de la leche

La plasmina es la proteínasa mayoritaria que contiene la leche. Esta enzima es una serín-proteasa que se encuentra asociada a las micelas de caseína y que se disocia de éstas cuando el pH disminuye (Richardson y Elston, 1984; Grufferty y Fox, 1988). El pH óptimo de la plasmina está alrededor de 7,5, por lo que su acción es limitada excepto en los quesos cuyo pH aumenta considerablemente durante la maduración.

La plasmina rompe las caseínas atacando principalmente el extremo carboxilo terminal de los residuos de lisina y, en menor medida, de arginina (Weinstein y Doolittle, 1972). Su acción sobre la caseína α_{s1} fue estudiada mediante electroforesis por Eigel (1977) y por Grufferty y Fox (1983). La plasmina no puede degradar la κ caseína (Eigel, 1977), pero sí tiene gran actividad sobre las caseínas β y α_{s2} (Snoeren y van Riel, 1979), siendo la γ caseína el producto de degradación mayoritario.

Otra enzima aislada en la leche es la proteínasa ácida. Esta enzima tiene una especificidad similar a la de la quimosina, su pH óptimo es 4,0 y degrada preferentemente la caseína α_{s1} (Kaminogawa *et al.*, 1980).

1.2.2.2. Cuajo residual

Durante el proceso de coagulación una parte del cuajo, alrededor del 10%, queda retenido en la cuajada. De esta forma, puede participar en las etapas iniciales de la maduración del queso degradando las caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y la para- κ -caseína en aquellos quesos en los que la temperatura de la cuajada durante la elaboración no haya inactivado el cuajo.

La quimosina tiene una acción específica sobre el enlace Phe-Met de la κ -caseína. Sin embargo, a lo largo de la maduración puede atacar otros enlaces peptídicos. Su acción sobre las caseínas durante este periodo se centra, principalmente, en la degradación de la caseína α_{s1} originando péptidos de elevado peso molecular (O'Keeffe *et al.*, 1976; Visser, 1977c). De esta forma es capaz de atacar los enlaces Phe(23)-Phe(24) y Phe(24)-Val(25) de la caseína α_{s1} al comienzo de la maduración

dando lugar al péptido α_{s1} -I. Generalmente, la caseína β no es degradada por la quimosina, posiblemente por la existencia de interacciones hidrofóbicas intermoleculares. Esta fracción caseínica sólo será degradada en algunas ocasiones en etapas tardías de la maduración, y únicamente en ausencia de proteinasas microbianas.

La mayor parte de los cuajos microbianos que se usan en la elaboración de queso tienen, en general, mayor actividad proteolítica en el queso que la quimosina y su acción, al igual que la de ésta, se centra en la degradación de la caseína α_{s1} (Pélissier, 1984).

1.2.2.3. Enzimas de la flora secundaria

La microflora secundaria que se desarrolla en el queso durante la maduración incluye bacterias no integrantes del fermento, así como otros microorganismos que se añaden en la elaboración de determinadas variedades de queso, como son *Propionibacterium*, *Brevibacterium* y mohos del género *Penicillium*.

La flora secundaria presente de forma natural en el queso está formada por microorganismos que resisten a la pasterización de la leche o bien que contaminan la leche tras el tratamiento térmico o la cuajada durante la elaboración del queso. Este grupo está integrado por *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Micrococcus*.

En algunas variedades de queso como Emmental y Gruyère las propionibacterias juegan un papel muy importante, especialmente la especie *P. shermanii*. Estas bacterias, además de intervenir en la fermentación del ácido propiónico, participan en la proteólisis mediante la producción de proteinasas y peptidasas que son las responsables de la liberación de prolina (Langsrud *et al.*, 1977, 1978).

La especie *B. linens* y otras bacterias corineformes son importantes en la maduración de ciertos tipos de queso como Munster, Limburger o Taleggio. Aunque la principal función de estos microorganismos es el catabolismo de los aminoácidos, también desarrollan una actividad proteolítica y peptidásica (Torgensen y Sorhaug, 1978; Sorhaug, 1981; Foissy, 1974, 1978).

Los mohos que se desarrollan en la superficie de los quesos Brie y Camembert, pertenecientes a la especie *P. camemberti*, producen proteinasas extracelulares que participan en la maduración del queso mediante la degradación de las caseínas α_{s1} y β . También han sido descritas actividades carboxipeptidasa y aminopeptidasa (Gripon y Desbest, 1976). El sistema proteolítico extracelular de *P. roqueforti* y *P. camemberti* es similar (Gripon, 1987). Ambos sintetizan una aspartato-proteinasa, una metaloproteinasa, una carboxipeptidasa ácida y una aminopeptidasa alcalina. *P. roqueforti*, además, sintetiza carboxipeptidasas alcalinas. Estos sistemas proteolíticos tienen gran importancia en el desarrollo de las características reológicas y sensoriales de los quesos.

1.3. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE LOS FERMENTOS

La actividad proteolítica de las bacterias lácticas usadas como fermentos en la elaboración de queso no es tan elevada como la de otros grupos de microorganismos, como los géneros *Bacillus*, *Proteus* y *Pseudomonas*. Sin embargo, su sistema proteolítico es muy variado y está formado por proteinasas y peptidasas extracelulares (ligadas a la pared o a la membrana celular) e intracelulares, capaces de degradar completamente las caseínas a aminoácidos (Mou *et al.*, 1975).

La acción de estas enzimas va a venir determinada, en gran medida, por su localización celular. En el queso, parte de las células de los fermentos no se lisan (Umamoto *et al.*, 1978), probablemente debido a la presión osmótica del medio en el que se hallan. Además, el hecho de que la matriz de caseína sea bastante compacta hace que la liberación al medio del contenido celular de las células lisadas sea limitado (Thomas y Pritchard, 1987).

Estudios realizados por diversos autores (Gripon *et al.*, 1975; Kleter, 1976; O'Keeffe *et al.*, 1976, 1978; Visser, 1977c; Visser y Groot-Mostert, 1977) en distintas variedades de queso indican que es el sistema proteolítico de las bacterias lácticas el principal responsable de la obtención de pequeños péptidos y aminoácidos a partir de las caseínas de la leche.

La actuación del sistema proteolítico comienza por la acción de las proteinasas extracelulares sobre las caseínas de la leche y sobre los productos derivados de la acción del cuajo y las proteinasas de la leche sobre las caseínas. A continuación, los productos originados por las proteinasas extracelulares son degradados por las peptidasas que liberan péptidos pequeños y aminoácidos. Estos productos son transportados al interior de la célula donde se terminan de degradar por las peptidasas intracelulares y las enzimas responsables del catabolismo de los aminoácidos.

1.3.1. Proteinasas

Las proteinasas de los fermentos lácticos son las encargadas de catalizar la hidrólisis de las proteínas de la leche, resultando fundamentales para el desarrollo de estos microorganismos en la leche debido a sus requerimientos nutricionales (Reiter y Oram, 1962; Law *et al.*, 1976a; Bracquart y Lorient, 1979; Morishita *et al.*, 1981).

La contribución de las proteinasas de las bacterias lácticas a la degradación de las caseínas para originar péptidos de gran tamaño es, cuantitativamente, minoritaria respecto a la contribución de otras proteinasas presentes en leche y queso.

Proteinasas de *Lactococcus*

La mayoría de los estudios sobre las proteinasas de las bacterias lácticas han sido realizados en lactococos.

La localización de las proteinasas de diferentes cepas de *L. lactis* estudiadas es, mayoritariamente, extracelular, aunque también se ha descrito la existencia de proteinasas intracelulares (Desmazeaud y Zevaco, 1976; Ichishima *et al.*, 1986; Law y Kolstad, 1983; Muset *et al.*, 1989; Ohmiya y Sato, 1975).

Las proteinasas extracelulares de los lactococos, denominadas **Prtp**, son estables en presencia de iones calcio (Exterkate y de Veer, 1987b; Laan y Konings, 1989; Laan, 1991). La ausencia de iones calcio provoca la liberación de estas enzimas de las células.

En los últimos años han sido purificadas y caracterizadas diversas proteinasas de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y de *L. lactis* subsp. *cremoris*. (Geis *et al.*, 1985; Exterkate y de Veer, 1987b; Monnet *et al.*, 1987a,b; Bockelmann *et al.*, 1989; Exterkate y de Veer, 1989). Tras la purificación se han obtenido distintas formas activas. Para la obtención de la forma activa de las proteinasas han sido propuestos varios mecanismos. Laan y Konings (1989) propusieron la existencia de un proceso de autocatálisis al tiempo que el producto era liberado de la célula, mientras que otros autores postularon la ruptura autocatalítica de la enzima ya liberada (Exterkate y de Veer, 1989; Haandrikman, 1990; de Vos *et al.*, 1991; Laan y Konings, 1991).

Se ha observado que estas enzimas son serina-proteinasas que tienen un pH óptimo alrededor de 6,0 y su actividad parece depender de la concentración de calcio y de la temperatura.

Las secuencias de las proteinasas de *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 (Kok *et al.*, 1988) y SK11 (Vos *et al.*, 1989) son conocidas, al igual que sucede con la proteinasa de la cepa NCDO 763 de la especie *L. lactis* subsp. *lactis* (Kiwaki *et al.*, 1989). De estos estudios se deduce que las secuencias primarias de las proteinasas de las cepas SK11 y Wg2 son idénticas en un 98% y las de las cepas Wg2 y NCDO 763 son similares en más de un 99%. Estas tres proteinasas se sintetizan como pre-pro-proteínas y sus secuencias señal son idénticas (de Vos *et al.*, 1989). La secuencia señal es escindida durante el transporte de la proteinasa a través de la membrana y la pro-proteína sufre, posteriormente, un proceso de maduración para dar lugar a la proteína activa. Este proceso de maduración de la pro-proteinasa está dirigido por una lipoproteína de la membrana celular (Prt M). El gen que codifica para la proteína de maduración está localizado junto al gen estructural de la proteinasa y el marco de lectura de ambos genes tiene sentido opuesto.

En las proteinasas maduras se distinguen tres dominios bien diferenciados que son el carboxilo terminal por el que la enzima está anclada en la membrana, el amino terminal, y el dominio central.

A pesar de la similitud estructural de las proteinasas su acción sobre las caseínas es diferente. Basándose en la actividad de las proteinasas de distintas cepas de *L. lactis*

(Visser *et al.*, 1986), se distinguieron dos tipos de actividad enzimática, que siguiendo la denominación dada por Exterkate (1976) fueron designadas como proteinasa tipo P_I y proteinasa tipo P_{III}. Ambas actuaban sobre la caseína β preferentemente, aunque con distinta especificidad. Además, las caseínas α_{s1} y κ son sustratos mejores para la proteinasa tipo P_{III} que para la proteinasa tipo P_I.

Visser *et al.* (1986) observaron que algunas cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* presentaban un solo tipo de proteinasa en su envuelta celular (tipo P_I en las cepas HP, TR, C13 Y Wg2 y tipo P_{III} en las cepas AM2 y SK11), mientras que en otros casos se presentaban proteinasas con ambos tipos de especificidad, como era el caso de las cepas FD27 y E8. Mediante electroforesis en geles de almidón y poliacrilamida se vio que los productos obtenidos tras la acción de la proteinasa tipo P_I sobre la caseína β (Visser *et al.*, 1986, 1988) eran similares a los obtenidos mediante la acción de la quimosina (Visser y Slangen, 1977), lo que parece indicar que la degradación de la región carboxilo terminal de la caseína β por ambas enzimas produce péptidos similares (Visser, 1993). Sin embargo, la proteinasa tipo P_{III} cuando actúa sobre la β caseína origina fragmentos con movilidad electroforética semejante a la γ caseína obtenida cuando la caseína β es degradada por la plasmina (Visser *et al.*, 1991). Los patrones de degradación obtenidos después de la hidrólisis de la caseína β por las proteinasas de las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 377, NCDO 606 y NCDO 763 (Monnet *et al.*, 1987b) sugieren la existencia de ambos tipos de actividades en la misma cepa. También se ha detectado la existencia de ambos tipos de especificidad en una proteinasa aislada de la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* UC 317 (Law *et al.*, 1992b).

Se ha estudiado la especificidad de sustrato de varias proteinasas de la envuelta celular (Monnet *et al.*, 1986, 1989; Reid *et al.*, 1991b; Visser *et al.*, 1988; Visser *et al.*, 1991) y se ha observado que, frecuentemente, los residuos de glutámico, glutamina, serina y algunos residuos hidrofóbicos como la leucina forman parte del enlace peptídico susceptible a su acción.

La aparición de variantes negativas (Prt⁻) en cultivos de lactococos con capacidad proteolítica (Prt⁺) es bastante frecuente (Harriman y Hammer, 1931; Garvie y Mabbitt, 1956; Citti *et al.*, 1965; Westhoff *et al.*, 1971). Estos mutantes también pierden parcialmente su capacidad para producir ácido y no pueden crecer bien en leche, de

forma que no alcanzan las densidades celulares necesarias para que la fermentación sea adecuada. El hecho de que esta pérdida fuera irreversible y de que la frecuencia de la mutación aumentara cuando las células era tratadas con bromuro de etidio, acridina o sometiendo las células a temperaturas elevadas hizo pensar en que el proceso estuviera ligado a la presencia de un plásmido (Davies y Gasson, 1981; McKay, 1983).

Diversos estudios de transferencia de genes vía transducción, conjugación, transformación de protoplastos y electrotransformación han llevado a localizar la actividad proteolítica de diversas cepas de lactococos en plásmidos. El tamaño de los plásmidos implicados en el fenotipo Prt⁺ en las cepas estudiadas oscila entre 13,5 y 100 Kb.

Además, en muchos casos, se ha observado que los genes responsables de la actividad proteolítica y acidificante están localizados en el mismo plásmido (Gasson y Davies, 1984; Kiwaki *et al.*, 1989; Kuhl *et al.*, 1979; Kempler y McKay, 1979; Yu *et al.*, 1989).

Mediante el desarrollo de vectores de clonación y técnicas de manipulación genética (Kondo y McKay, 1984; Kok *et al.*, 1984; Wright *et al.*, 1985; Gasson y Anderson, 1985; Simon *et al.*, 1986) se ha podido conocer la localización de los genes de las proteinasas de diversos lactococos. Del estudio de los mapas de restricción de los genes de las proteinasas de las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 712 y NCDO 763, y de las cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 y SK11 se deduce que estos genes están altamente conservados (Kok y Venema, 1988; de Vos, 1987; Kiwaki *et al.*, 1989). Por tanto, parece que el gen de la proteinasa de la pared celular de los lactococos ha sufrido pocas modificaciones a lo largo de la evolución.

A partir de los estudios de las secuencias nucleotídicas de diversas proteinasas realizados por varios autores (Kok *et al.*, 1988; Kiwaki *et al.*, 1989; Vos *et al.*, 1989) se ha observado la existencia de homología entre las proteinasas de los lactococos y las serín-proteinasa de la familia de las subtilisinas (Kok, 1990).

Estos mismos estudios han desvelado la existencia de secuencias reguladoras que flanquean los genes de la proteinasa estrechamente relacionadas con los descritos

en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (de Vos, 1987; Van der Vossen *et al.*, 1987). También, y al igual que las subtilisinas, las proteinasas de los lactococos son sintetizadas como pre-pro-proteínas y, por tanto, presentan una secuencia típica que corresponde al péptido señal en el extremo amino terminal de la proteína.

La principal diferencia entre las subtilisinas y las proteinasas de los lactococos es que, mientras las primeras son excretadas al medio por las células que las producen, en los lactococos las proteinasas permanecen unidas a la envuelta celular.

Proteinassas de *Lactobacillus*

Aunque la mayoría de los estudios realizados sobre la actividad proteolítica de las bacterias lácticas se ha centrado principalmente en el género *Lactococcus*, existen investigaciones que describen la existencia de enzimas proteolíticas en el género *Lactobacillus*.

Se ha detectado actividad proteolítica en *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus* y *L. plantarum* (Argylle *et al.*, 1979; Ezzat *et al.*, 1985, 1987; El Soda *et al.*, 1986; Zevaco y Grippon, 1988).

Zevaco y Grippon (1988) aislaron y caracterizaron una enzima proteolítica perteneciente a la especie *L. helveticus*. Esta enzima resultó ser una serina-proteinasa que podía liberarse de las células mediante lavados con tampón en ausencia de calcio, al igual que las proteinasas de los lactococos, tenía un pH óptimo de 7,5-8,0 y mostraba una amplia especificidad, siendo capaz de degradar las caseínas α_{s1} y β .

Proteinassas de *Leuconostoc*

No se han descrito enzimas proteolíticas en el género *Leuconostoc*. La ausencia de estas enzimas es una de las causas que limitan el crecimiento en leche de estos microorganismos. La inclusión del plásmido responsable de la actividad proteolítica de lactococos en células de leuconostocs mediante conjugación provocó la aparición de una actividad proteolítica débil en éstas (Kok, 1990). Estos experimentos llevaron a pensar que la expresión del gen responsable de la actividad proteolítica en células de

Leuconostoc era inferior a lo normal, o que la utilización de los productos de la proteólisis era escasa.

1.3.2. Peptidasas

Las peptidasas intracelulares y extracelulares son las responsables de la degradación de los péptidos originados por la acción de las proteinasas, y juegan un importante papel en la hidrólisis de péptidos amargos y en la liberación de aminoácidos y péptidos pequeños precursores de los compuestos responsables del sabor y el aroma del queso.

La mayor parte de las peptidasas de los lactococos son metaloenzimas y algunas de ellas son inhibidas por agentes bloqueantes del grupo sulfhidrilo, por lo que parece que estos grupos están implicados en la actividad o en la integridad estructural de la enzima (Visser, 1993).

Existen estudios de diversos autores que apuntan la existencia de peptidasas extracelulares (Law, 1977, 1979; Exterkate, 1984; Geis *et al.*, 1985; Kolstad y Law, 1985), aunque Poolman *et al.* (1995) sugieren la localización intracelular de estas enzimas, pese a que algunas de ellas se han encontrado asociadas a las fracciones de membrana. Otras enzimas de típica localización intracelular como la β -galactosidasa (Foucaud y Poolman, 1992) y la enzima maloláctica (Poolman *et al.*, 1991) también se han detectado asociadas a la fracción de membrana.

Endopeptidasas

Yan *et al.* (1987a,b) aislaron y caracterizaron dos endopeptidasas de lactococos que denominaron LEPI y LEPII. La endopeptidasa LEPI, monomérica, tenía un peso molecular de 98 kDa. La endopeptidasa LEPII, sin embargo, constaba de dos monómeros idénticos y tenía un peso molecular de 80 kDa. Ambas endopeptidasas, a diferencia de las proteinasas P_I y P_{III}, no pueden degradar las caseínas.

La endopeptidasa LEPI actúa sobre el fragmento (1-23) de la caseína α_{s1} , atacando únicamente el enlace Glu(18)-Asn(19). Por el contrario, la endopeptidasa

LEPII actúa sobre este sustrato con una especificidad más amplia, pudiendo atacar los enlaces Gln(9)-Gly(10), Gln(13)-Glu(14) y Leu(20)-Leu(21). En queso Gouda se han encontrado los péptidos correspondientes al fragmento (1-9) y (1-13) de la caseína α_{s1} (Kaminogawa *et al.*, 1986). Estos péptidos se forman, probablemente, por la acción de la endopeptidasa LEPII. Sin embargo, estos mismos fragmentos podrían escindirse por la acción de la proteinasa P₁ sobre la caseína α_{s1} (Exterkate *et al.*, 1991).

Según los estudios realizados por Yan *et al.* (1987a,b) la endopeptidasa LEPI está asociada a la pared celular, mientras que la LEPII es intracelular.

Un tercer tipo de endopeptidasa, denominada LEPIII, fue descrita por Tan *et al.* (1991) en *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2.

La endopeptidasa LEPI no puede hidrolizar péptidos muy pequeños (menos de 5 residuos) ni muy grandes (más de 25 residuos). Las endopeptidasas LEPII y LEPIII, sin embargo, tienen una especificidad más amplia y pueden hidrolizar sustratos de distintos tamaños.

Baankreis (1992) aisló y caracterizó otras endopeptidasas intracelulares en lactococos. Una de ellas mostraba una especificidad frente al fragmento (1-23) de la caseína α_{s1} diferente a la de las endopeptidasas LEPI y LEPII, mientras que otra tenía un comportamiento similar a la LEPI y degradaba específicamente el enlace Glu(18)-Asn(19) del fragmento (1-23) de la caseína α_{s1} .

Pritchard *et al.* (1994) aislaron una endopeptidasa de *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11. La enzima purificada era una metalopeptidasa monomérica de 70 kDa, que catalizaba la hidrólisis de enlaces peptídicos en los que el residuo correspondiente al extremo carboxilo terminal era un aminoácido hidrofóbico (generalmente fenilalanina o leucina). La especificidad era, por tanto, similar a la de la termolisina. Esta endopeptidasa era, además, capaz de hidrolizar dos oligopéptidos que se originan en las primeras etapas de la digestión de la caseína β por la acción de las proteinasas de la pared celular y se localizaba en el citoplasma celular.

Exopeptidasas

Existen numerosos estudios en los que se han aislado y caracterizado exopeptidasas de bacterias lácticas.

Aminopeptidasas

Las aminopeptidasas son las peptidasas mejor estudiadas debido, probablemente, a su fácil detección por medio de sustratos cromogénicos. Se han aislado y caracterizado 4 tipos de aminopeptidasas diferentes según sus características bioquímicas y genéticas: la aminopeptidasa N (PepN), la aminopeptidasa A (PepA), la aminopeptidasa C (PepC) y la pirrolidonil-carboxilil-peptidasa (PCP).

La **aminopeptidasa N (PepN)** es una aminopeptidasa con amplia especificidad de sustrato que ha sido encontrada en numerosas cepas de bacterias lácticas. Exterkate (1984) describió una lisil-aminopeptidasa con amplia especificidad en *L. lactis* HP. Posteriormente, esta misma actividad fue encontrada en otras cepas del género *Lactococcus* como la cepa AC1, y fue purificada en las cepas HP y Wg2 (Geis *et al.*, 1985; Tan y Konings, 1990; Baankreis, 1992). La aminopeptidasa N aislada de *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 es una metaloenzima monomérica con un peso molecular de 95 kDa, con temperatura óptima de 40°C y pH óptimo de 7,0 (Tan y Konings, 1990). Esta enzima posee amplia especificidad de sustrato y puede degradar dipéptidos, tripéptidos y algunos péptidos grandes, pero no tiene actividad endopeptidásica ni carboxipeptidásica. Tiene una gran actividad frente a *Lys-pNA* y *Leu-pNA*. Sus características son similares a las de la aminopeptidasa de *L. lactis* subsp. *diacetylactis* aislada por Desmazeaud y Zevaco (1979). El gen de esta aminopeptidasa fue clonado en *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (Van Alan-Boerrigter *et al.*, 1991) y Wg2 (Stroman, 1992).

La **aminopeptidasa A (PepA)** es una glutaril-aminopeptidasa que fue purificada por Exterkate y de Veer (1987a) a partir de *L. lactis* subsp. *cremoris* HP. Esta enzima parece estar ligada a membrana y es específica para los residuos de glutámico y aspártico. Una peptidasa con características similares fue aislada por Niven (1991) de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 712. La PepA de *L. lactis* es una metalopeptidasa trimérica de

130 kDa, formada por tres subunidades idénticas de 42 kDa, aunque Baankreis (1992) halló multímeros de 420-520 kDa.

La **aminopeptidasa C (PepC)** fue aislada por Neviani *et al.* (1989) de *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2. Esta enzima es una cisteín-aminopeptidasa general con gran actividad frente a L-histidil-fenilalanina- β -naftilamida, formada por seis subunidades idénticas de 50 kDa. Tiene su actividad óptima a 40°C y pH 7. Hidroliza dipéptidos, tripéptidos y sustratos del tipo (X-)Y- β -NA, siempre que ninguno de los aminoácidos sea prolina. La actividad es mayor cuando los sustratos son péptidos de cadena corta. Esta aminopeptidasa no posee actividad carboxipeptidásica ni endopeptidásica. El gen de esta actividad enzimática fue secuenciado y clonado por Chapot-Chartier *et al.* (1993).

La **pirrolidonil-carboxilil-peptidasa (PCP)** es una aminopeptidasa muy específica presente en los lactococos que escinde los residuos de piroglutámico del extremo amino terminal. Esta enzima fue aislada y purificada parcialmente por Exterkate (1977) y Baankreis (1992). Los estudios realizados parecen indicar que es un dímero de 80 kDa y de localización intracelular.

Peptidasas específicas de prolina

Las caseínas son proteínas ricas en residuos de prolina. La degradación de los oligopéptidos ricos en prolina originados por la acción de las proteinasas sobre las caseínas requiere la presencia de enzimas específicas en las bacterias lácticas, ya que ni las aminopeptidasas generales ni las di- y tripeptidasas pueden hidrolizar los péptidos con prolina. Se ha descrito la existencia en bacterias lácticas de enzimas implicadas en la degradación de péptidos con prolina como la aminopeptidasa P (PepP), prolina iminopeptidasa (PIP), iminodipeptidasa (prolinasa), imidodipeptidasa (prolidasa) (PRD) y X-prolil-dipeptidil aminopeptidasa (PepX) (Mou *et al.*, 1975; Kaminogawa *et al.*, 1984a,b; Casey y Meyer, 1985; Hickey *et al.*, 1983; Meyer y Jordi, 1987; Kiefer-Partsch *et al.*, 1989; Zevaco *et al.*, 1990; Atlan *et al.*, 1990; Khalid y Marth, 1990; Baankreis y Exterkate, 1991).

La **prolidasa (PRD)** (prolina dipeptidasa o imidodipeptidasa) fue la primera enzima específica de prolina que fue purificada (Kaminogawa *et al.*, 1984a). La enzima

aislada de *L. lactis* subsp. *cremoris* H61 es específica de dipéptidos del tipo X-Pro y no puede hidrolizar otros péptidos ni carbobenzoxipéptidos. Su actividad óptima tiene lugar a pH 6,5-7,5 y 40°C. Booth *et al.* (1990b) aislaron y purificaron otra prolidasa de *Lactococcus lactis* AM2. En este caso la prolidasa mostró una actividad óptima a pH alcalino (7,4-9,0) y era capaz de hidrolizar, además de dipéptidos tipo X-Pro (excepto Gly-Pro), otros dipéptidos y tripéptidos que no contenían prolina. Sin embargo, no se observó hidrólisis cuando la prolina ocupaba la posición central en el tripéptido.

Baankreis y Exterkate (1991) aislaron una **prolina iminopeptidasa (PIP)** citoplásmica de *L. lactis* HP. El peso molecular de la enzima era de 110 kDa y tenía su actividad óptima a pH 8,5 y 37°C. Esta enzima hidrolizaba dipéptidos y tripéptidos que tenían prolina en la posición amino terminal, pero no podía hidrolizar enlaces peptídicos del tipo X-Pro ni péptidos de más de cuatro residuos aminoacídicos.

La actividad **X-prolil dipeptidil aminopeptidasa (X-PDAP o PepXP)** ha sido descrita en *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *S. thermophilus* (Meyer y Jordi, 1987; Kiefer-Partsch *et al.*, 1989; Zevaco *et al.*, 1990; Atlan *et al.*, 1990; Khalid y Marth, 1990; Booth *et al.*, 1990a; Bockelmann *et al.*, 1991). Todas estas enzimas tienen propiedades similares, y pierden la actividad cuando son tratadas con inhibidores de las serín proteasas. El pH óptimo varía entre 6,5 y 8,0, y la temperatura óptima oscila entre los 45 y los 50°C. Estas enzimas degradan de forma específica los péptidos del tipo X-Pro-Y (X e Y puede ser cualquier aminoácido), y su velocidad de hidrólisis depende del tipo de aminoácidos que rodeen a la prolina. Se ha detectado una pequeña actividad frente a Ala-Ala-pNA, pero no se ha observado que tenga actividad aminopeptidasa. Los pesos moleculares oscilan entre los 72 kDa de la enzima aislada de *L. helveticus* CNRZ 32 y los 117 kDa de la aislada de *L. lactis* AM2 en el caso de las enzimas monoméricas. Los genes estructurales de dos cepas de *Lactococcus* han sido secuenciados y clonados (Mayo *et al.*, 1991; Nardi *et al.*, 1991).

Dipeptidasas (PepD)

Se han purificado y caracterizado dos tipos de dipeptidasas de amplia especificidad de sustrato (Hwang *et al.*, 1981, 1982; Van Boven *et al.*, 1988).

Hwang *et al.* (1981) purificaron una dipeptidasa a partir de un extracto libre de células de *L. lactis* H61. Esta actividad era una metaloenzima con un peso molecular de 100 kDa y un pH óptimo de 8,0. Se observó que tenía actividad frente a varios dipéptidos, pero esta actividad era escasa o nula cuando el extremo amino terminal del dipéptido estaba ocupado por prolina o glicina. Tampoco pudo observarse actividad frente a tripeptidos o carboxipeptidos.

Una dipeptidasa diferente fue purificada a partir de un extracto libre de células de *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 (Van Boven *et al.*, 1988). Esta enzima, con peso molecular de 49 kDa, era una metalopeptidasa con actividad óptima a pH 8,0 y 50°C. La enzima hidrolizaba el dipéptido Leu-Leu y otros dipéptidos con aminoácidos hidrofóbicos o neutros en el extremo amino terminal. Sin embargo, no hidrolizaba dipéptidos con prolina, histidina, glicina o glutámico en el extremo N-terminal.

Las actividades dipeptidásicas están bastante distribuidas entre las bacterias lácticas, como demuestra la detección de dipeptidasas con amplia especificidad de sustrato en diversas cepas (Kaminogawa *et al.*, 1984b; Kolstad y Law, 1985; Rabier y Desmazeaud, 1973; Desmazeaud y Zevaco, 1977; El Soda *et al.*, 1978a,b; Sorhaug y Solberg, 1973; Abo-Elnaga y Plapp, 1987).

Tripeptidasas (PepT, TRP)

Se ha descrito la existencia de actividad tripeptidásica en distintas bacterias lácticas (Mou *et al.*, 1975; Law, 1979; Desmazeaud y Zevaco, 1979; Baankreis y Exterkate, 1991; Abo-Elnaga y Plapp, 1987). En los lactococos es frecuente la existencia de una tripeptidasa de especificidad amplia. Baankreis y Exterkate (1991) describieron en *L. lactis* HP una tripeptidasa específica de prolina cuyas características diferían de las de la tripeptidasa APII de *L. lactis* CNRZ 267 y de la tripeptidasa descrita en *L. lactis* Wg2 (Desmazeaud y Zevaco, 1979). La tripeptidasa de *L. lactis* Wg2, un dímero de 105 kDa, tenía su actividad óptima a pH 7,0 y 55°C y no podía hidrolizar dipéptidos ni oligopéptidos.

Carboxipeptidasas

Ha sido descrita actividad carboxipeptidasa en *S. thermophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. helveticus* y *L. bulgaricus* (Hickey *et al.*, 1983; El Soda y Desmazeaud, 1981; Cliffe y Law, 1979; Eggiman y Bachman, 1980; El Soda *et al.*, 1978a,b), pero no se ha encontrado este tipo de actividad en lactococos.

1.4. SABOR AMARGO EN EL QUESO

La proteólisis que tiene lugar durante la elaboración y la maduración del queso puede dar lugar a la formación de péptidos amargos a partir de los fragmentos hidrofóbicos de las caseínas.

El sabor amargo es un defecto que aparece con cierta frecuencia en queso y que tiene graves consecuencias económicas. Ha sido detectado en queso Gouda (Visser *et al.*, 1983b), queso Cheddar (Emmons *et al.*, 1962a; Richardson y Creamer, 1973; Hamilton *et al.*, 1974; Crawford, 1977; Champion y Stanley, 1982; Edwards y Kosikowski, 1983), en queso Camembert (Pélissier *et al.*, 1974), en quesos suizos (Guigoz y Solms, 1974), en quesos japoneses (Kaneko y Yoneda, 1974) y en Gorgonzola (Delformo y Parpani, 1986), entre otros.

La producción de péptidos amargos no siempre puede considerarse un defecto. Un cierto sabor amargo puede ser uno de los componentes de la calidad de sabor del queso (Shinoda *et al.*, 1986b). Sin embargo, una elevada concentración de péptidos amargos puede dar lugar a la aparición de quesos inaceptables por su intenso amargor (Visser *et al.*, 1983b). La detección del sabor amargo se produce cuando la concentración de péptidos amargos en el queso supera el nivel umbral de detección, por lo que el amargor vendrá determinado, finalmente, por la tasa de formación y degradación de estos péptidos (Jago, 1974). El umbral de detección del amargor aumenta con el tiempo de maduración, debido a la aparición de otros componentes del sabor a lo largo de este proceso (Creamer, 1979).

Los péptidos amargos tienen unas propiedades químicas especiales que hacen que éstos puedan interaccionar con las papilas gustativas que se hallan al final de la

cavidad bucal (en la parte posterior de la lengua), y que se perciba la sensación de amargor. Para que una sustancia sea amarga debe ser soluble en agua, siendo la temperatura óptima de detección del sabor amargo 10°C. La respuesta al sabor amargo es pequeña, pero la persistencia de la sensación de amargor después de recibir el estímulo sugiere que la unión de las moléculas amargas al receptor tiene una duración mayor que la unión de los azúcares a su correspondiente receptor.

La fracción del queso soluble en agua es la que tiene una mayor contribución en la intensidad de sabor (McGugan *et al.*, 1979). Es en esta fracción donde el amargor es más intenso.

El sabor amargo fue atribuido por Biede y Hammond (1979) a la existencia de péptidos de tamaño medio (entre 3 y 6 aminoácidos) resultantes de la digestión enzimática de las caseínas. Las proteinasas de los fermentos originan péptidos amargos mediante su acción fundamentalmente sobre β -caseína, mientras que la quimosina puede producir péptidos amargos a partir de todos los componentes de la caseína (Exterkate, 1983).

La actividad proteolítica de los fermentos puede producir amargor al originarse péptidos de pequeño tamaño (alrededor de 1.400 Da) con grupos hidrofóbicos en el extremo C terminal de la cadena (Matoba y Hata, 1972) a partir de las caseínas. El amargor de los péptidos causado por la hidrofobicidad de su secuencia de aminoácidos se puede predecir siguiendo la ley de Ney (1971, 1979), o hipótesis Q, una relación semicuantitativa entre la composición de aminoácidos de un péptido y su amargor.

Los péptidos amargos se originan en primer lugar a partir de las caseínas mediante la acción del cuajo y de las proteinasas de los cultivos iniciadores. Los péptidos originados de esta forma son muy grandes para provocar el sabor amargo (Sullivan y Jago, 1972; Sullivan *et al.*, 1973), por lo que las peptidasas bacterianas encargadas de degradar estos péptidos van a tener gran importancia en la aparición del defecto de amargor.

El extremo C terminal de la caseína β es muy amargo (Visser *et al.*, 1983b; Shinoda *et al.*, 1986b) y parece que es el principal responsable de la aparición de

péptidos amargos en queso Gouda (Visser *et al.*, 1983b,c). Sullivan y Jago (1972) sugirieron la degradación de la caseína β como la fuente principal de aparición de sabor amargo en productos lácteos, al observar que las cepas que provocaban amargor en el queso degradaban la caseína β a una velocidad mayor que las cepas que no originaban este defecto. La incidencia del defecto de sabor amargo en quesos de leche de cabra y oveja es menor que en los de leche de vaca. La leche de vaca tiene una mayor proporción de caseína α_{s1} , y los hidrolizados de ésta son más amargos que los de la caseína β . Esto llevó a Pélissier y Manchon (1976) a sugerir que cuanto menor era la cantidad de caseína α_{s1} , menor era el amargor que se producía en el queso.

Para estudiar el papel que juegan los fermentos lácticos en el desarrollo del sabor amargo en el queso se han utilizado técnicas de fabricación de queso en condiciones asépticas. Estos experimentos se han realizado con adición de δ -gluconolactona (Visser, 1977a; Stadhouders *et al.*, 1983) como sustituto del fermento en la elaboración del queso de las variedades Gouda y Cheddar. Estudios realizados por Visser (1977b,c,d) y por Visser y Groot-Mostert (1977) demostraron que tanto el cuajo como los fermentos amargantes podían dar lugar a quesos amargos de forma independiente.

1.4.1. Factores que influyen en el desarrollo del sabor amargo

Existen varios factores que influyen en la aparición de defectos de sabor amargo en el queso. Entre estos factores cabe destacar los que se citan a continuación.

Calidad de la leche

La calidad de la leche es uno de los factores que determinan la calidad de los productos lácteos derivados de ésta (White *et al.*, 1978).

La alimentación del ganado es fundamental para la calidad de la leche. Bassete *et al.* (1986) observaron que cuando las vacas ingerían remolacha o nabos la leche que producían tenía sabor amargo. Igual sucedía tras la ingestión de determinado tipo de herbáceas como *Helenium amarum*.

Por otra parte, se recomienda no utilizar leche con capacidad de coagulación baja para la fabricación de queso, ya que el rendimiento es pequeño y origina quesos con gran contenido en agua y sabor amargo.

La leche producida en las glándulas mamarias es un producto estéril, pero en la ubre puede ser contaminada por diversos microorganismos. Esta contaminación microbiana puede causar la aparición de sabor amargo en cualquiera de las fases de producción o tratamiento de la leche (Bassette *et al.*, 1986).

Enzimas presentes en la leche

Las bacterias psicrótrofas presentes en la leche cruda, y capaces de desarrollarse a temperaturas de refrigeración pueden producir diversas enzimas proteolíticas y lipolíticas. Existen diversos estudios que demuestran la aparición de sabor amargo debida a la degradación de las caseínas por este tipo de bacterias durante su crecimiento en leche (Gebre-Egziabher *et al.*, 1980; Richardson y Newstead, 1979; Dousset *et al.*, 1988). Además, las enzimas proteolíticas y lipolíticas de las bacterias psicrótrofas generalmente resisten los tratamientos térmicos a los que es sometida la leche durante la pasteurización y el procesamiento mediante UHT, provocando el desarrollo de sabor amargo (Dousset *et al.*, 1988; Shipe *et al.*, 1978).

También la proteínasa alcalina de la leche puede hidrolizar las caseínas y dar lugar a la aparición del sabor amargo tanto en la leche como en productos lácteos (White y Marshall, 1973; Richardson y Newstead, 1979; Visser, 1981; Torrie *et al.*, 1983; Dousset *et al.*, 1988).

La lipasa de la leche también puede dar lugar al desarrollo de amargor. La lipasa ataca los triglicéridos de la leche liberando ácidos grasos libres y mono- y diglicéridos que son los responsables del sabor amargo que acompaña algunas veces al proceso lipolítico (Choisy *et al.*, 1984; Bassette *et al.*, 1986).

En numerosos trabajos se ha asociado la aparición de sabor amargo en queso a períodos prolongados de almacenamiento en frío de la leche previos a la elaboración del producto, originado por la presencia de niveles altos de bacterias psicrótrofas en la

leche (Kalogridou-Vassiliadou y Alichanidis, 1984; Chapman *et al.*, 1976; Law *et al.*, 1976b; Hicks *et al.*, 1986).

Tratamiento y pH de la leche

La aparición de sabor amargo en quesos elaborados con leche pasteurizada fue ya observada por Moir en 1930. El sabor amargo era más acusado cuanto mayor era la temperatura de pasteurización, debido a una mayor retención de cuajo en el queso.

También se observó la presencia de sabor amargo en queso Cheddar y Gouda (Stadhouders y Hup, 1975) elaborados con leche de pH bajo (6,25). Creamer *et al.* (1985) comprobaron que durante la maduración de queso Cheddar fabricado con leche de pH bajo la degradación de α_{s1} -caseína era intensa y el amargor era mayor.

Contenido en grasa

La elaboración de queso Cheddar con bajo contenido en grasa provoca la aparición de defectos de sabor como la acidez y el amargor (Deane y Dolan, 1973). Por otra parte, en quesos italianos se ha descrito la aparición de amargor cuando el contenido en grasa de la leche de partida es elevado (Delformo y Parpani, 1986).

Fermentos lácticos

Hansen *et al.* (1933) habían observado cómo la elaboración de queso a partir de leche cruda o pasteurizada con adición de *S. paracitrovorus* (actualmente *L. lactis* subsp. *cremoris*) daba lugar a quesos muy amargos y con textura abierta. Existen numerosos estudios que relacionan la elaboración de queso con determinados fermentos y el crecimiento de éstos durante la maduración con la aparición de sabor amargo en el producto final (Deane, 1951; Yates *et al.*, 1955; Tittsler *et al.*, 1948; Perry y McGillivray, 1964; Reiter *et al.*, 1967; Martley y Lawrence, 1972; Lowrie *et al.*, 1974). Según Lawrence y Gilles (1969), el principal factor que determinaba la aparición de sabor amargo en el queso era el fermento utilizado.

Durante muchos años los lactococos de los fermentos han sido clasificados como amargantes y no amargantes, según su capacidad para provocar la aparición de sabor amargo en queso Cheddar (Emmons *et al.*, 1962a; Lawrence y Gilles, 1969). Klimovsky *et al.* (1970) propusieron dos métodos sencillos de detección de cepas productoras de sabor amargo. El primero de los métodos evaluaba el sabor de cuajadas elaboradas con leche desnatada y cuajo incubadas durante 24 horas y 7 días a 26°C con las cepas objeto de estudio. El segundo método se basaba en la capacidad de las bacterias lácticas para originar péptidos de forma rápida y glutamato de forma lenta en leche tras la adición del cuajo. Las cepas productoras de amargor originaban menos glutamato, independientemente del cuajo y la leche usados en la elaboración. Posteriormente, Hillier *et al.* (1975) describieron una técnica de detección de cepas amargantes mediante la estimación del crecimiento bacteriano en leche suplementada con extracto de levadura al 1% a pH 6,3 y 37,5°C. Así diferenciaban las cepas capaces de alcanzar alta y baja densidad celular en la cuajada y, por tanto, de producir quesos amargos o no amargos. Según las observaciones de varios autores (Martley y Lawrence, 1972; Sullivan y Jago, 1972; Choisy *et al.*, 1978), se propuso un método que se basaba en la determinación de la velocidad de crecimiento del fermento, la proteólisis y la actividad prolín-iminopeptidasa para caracterizar cepas de lactococos por su capacidad de producción de amargor en queso.

Parece que la diferencia entre las cepas amargantes y no amargantes es únicamente su resistencia a la temperatura que se alcanza en la fabricación del queso. A esta temperatura, las cepas amargantes pueden crecer, mientras que las no amargantes no pueden desarrollarse. Lowrie *et al.* (1972) demostraron que la densidad de población del fermento en la cuajada era el factor con mayor influencia en la aparición del amargor.

Las características de los fermentos juegan un papel más importante en el desarrollo del amargor que el tipo de cuajo utilizado en la elaboración del queso (Nelson, 1974). Exterkate (1976) observó que cuando se elaboraban quesos con fermentos lentos (cepas ML1, E8, TR, R1, US3, SK11, AM1 y AM2 de *L. lactis* subsp. *cremoris*) el producto obtenido poseía un sabor agradable, mientras que si se usaban fermentos rápidos (cepas HP, C13, KH, FD27 y Wg2 de *L. lactis* subsp. *cremoris*) el producto obtenido resultaba ser amargo. Se observó que las cepas HP y Wg2 por sí mismas

originaban sabor amargo en el queso independientemente de la acción del cuajo (Visser, 1977b).

Lowrie *et al.* (1972) concluyeron que los fermentos no productores de amargor tenían que cumplir al menos una de las siguientes características: tener una baja velocidad de división celular a la temperatura de elaboración del queso, tener baja supervivencia durante la maduración del queso y tener baja actividad proteolítica. La no existencia de fermentos comerciales típicos para la elaboración de quesos como el Manchego, hace que aparezcan frecuentemente defectos de sabor debido a la utilización de fermentos importados (Núñez *et al.*, 1982).

Comportamiento de las cepas amargantes y no amargantes

Exterkate y Stadhouders (1971) observaron que la diferencia entre los lactococos que provocaban amargor y los que no lo provocaban eran sus características de crecimiento. Mientras que las cepas amargantes eran capaces de crecer en las condiciones de elaboración y alcanzar poblaciones elevadas antes del salado, las no amargantes no se desarrollaban a las temperaturas de fabricación del queso. Si la densidad de población del fermento es muy elevada aparecerán defectos de sabor (Lawrence *et al.*, 1976). En ocasiones, sin embargo, a pesar de los defectos de sabor a los que dan lugar, las cepas productoras de amargor se prefieren en la elaboración de quesos debido a su eficiencia durante la fabricación (Dunn y Lindsay, 1985).

Los resultados obtenidos por Emmons *et al.* (1960a,b) indicaban que el amargor originado por ciertos fermentos se debía a la ausencia de enzimas proteolíticas capaces de degradar los péptidos amargos que se producían inicialmente al degradarse las caseínas. Los resultados de contenido de nitrógeno en queso Cheddar obtenidos por Emmons *et al.* (1962a) indicaban que las cepas amargantes poseían una capacidad de hidrólisis de péptidos amargos menor que las cepas no amargantes. Jago (1962) llegó también a la conclusión de que las diferencias entre cepas amargantes y no amargantes radicaban en la incapacidad de aquéllas para hidrolizar los péptidos amargos producidos por el cuajo. Años más tarde, Sullivan y Jago (1970a,b) postularon la presencia de pirrolidona carboxil-peptidasa en las cepas no amargantes. La ausencia de esta actividad enzimática en las cepas amargantes era el factor que determinaba la

capacidad de degradación de péptidos amargos. Sin embargo, Exterkate y Stadhouders (1971) demostraron que esta enzima no sólo estaba presente en las cepas amargantes, sino que además la actividad en estas últimas era mayor.

El sabor amargo se detecta en el queso cuando la concentración de péptidos amargos excede el nivel umbral de detección (Visser *et al.*, 1983b). Lawrence *et al.* (1972) indicaron dos razones por las cuales la concentración de péptidos amargos en quesos fabricados con cepas no amargantes nunca excedía el nivel umbral: a) las cepas no amargantes debían degradar los péptidos de elevado peso molecular lentamente, ya que su actividad proteolítica era menor; b) las cepas no amargantes debían poseer una actividad peptidásica mayor que las cepas amargantes. Gordon y Speck (1965a) concluyeron que las cepas amargantes poseían más actividad proteolítica en leche que las no amargantes. Sin embargo, Martley y Lawrence (1972) llegaron a la conclusión de que esta característica no se cumplía en todos los casos.

Todas las cepas amargantes pueden originar péptidos amargos a partir de las caseínas de la leche mediante la acción de sus enzimas proteolíticas (Mills y Thomas, 1980; Exterkate, 1983). Sin embargo, las variantes lentas de estas cepas, como es el caso de aquellas cepas que no producen defectos de sabor (Lawrence y Pearce, 1968), han perdido esta característica. Las células de *L. lactis* subsp. *cremoris* HP pueden dar lugar a péptidos amargos a partir de la caseína total y de la β caseína y pueden degradar únicamente los péptidos amargos originados por la acción de la quimosina sobre la caseína α_{s1} y la para- κ -caseína (Visser *et al.*, 1983c).

Influencia del cuajo

Visser (1977b) observó que el cuajo empleado en la fabricación de queso era capaz, por sí mismo, de provocar la aparición de péptidos amargos y de dar lugar a sabor amargo cuando quedaba retenido en el queso a una elevada concentración. Según Stadhouders (1962) existen tres factores que controlan la concentración de cuajo en el queso: la cantidad de cuajo usado en la elaboración, la forma en que la cuajada es lavada, y el pH de la leche y de la cuajada durante la elaboración. En queso Cheddar se observó la relación entre la concentración de cuajo utilizada y la aparición del sabor amargo, especialmente cuando en la elaboración del queso se utilizaban cepas no

sensibles a la temperatura (Scott, 1972; Mills y Thomas, 1980). Asimismo, el sabor amargo fue eliminado en queso Mozzarella y en queso japonés madurado con levaduras mediante la reducción de la cantidad de cuajo empleada para la coagulación de la leche (Keller *et al.*, 1974; Kaneko y Yoneda, 1974).

La cantidad de cuajo que queda retenido en el queso es proporcional a la cantidad de cuajo que se añade a la leche durante la elaboración (Visser, 1977a). La retención aumenta con la disminución del pH de la leche y con el incremento de la actividad del fermento utilizado (Stadhouders y Hup, 1975; Lawrence *et al.*, 1984). Un estudio realizado por Vassal y Gripon (1984) concluye que la influencia del pH de la leche en la retención del cuajo en el queso es mínima, mientras que la influencia de la cantidad de cuajo utilizado durante la fabricación tiene mayor importancia.

El tipo de cuajo utilizado tiene también gran importancia en la calidad del queso. Se han empleado diversos sustitutos del cuajo animal en la coagulación de la leche durante la elaboración de distintas variedades de queso. Winland y Kosikowski (1956) emplearon papaína para la fabricación de queso Cheddar, obteniendo un producto final extremadamente amargo no apto para el consumo. Barbosa *et al.* (1976) obtuvieron el mismo resultado al fabricar queso Gruyère con un extracto de las flores de *Cynara cardunculus*, coagulante que se emplea para la elaboración de algunas variedades de queso en España y Portugal. La actividad proteolítica de algunos cuajos de origen microbiano puede resultar excesiva para su utilización en la elaboración de determinadas variedades de queso. Estos cuajos microbianos incrementan la proteólisis de la caseína α_{s1} y retrasan la de la caseína β respecto a la degradación que origina la quimosina según Christensen *et al.* (1989), quienes sugirieron que el tipo de cuajo utilizado durante la fabricación de queso tenía un gran efecto en la aparición de amargor en el producto final.

1.4.2. Efecto de la aceleración de la maduración en el sabor amargo

La gran repercusión económica del acortamiento del periodo de maduración del queso ha hecho que en los últimos años se hayan desarrollado diversos métodos de maduración acelerada que permitan comercializar el queso en el menor tiempo posible.

Uno de los métodos más utilizados para acelerar la maduración es la adición de enzimas proteolíticas. Sin embargo, esta técnica conlleva en muchos casos el desarrollo de amargor en el producto final. El uso de un fermento comercial formado por lactococos junto a cepas de lactobacilos aisladas de queso Cheddar conseguía acelerar la maduración (Lee *et al.*, 1990b) y mejoraba el sabor del queso (Lemieux *et al.*, 1989), pero algunas cepas provocaban amargor (Lee *et al.*, 1990a).

La adición de proteinasas ácidas en la elaboración de queso Cheddar (Law y Wigmore, 1982a) originaba quesos amargos. El mismo resultado se obtuvo cuando se adicionó una proteasa neutra de *Aspergillus oryzae* (Fedrick *et al.*, 1986) o subtilisina A (Law y Wigmore, 1982a) como forma de acelerar la maduración. También aparecía sabor amargo cuando se usaba Neutrase, la proteasa neutra de *Bacillus subtilis*, en la elaboración de queso Cheddar (Frey *et al.*, 1986a) y en queso Swedish (Ardö y Petterson, 1988).

La acumulación de péptidos amargos debidos a Neutrase puede evitarse mediante su encapsulación en liposomas multilamelares. Dicha encapsulación previene el descenso del pH durante las primeras horas de fabricación del queso al disminuir la actividad proteínica, produciéndose niveles más bajos de péptidos utilizados como sustrato por las proteinasas y peptidasas microbianas en la producción de péptidos pequeños y aminoácidos (Lawrence *et al.*, 1983; Fox, 1988). Asimismo, las enzimas retenidas en la cuajada son liberadas progresivamente tras el prensado, acelerando la proteólisis de forma gradual y evitando la acumulación de péptidos amargos en el queso.

La adición a la leche de células de lactobacilos tratadas térmicamente (Ardö y Petterson, 1988; Ardö *et al.*, 1989) también se ha propuesto como sistema de eliminación del sabor amargo mediante la degradación de los péptidos responsables de este defecto. Bartels *et al.* (1987a,b) describieron el efecto desamargante de células de *Lb. helveticus* sometidas durante unos segundos a temperaturas elevadas o a un choque térmico a temperaturas bajas cuando éstas eran utilizadas como adjuntos a los fermentos.

Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por El Soda *et al.* (1982) quienes observaron que la adición a la cuajada de extractos libres de células de *L. bulgaricus*, *L. helveticus* y *L. lactis* subsp. *lactis* en queso Cheddar provocaba un incremento del amargor, así como la adición de extractos de *L. casei*, que aceleraban la maduración pero conducían a la producción de sabor amargo (El Soda *et al.*, 1981).

Según El Abboudi *et al.* (1991a), la adición a la leche de células de lactobacilos sometidas a un choque térmico antes de la coagulación puede disminuir el amargor en queso Cheddar.

1.4.3. Evaluación del sabor amargo

El primer investigador en proponer una relación entre la composición aminoacídica de un péptido y su amargor fue Ney (1971), quien estableció la hipótesis del índice Q, una relación semicuantitativa entre la composición de aminoácidos de un péptido y su amargor. Según Ney (1979) no es necesaria la existencia de un aminoácido en particular o de una secuencia concreta de aminoácidos para que aparezca el sabor amargo. Sin embargo, algunos investigadores demostraron que los aminoácidos terminales de un péptido y sus características estéricas juegan un papel fundamental en la intensidad del sabor amargo (Kanehisa *et al.*, 1984; Shinoda *et al.*, 1985a,b; 1986a,b).

Matoba y Hata (1972) también propusieron la hidrofobicidad de la cadena de aminoácidos como responsable del sabor amargo, independientemente de la secuencia de aminoácidos. Observaron que un aminoácido hidrófobo provocaba mayor amargor cuando sus extremos estaban bloqueados, por ejemplo formando un enlace peptídico. El amargor era menor cuando el aminoácido estaba en una posición terminal, y aún más débil cuando se encontraba en estado libre.

La hipótesis de Ney establecía el grado de hidrofobicidad como el factor más importante para predecir el sabor amargo. Este hecho fue apoyado por los estudios de otros autores (Clegg *et al.*, 1974; Schalinatus y Behnke, 1975a,b; Adler-Nissen, 1976; Gardner, 1978; Gatfield, 1981). Sin embargo, el efecto de la posición del aminoácido dentro del péptido no puede determinarse mediante el método de Ney (1979) (Ishibashi *et al.*, 1987a).

Existe una correlación entre la hidrofobicidad y el valor umbral de los aminoácidos libres y los dipéptidos (Wieser y Belitz, 1976). Matoba y Hata (1972) y Wieser y Belitz (1976) comprobaron que los dipéptidos eran más amargos que los correspondientes aminoácidos libres y que la intensidad del amargor era independiente de la secuencia de ambos aminoácidos. Wieser y Belitz (1975) observaron que el umbral del sabor amargo disminuía al incrementarse el número de cadenas laterales hidrofóbicas en el péptido, y aumentaba con la presencia de cadenas laterales hidrofílicas. Este hecho fue confirmado más tarde por Lalasidis (1978) quien atribuyó el amargor de los hidrolizados enzimáticos de proteínas a péptidos de más de tres aminoácidos.

De todos los estudios realizados sobre la hidrofobicidad de los hidrolizados de proteínas sólo el índice Q (Ney, 1971) relaciona cuantitativamente el amargor con la hidrofobicidad.

El índice Q

El amargor de un péptido es debido a la acción hidrofóbica de las cadenas laterales de sus aminoácidos. La hidrofobicidad media, Q, se obtiene sumando las hidrofobicidades de sus aminoácidos y dividiendo por el número de residuos que componen el péptido (Ney, 1979; 1981).

Aquellos péptidos con valores de hidrofobicidad media menores de 1.300 cal / residuo no son amargos, mientras que los péptidos con valores de hidrofobicidad media superiores a 1.400 cal / residuo son amargos. Si el valor de Q está comprendido entre 1.300 y 1.400 cal / residuo no se puede predecir si el péptido será o no amargo. Este principio es válido para péptidos con pesos moleculares menores de 6.000 Da. Los péptidos con un peso molecular mayor de 6.000 Da cuyo valor de Q sea superior a 1.400 cal / residuo no poseerán sabor amargo.

El índice Q puede ser aplicada a la mayoría de los péptidos cuya composición de aminoácidos sea conocida, aunque existen excepciones. Así, el péptido β : 26-28 (H-Ile-Asn-Lys-OH) con un valor de hidrofobicidad de 1.670 cal / residuo es un péptido no amargo (Pélissier *et al.*, 1974), y los péptidos H-Val-Ala-OH, H-Ala-Ala-Leu-OH y H-Lys-

Ala-OH son amargos a pesar de poseer un valor de Q menor de 1.300 cal / residuo (Guigoz y Solms, 1976).

Según Adler-Nissen (1986a,b) el sabor amargo depende de la presencia y de la concentración de los péptidos hidrófobos formados por la hidrólisis de las proteínas. Por tanto, no sólo depende de la hidrofobicidad media de los hidrolizados. Adler-Nissen (1986b) propuso una nueva forma de descripción del amargor de los hidrolizados de proteínas que tenía en cuenta la distribución de la hidrofobicidad en los péptidos. Se había observado que la caseína β era más hidrofóbica que la caseína α_{s1} , y que las dos proteínas mostraban una distribución uniforme de la hidrofobicidad a lo largo de la cadena peptídica (α_{s1} : 1.170 cal / residuo; β : 1.330 cal / residuo) (Pélissier y Manchon, 1976; Visser, 1977c). Sin embargo, la región C terminal de la β caseína es más hidrofóbica y, por tanto, presenta sabor más amargo (Shinoda *et al.*, 1986b).

Algunos autores demostraron la influencia de la proteasa responsable de la hidrólisis de las proteínas en el desarrollo del sabor amargo (Pélissier y Manchon, 1976; Belitz y Wieser, 1985). Sin embargo, estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Petritschek *et al.* (1972) que concluyeron que la formación de sabor amargo dependía principalmente de la composición de aminoácidos y de la secuencia de éstos en una proteína, y no de la enzima utilizada en el proceso de hidrólisis.

1.4.4. Mecanismos de formación del sabor amargo

El sabor característico del queso madurado es el resultado de varios sistemas enzimáticos entre los que están incluidos las proteinasas del cuajo, los sistemas proteinasas/peptidasas de los fermentos lácticos, los sistemas proteinasas/peptidasas de la flora microbiana que no forma parte del fermento láctico y las proteinasas de la leche. Cuando se rompe el equilibrio de estas reacciones proteolíticas, los péptidos amargos pueden acumularse y dar lugar a la aparición de sabor amargo en el queso.

Czulak (1959) fue el primer investigador en establecer un mecanismo para el desarrollo de sabor amargo en el queso con participación del cuajo y de las enzimas proteolíticas microbianas. Los péptidos liberados por la acción del cuajo eran a continuación hidrolizados por las cepas no amargantes, mientras que las cepas

amargantes serían incapaces de hidrolizar estos péptidos, por lo que se acumularían y darían lugar a la aparición de amargor. Posteriormente, se apuntó la posibilidad de que la acumulación de péptidos amargos se debiera al aumento de la actividad del cuajo a pH bajo, y que los fermentos usados durante la fabricación no jugaran un papel relevante en este sentido. Sin embargo, Emmons *et al.* (1960a,b; 1962a) observaron que el fermento utilizado en la elaboración del queso era el factor más importante en el desarrollo del amargor. Estos resultados confirmaron los obtenidos por Riddet *et al.* (1932) que fueron los primeros en clasificar los fermentos en amargantes y no amargantes. Asimismo, las investigaciones realizadas por Stadhouders (1962) y por Czulak y Shimmin (1961) usando diferentes cepas de cultivos iniciadores demostraron la importancia de la capacidad de degradación de los péptidos amargos que tenían algunas de las cepas estudiadas. Emmons *et al.* (1962a) observaron que el amargor en queso Cheddar estaba directamente relacionado con el nitrógeno soluble en TCA e inversamente relacionado con la proporción de aminoácidos libres. Basándose en estos trabajos se propuso que las cepas amargantes eran deficientes en los sistemas proteolíticos capaces de degradar los péptidos amargos, que se acumularían causando sabor amargo.

Gordon y Speck (1965a,b) comprobaron la capacidad de las cepas amargantes para producir péptidos amargos a partir de las caseínas en ausencia de cuajo, atribuyéndola a la mayor actividad proteolítica de estas cepas.

Siguiendo la hipótesis de que el amargor fuera el resultado de la formación de ácido pirrolidoncarboxílico en el extremo amino terminal de los péptidos hidrófobos originados por la proteólisis de las caseínas, Sullivan y Jago (1970a) propusieron un modelo de formación y degradación de péptidos amargos en el que asignaban la eliminación del sabor amargo a la presencia de pirrolidona carboxil-peptidasa en las cepas no amargantes. Sin embargo, Exterkate y Stadhouders (1971) obtuvieron resultados que no estaban de acuerdo con esta teoría.

Klimovski *et al.* (1970) observaron que los fermentos amargantes tenían una mayor actividad proteolítica que los no amargantes. Resultados similares fueron obtenidos por Harwalkar y Seitz (1971) quienes demostraron que la proteólisis de las

caseínas mediante las enzimas bacterianas, en ausencia de cuajo, era suficiente para provocar la aparición de sabor amargo.

Se ha observado que todos los cultivos iniciadores pueden contribuir a la formación de amargor en el queso. De hecho, la mayoría de los fermentos utilizados en la elaboración de queso poseen actividades proteolíticas y peptidásicas intracelulares, como sucede en *L. lactis* subsp. *lactis* y en *L. lactis* subsp. *cremoris* (Castberg y Morris, 1976). Son las condiciones de la fabricación del queso y la respuesta de las cepas a estas condiciones, el factor que determina la posibilidad de desarrollo del amargor en el queso (Lawrence *et al.*, 1972; Lowrie *et al.*, 1972; Martley y Lawrence, 1972).

Lowrie y Lawrence (1972) propusieron otra hipótesis para explicar la aparición de amargor en el queso. Según su teoría, la función principal del cuajo era degradar las caseínas de la leche para dar lugar a péptidos no amargos de peso molecular elevado. Un incremento en la concentración de cuajo provocaría un incremento de estos precursores que serían posteriormente degradados por las proteinasas de los fermentos, e implicaría la acumulación de péptidos amargos de bajo peso molecular. Los fermentos no amargantes poseerían menor actividad proteolítica en el queso que los amargantes (Martley y Lawrence, 1972) y, por tanto, degradarían los péptidos con elevado peso molecular más lentamente. Además, los fermentos no amargantes poseerían mayores actividades peptidásicas que los fermentos amargantes.

La hipótesis de Czulak no explicaba el efecto que la infección deliberada con fagos tenía durante la elaboración de queso. Los resultados obtenidos tras la elaboración de queso infectando con fagos la leche de partida ponía en evidencia el papel de estos cultivos en la aparición de amargor en el producto final. La presencia de fagos impedía el desarrollo de sabor amargo cuando los quesos eran elaborados en condiciones en las que la cantidad de cuajo residual era elevada. Estos resultados contradecían el papel del cuajo residual en la aparición de amargor en el queso (Stadhouders, 1974; Stadhouders y Hup, 1975). Sin embargo, este hecho podía explicarse mediante la teoría de Lowrie y Lawrence (1972). Si los fermentos eran los responsables del amargor, una disminución en la población de éstos mediante la infección con fagos a lo largo del proceso de fabricación reduciría el potencial del fermento para provocar sabor amargo (Lowrie, 1977).

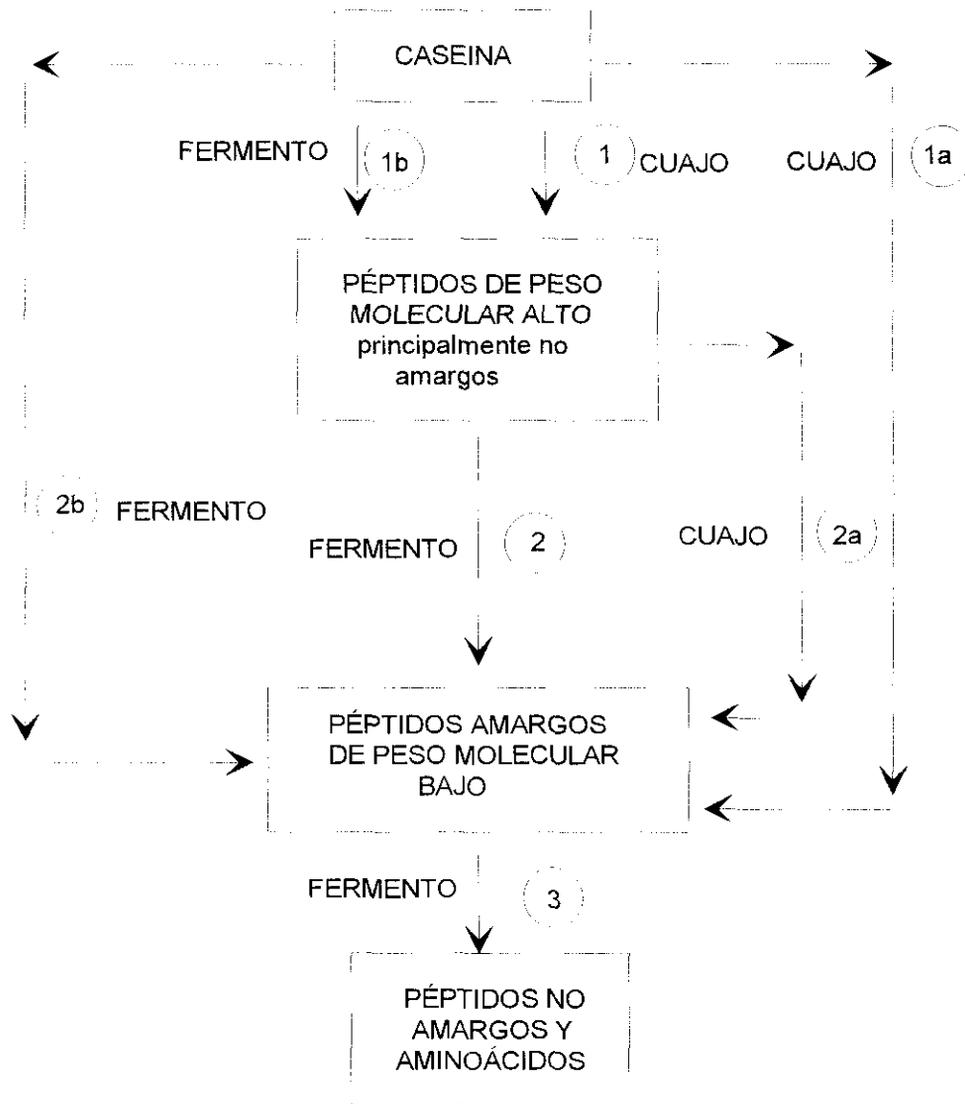


Figura I. Hipótesis de Lowrie y Lawrence (1972).

Richardson y Creamer (1973) sugirieron como principal precursor de los péptidos amargos la caseína α_{s1} . Estudiando la proteólisis a lo largo del período de maduración del queso, Green y Foster (1974) concluyeron que las enzimas del fermento y el cuajo actúan de forma sinérgica y que las enzimas del fermento son responsables, al menos, del 50% de la proteólisis total del queso.

Stadhouders y Hup (1975) sugirieron un esquema para la formación y degradación de los péptidos amargos en queso Gouda que daba especial importancia a la cantidad de cuajo retenido. Según su teoría, existía un efecto sinérgico del cuajo y del sistema proteolítico del cultivo iniciador en el desarrollo de amargor en el queso. En su opinión, el queso tendría sabor amargo cuando se produjera un desequilibrio entre la formación de péptidos amargos originados a partir de la caseína y su degradación mediante el sistema proteolítico del fermento que provocara una concentración de péptidos amargos por encima del nivel umbral. Las enzimas de las cepas amargantes y no amargantes resultaban activas a pH neutro. Sin embargo, las enzimas de las cepas amargantes eran menos activas a pH 5,0 (Sullivan *et al.*, 1973).

La teoría de Lowrie y Lawrence (1972), desarrollada para queso Cheddar y aplicable al queso Camembert (Martley, 1975), no parece explicar el sabor amargo en queso Gouda, cuya composición y condiciones de maduración son diferentes. Las elevadas temperaturas que se alcanzan en la elaboración y la adición de sal a la cuajada del queso Cheddar influyen, posiblemente, en las propiedades del fermento. Visser (1977b,c) comprobó que tanto el cuajo como los fermentos amargantes, de forma independiente, pueden dar lugar al desarrollo de sabor amargo en el queso. Sin embargo, los fermentos son, en este sentido, más específicos que el cuajo. Los péptidos amargos pueden ser degradados por los fermentos no amargantes.

Exterkate (1976) sugirió tres posibles explicaciones para la obtención de quesos no amargos elaborados con cepas amargantes y no amargantes de *L. lactis* subsp. *cremoris*: que el fermento fuera incapaz de originar péptidos amargos en cantidad suficiente como para rebasar el umbral de detección, que el fermento fuera capaz de degradar los péptidos amargos producidos por su acción o la acción del cuajo sobre las caseínas, o que las endo- y exopeptidasas de membrana degradaran los péptidos amargos hidrófobos.

Desmazeaud y Gripon (1977) propusieron un mecanismo general de degradación de proteínas en la elaboración y maduración del queso. El primer paso de la proteólisis es la degradación de las caseínas por la acción del cuajo, que presenta una actividad elevada sobre la caseína α_{s1} (Gripon *et al.*, 1975). El cuajo produce, mayoritariamente, péptidos de peso molecular elevado (entre 3.000 y 16.000 Da) (Green y Foster, 1974; Gripon *et al.*, 1975) y parece no liberar aminoácidos en la cuajada. Las enzimas proteolíticas de las bacterias lácticas conducen a la formación de aminoácidos y péptidos de cadena corta, y presentan una ligera actividad endopeptidasa. Las proteinasas nativas de la leche hidrolizan preferentemente caseína β .

Cuando en el queso existen muchos péptidos con características de tamaño e hidrofobicidad adecuadas el queso es amargo. Sólo los péptidos de tamaño pequeño, debido a su solubilidad, son amargos (Pélissier *et al.*, 1974; Visser *et al.*, 1975; Wieser y Belitz, 1976).

Cliffe y Law (1990), mediante HPLC en fase reversa de la fracción soluble en agua del queso probaron la teoría de Law (1987) que demostraba la importancia de las peptidasas de los fermentos en la degradación de los péptidos de elevado peso molecular producidos por el cuajo para originar péptidos más pequeños y aminoácidos.

Según Visser (1981), el principal papel de las enzimas de los fermentos consiste en la degradación de los fragmentos escindidos de las proteínas y, por tanto, el desarrollo de sabor en el queso.

Los péptidos amargos parecen producirse, principalmente, por la acción del cuajo y de las proteinasas de la pared celular de los fermentos sobre la caseína (Visser *et al.*, 1983a,b). La degradación de estos péptidos se realiza mediante la actuación de las enzimas de membrana o citoplásmicas de los cultivos iniciadores. La presencia de sal tiene gran influencia en la velocidad de formación y degradación de los péptidos amargos por los fermentos. Visser *et al.* (1983a) observaron que la sal impedía el paso de los péptidos amargos a través de la pared y/o de la membrana celular, y éstos no eran accesibles al ataque del sistema peptidásico intracelular.

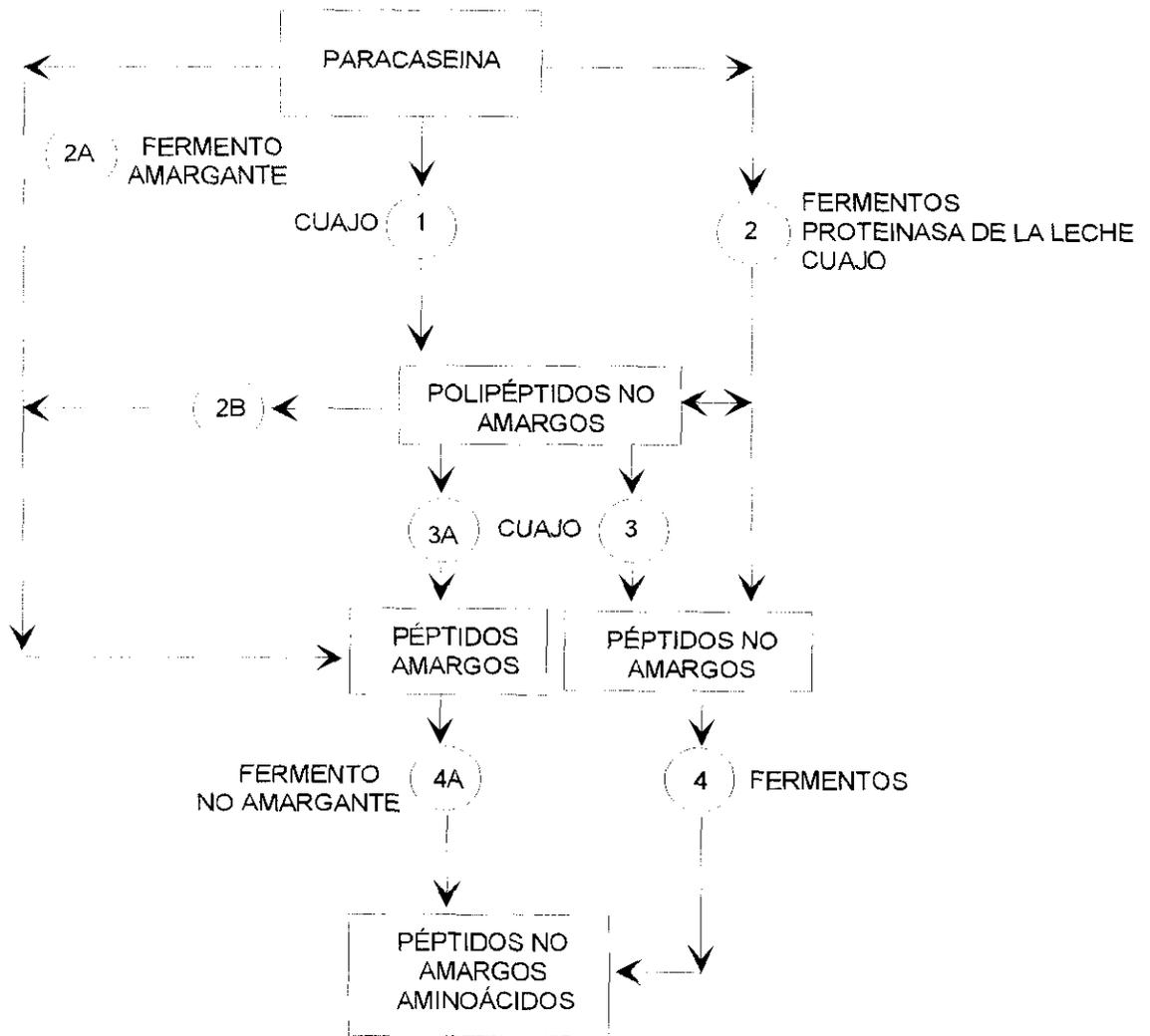


Figura II. Mecanismo de formación del amargor en queso Gouda (Visser, 1977a).

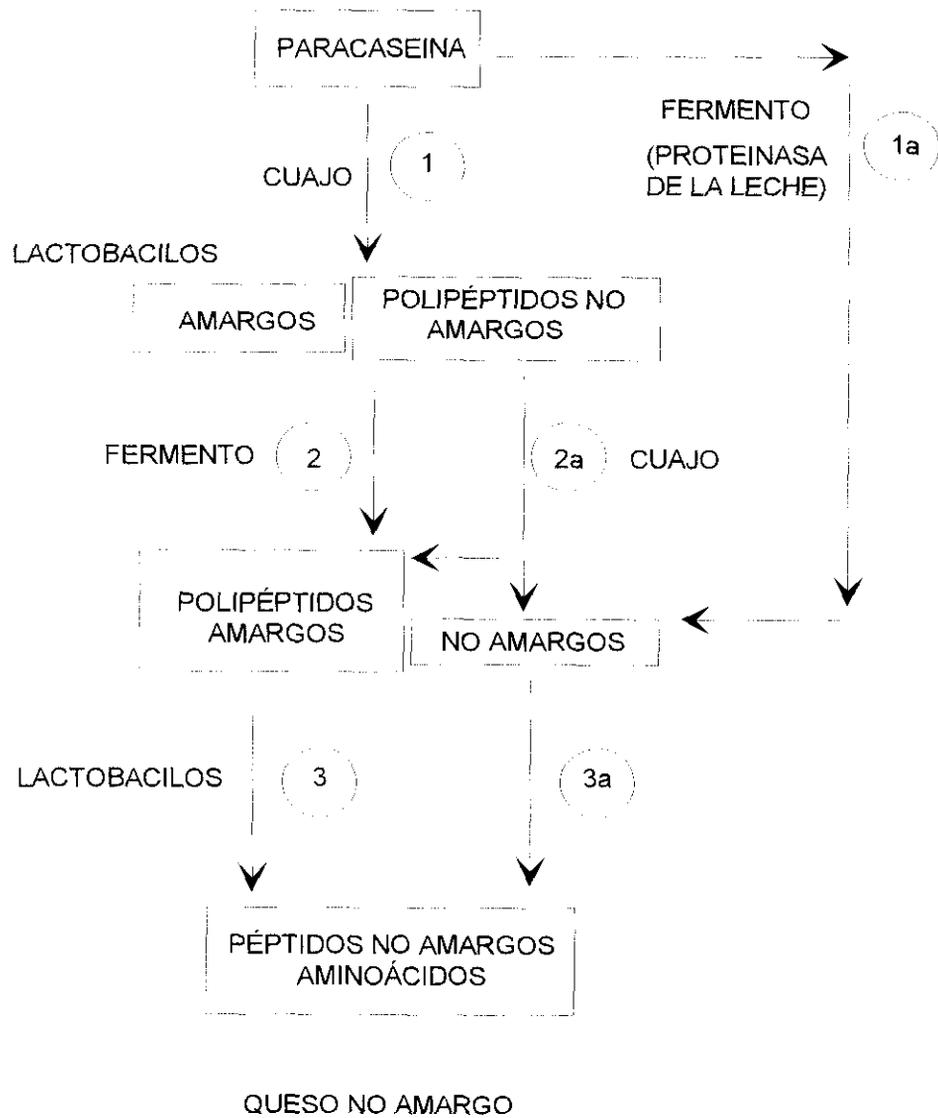


Figura III. Modelo propuesto por Lemieux y Simard (1992) para la fabricación de queso Cheddar no amargo.

Lemieux y Simard (1992) propusieron un modelo aplicable fundamentalmente a queso Cheddar en el que se introduce la importancia de los lactobacilos para la obtención de queso no amargo. De acuerdo con estos autores, en una primera fase se formarían péptidos de cadena larga, no amargos, por acción del cuajo y de los lactobacilos presentes en el queso. Estos péptidos serían hidrolizados por las enzimas del fermento liberándose polipéptidos amargos. La adición de bacterias desamargantes, fundamentalmente lactobacilos, tendría un efecto importante, considerándose que sus aminopeptidasas, dipeptidasas y carboxipeptidasas hidrolizarían los péptidos amargos producidos.

1.4.5. Aislamiento e identificación de péptidos amargos

Para conocer el papel que juegan los péptidos y aminoácidos y su mecanismo de formación en el queso es necesario determinar su estructura. Se han aislado y caracterizado diversos péptidos procedentes de queso, que contribuyen al sabor amargo (Guigoz y Solms, 1974; Huber y Klostermeyer, 1974; Visser *et al.*, 1983b). Los resultados obtenidos por Kaminogawa *et al.* (1986) y por Pham y Nakai (1984) indican que la técnica de HPLC en fase reversa de la fracción de nitrógeno soluble en agua es el método más objetivo para el estudio del proceso de maduración en queso Cheddar.

1.4.5.1. Métodos de aislamiento de péptidos amargos de queso

Los péptidos amargos tienen una elevada proporción de aminoácidos con cadena hidrofóbica, por lo que son liposolubles y pueden ser extraídos con solventes orgánicos (Raadsveld, 1953; Sullivan y Jago, 1970a). Los métodos usados más frecuentemente para el aislamiento de péptidos amargos del queso pueden provocar una pérdida de amargor de aquellos péptidos que contienen glutamina, ya que las soluciones utilizadas para el aislamiento tienen una fuerza iónica baja y en estas condiciones la glutamina se cicla para originar ácido pirrolidoncarboxílico, lo que implica una disminución del sabor amargo.

Existen varios métodos para la extracción de péptidos (fracción soluble en agua) de queso o de hidrolizados de proteínas, entre los que destacan la extracción con NaCl al 5% en quesos de corta maduración; la extracción a pH 4,6 y la electroforesis en

quesos con un tiempo de maduración corto o medio y la extracción con TCA y con alcohol al 70% y con ácido pícrico al 0,85% en quesos maduros. Si el extracto obtenido quiere ser caracterizado es recomendable la extracción con etanol al 70% y someter la muestra a diálisis para después caracterizar por electroforesis o cromatografía (Kuchroo y Fox, 1983). La separación y aislamiento de los péptidos puede llevarse a cabo mediante HPLC en fase reversa (Abu-Tarboush *et al.*, 1989).

La cromatografía en gel de sílice usando propanol como eluyente ha sido utilizada por diversos autores para el fraccionamiento de péptidos amargos en queso (Gordon y Speck, 1965b; Minamiura *et al.*, 1972; Stadhouders, 1974; Visser *et al.*, 1975). También se ha empleado cromatografía con Sephadex G-25 y G-50 seguida de cromatografía de intercambio iónico o en fase reversa.

Varios autores obtuvieron extractos de queso en cloroformo-metanol con sabor amargo a partir de queso Cheddar amargo y no amargo (Harwalkar y Elliot, 1965, 1971; Harwalkar, 1967; Hamilton *et al.*, 1974). El extracto de ambos quesos fue sometido a cromatografía de filtración en gel (Visser, 1977d; Visser *et al.*, 1983b) y, a continuación, a cromatografía en capa fina, electroforesis o HPLC en fase reversa (Champion y Stanley, 1982).

Cliffe *et al.* (1989) propusieron un método para estudiar el perfil de péptidos que las proteinasas y peptidasas originaban durante la maduración acelerada en queso Cheddar. Para ello, combinaban la extracción de la fracción soluble en agua, la precipitación con metanol, la eliminación de lípidos con hexano y la cromatografía en Sephadex G-25. La muestra era finalmente fraccionada mediante FPLC en fase reversa. Sin embargo, los perfiles obtenidos eran bastante homogéneos y la resolución no era tan buena como la obtenida por Champion y Stanley (1982). Estos últimos, mediante filtración en gel y ultrafiltración de las distintas fracciones obtenidas por HPLC, observaron que el peso medio de la fracción amarga era de 190 Da.

1.4.5.2. Identificación de péptidos amargos aislados de queso

La hidrólisis de péptidos amargos ha demostrado la presencia en éstos de gran cantidad de residuos de prolina, alanina, glutámico y valina.

Visser (1977d) observó en queso Gouda que las fracciones de péptidos amargos tenían un peso molecular menor de 1.400 Da. Posteriormente, Visser *et al.* (1983b) concluyeron que la degradación lenta de la caseína β que realizan el cuajo y las proteinasas de los fermentos conducen a la formación gradual del fragmento amargo 193-209. Este péptido es, además, resistente a la degradación, y aunque algunas peptidasas pueden degradarlo originando productos no amargos, puede acumularse de forma lenta y contribuir a la aparición de amargor en el queso.

Se pueden obtener productos amargos a partir de hidrolizados de las fracciones de α -, β - y γ -caseína. La inoculación de *L. lactis* subsp. *cremoris* en leche daba lugar a la aparición de un péptido amargo de 19 residuos. Este péptido fue aislado y se observó que su composición era similar a los fragmentos 193-209 y 193-207 (y/o 193-208) de la caseína β aislados de queso Gouda por Visser *et al.* (1983b).

Las proteinasas de la pared celular también pueden hidrolizar la caseína. Monnet *et al.* (1986) demostraron que la proteinasa de pared de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 763, al igual que la quimosina, rompía enlaces peptídicos en la zona más hidrófoba de la caseína β y era capaz de liberar cinco péptidos que fueron identificados como los fragmentos β : 167-175, β : 176-182, β :183-193, β : 194-207 y β : 194-209. También han sido aislados péptidos amargos formados a partir de las caseínas α_{s1} y α_{s2} .

1.4.6. Relación entre la estructura química de los péptidos amargos y el sabor

Un compuesto amargo debe tener, al menos, una unidad de sabor amargo (Kubota y Kubo, 1969). La unidad consiste en un grupo DH (por ejemplo grupos OH, CHO-, COCH₃ y CHCOOCH₃) y un grupo A (por ejemplo grupos carbonilo como CHO, CO, COOH y un doble enlace como C=C-O-). Estos grupos protón-donante y protón-receptor deben estar en la molécula a una distancia de 1.5 Å. La distancia interorbital A-DH es necesaria para que la molécula amarga se una al receptor adecuadamente. La introducción de cambios en la molécula, como la adición o supresión de grupos funcionales, no sólo influye en la intensidad del sabor, sino en la calidad del sabor percibido, pudiendo provocar cambios de sabor amargo a dulce o viceversa (Belitz *et al.*, 1983).

Shinoda y Okai (1985) propusieron un modelo de receptor de sabor amargo. Para producir amargor un péptido necesita dos grupos funcionales hidrofóbicos o un grupo hidrofóbico y un grupo básico (Tamura *et al.*, 1990).

Amargor de los aminoácidos

Algunos autores (Belitz *et al.*, 1979; Gatfield, 1981) han establecido una relación entre la estructura de los aminoácidos y su sabor amargo. La configuración del carbono en posición α es importante en la calidad del sabor. Mientras que las formas L de los aminoácidos hidrofobos son amargas, las formas D son dulces. La diferencia de sabor entre los enantiómeros se debe a la diferente conformación espacial de los grupos amino y carboxilo del aminoácido. También la longitud de la cadena del aminoácido es importante tanto para la calidad como para la intensidad del sabor (Ishibashi *et al.*, 1988a). Además, los aminoácidos con cadenas laterales ramificadas son más amargos que los aminoácidos con igual longitud de cadena pero sin ramificar. La presencia de un grupo amonio en un aminoácido hace que éste pueda ser alquilado, arilado o acilado. Se ha demostrado que la acetilación o esterificación anula el sabor dulce e incrementa el sabor amargo. Las cadenas laterales aromáticas, en general, incrementan la intensidad del sabor amargo. La fenilalanina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos más amargos. Según Okai (1976) el grupo hidrofóbico de los aminoácidos aromáticos actúa como uno de los sitios de unión a los receptores del sabor amargo. La sustitución con grupos polares de la cadena lateral también influye en el amargor. En general, el sabor amargo disminuye con la adición de grupos polares. La hidrofobicidad de la cadena lateral de los aminoácidos es el principal factor que determina la percepción del sabor amargo (Ishibashi *et al.*, 1988a).

Amargor de los péptidos

La hidrofobicidad es el principal factor que determina el sabor amargo de un péptido. Sin embargo, otros factores como la estructura espacial y la secuencia de aminoácidos también influyen en esta característica.

En general, para que un péptido sea amargo es necesaria la existencia de al menos una cadena lateral hidrofóbica (Matoba y Hata, 1972; Wieser y Belitz, 1976; Belitz *et al.*, 1979; Ishibashi *et al.*, 1987b).

La hidrofobicidad es la característica común de todos los péptidos amargos aislados hasta el momento, como demuestra su solubilidad en solventes orgánicos. Los compuestos amargos necesitan únicamente la existencia de un grupo polar junto a un grupo hidrofóbico (Belitz y Wieser, 1985).

También se ha observado la importancia de la naturaleza de los aminoácidos terminales. La presencia de leucina, isoleucina, fenilalanina, lisina y valina en posición terminal parece ser un factor relevante en el amargor de un péptido (Kirimura *et al.*, 1969; Sullivan y Jago, 1972; Schalinatus y Behnke, 1975b). Los residuos hidrofóbicos en posición terminal actúan como determinantes del sabor amargo y Okai (1976) observó que cuando estos residuos se hallan en el extremo carboxilo terminal el sabor amargo era mayor que cuando están en la posición amino terminal. Ishibashi *et al.* (1988b) observaron que la presencia de leucina y fenilalanina en el extremo carboxilo terminal del péptido provocaba una intensidad de sabor amargo mayor que si estos aminoácidos aparecían en la posición amino terminal. La intensidad también aumentaba cuanto mayor era el contenido de estos aminoácidos en el péptido. En el caso de la presencia de valina en posición terminal el sabor amargo era menor cuando estaba en la posición carboxilo terminal que cuando lo estaba en la amino terminal (Ishibashi *et al.*, 1988a).

La prolina también confiere sabor amargo a un péptido. Sin embargo, en este caso, la hidrofobicidad del aminoácido no es el determinante del sabor amargo. La contribución de este residuo al amargor se debe a la alteración de la conformación del péptido debido al plegamiento que puede sufrir éste por la presencia del anillo imino de la prolina. Esta alteración hace que el péptido adquiera la conformación adecuada para interactuar con el receptor de sabor amargo. Cuando la prolina está en posición amino terminal el sabor amargo es débil o inexistente. Para que un péptido con prolina sea amargo necesita poseer un sitio de unión y un sitio de estimulación del receptor en posición adecuada (Ishibashi *et al.*, 1988b). Se ha observado que la existencia de arginina en una posición contigua a la prolina provoca una gran intensidad de sabor

amargo y que el incremento en el número de aminoácidos en péptidos con una estructura del tipo (Arg) x -(Pro) y -(Phe) z (donde $x=1-2$; $y/z=1-3$) provoca un efecto sinérgico en cuanto al sabor amargo (Otagiri *et al.*, 1985).

El nivel umbral de detección de amargor de los péptidos formados únicamente por aminoácidos hidrofóbicos y neutros parece ser de 0,1 mmol/l (Shinoda *et al.*, 1985a; 1986a,b).

Los péptidos cíclicos son más amargos que los correspondientes péptidos de cadena abierta y la intensidad de sabor aumenta con la hidrofobicidad (Belitz y Wieser, 1985).

El amargor de los péptidos disminuye con su hidrólisis. El sabor amargo disminuye en un péptido cuando los aminoácidos hidrófobos están en posición terminal y es aún menor cuando los aminoácidos están libres. Por esta razón la hidrólisis de los péptidos resulta en una disminución del sabor amargo (Adler-Nissen, 1986a).

De las tres fracciones mayoritarias de caseína (α_{s1} , β y κ) sólo la caseína α_{s1} es degradada en las condiciones de pH, NaCl y lactato cálcico presentes en queso Cheddar (Richardson y Creamer, 1970; Sullivan y Jago, 1972; Pélissier y Ribadeau-Dumas, 1976). La caseína β es más resistente a la degradación enzimática debido a su elevado contenido en prolina (Phelan *et al.*, 1973; Visser y Groot-Mostert, 1977). El extremo carboxilo terminal de la caseína β es muy amargo (Shinoda *et al.*, 1985a) por lo que esta fracción es una fuente potencial de péptidos amargos mayor que la α_{s1} caseína. Sin embargo, el hecho de que la α_{s1} caseína es prácticamente inexistente en leche de cabra y el escaso amargor detectado en los productos elaborados con leche de cabra hicieron que Pélissier y Ribadeau-Dumas (1976) sugirieran la α_{s1} caseína como fuente principal de péptidos amargos.

1.4.7. Eliminación del sabor amargo en el queso

La capacidad de degradar los péptidos amargos que muestran algunos microorganismos es fundamental para eliminar el sabor amargo del queso (Sullivan *et al.*, 1973). Mälkki *et al.* (1978) observaron cómo una cepa de *Pseudomonas fluorescens*

producía una serie de endo- y exopeptidasas que impedían el desarrollo de amargor en queso Edam. Por su parte, Sood y Kosikowski (1979) propusieron la adición de ciertas proteasas y lipasas fúngicas para la eliminación del amargor del queso. La utilización de cultivos caracterizados por su lenta actividad coagulante (Stadhouders, 1974) en queso Gouda, y de cepas incapaces de desarrollarse a 38°C (Lowrie y Lawrence, 1972, Martley y Lawrence, 1972; Jago, 1974) en queso Cheddar, contribuían a evitar la aparición del sabor amargo. La infección del fermento de forma deliberada con fagos (Martley, 1975) lograba disminuir el sabor amargo en queso Camembert.

Los fermentos pueden ser modificados mediante la obtención e inclusión en ellos de mutantes con la *proteínasa de membrana alterada (Pr^t)* y con la misma actividad peptidásica (Kamaly y Marth, 1988). Mills y Thomas (1980, 1982) y Richardson *et al.* (1983) propusieron la utilización de cultivos con una elevada proporción de mutantes Pr^t para eliminar el defecto de amargor. Este método se ha empleado en la elaboración de queso Cheddar (Grieve y Dulley, 1983; Monnet *et al.*, 1986). La ausencia de amargor en el producto final confirmó la eficiencia del sistema proteolítico intracelular de los mutantes en la eliminación del defecto de sabor.

Diversas investigaciones demuestran la disminución del amargor en el queso cuando se utilizan cepas no amargantes como adjuntos a los fermentos amargantes durante la fabricación (Lawrence y Pearce, 1968; Creamer *et al.*, 1970; Visser, 1977c).

Emmons *et al.* (1961, 1962a,b) realizaron diversos experimentos en los que combinaban en distintas proporciones dos cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* como fermento en la elaboración de queso. Observaron que el amargor disminuía al incrementarse la proporción de la cepa no amargante en el fermento. Sin embargo, este método no eliminaba totalmente el amargor. La disminución del amargor que se obtiene usando dos cepas en el fermento se debe al efecto de dilución de la cepa amargante con la variante no amargante. Por tanto, una combinación adecuada de las cepas puede contribuir a la disminución del amargor del queso.

La adición de exopeptidasas ha sido utilizada como método de eliminación del sabor amargo (Fujimaki *et al.*, 1968; Yamishita *et al.*, 1969; Arai *et al.*, 1970a,b). Umetsu *et al.* (1983) y Umetsu e Ichishima (1988) observaron una disminución en la

hidrofobicidad media de un hidrolizado de caseína cuando se trataba con una carboxipeptidasa de trigo.

Minagawa *et al.* (1988, 1989) aislaron la aminopeptidasa T de *Thermus aquaticus* YT-1, y eliminaron con ella el amargor de hidrolizados de caseína obtenidos por la acción de la tripsina, la papaína y la subtilisina. Sugirieron la utilización de la aminopeptidasa T en la maduración acelerada del queso y en la mejora del sabor del producto.

Las estrategias utilizadas para la eliminación del sabor amargo han sido diferentes según la variedad de queso estudiada. En queso Camembert se ha propuesto la utilización de una atmósfera amoniacal durante los primeros días de maduración con el objeto de aumentar rápidamente el pH de la superficie del queso. De esta forma *P. caseicolum* crecería más lentamente, siendo menos intensa la proteolisis y consiguiéndose una disminución del sabor amargo (Vassal y Gripon, 1984).

Cliffe y Law (1990) observaron la eliminación del amargor producido por la proteinasa de *B. subtilis* en queso Cheddar cuando se añadía un extracto de peptidasas intracelulares de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 712 (Accelase). También se observó una disminución del amargor en queso suizo bajo en grasa cuando en la elaboración se añadían cultivos de *L. helveticus* tratados térmicamente para aumentar su actividad peptidásica (Ardö *et al.*, 1989). El mismo resultado se obtuvo cuando se añadieron células de *L. helveticus* CNRZ 32 en la elaboración de queso Gouda (Bartels *et al.*, 1987a).

1.5. OBJETIVOS

El sabor amargo es un defecto que aparece con cierta frecuencia en la industria quesera y que se debe, fundamentalmente, a la acumulación de péptidos hidrófobos. La concentración de péptidos hidrófobos en el queso aumenta cuando existe un desequilibrio entre su producción, debido a la degradación de las caseínas de la leche por acción del cuajo y las enzimas proteolíticas de los fermentos, y la degradación de estos péptidos, en la que juegan un papel esencial las actividades peptidásicas de los cultivos iniciadores.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de maduración acelerada del queso con el fin de disminuir el coste económico del producto. Sin embargo, su empleo ha dado lugar, en muchos casos, a la aparición de sabor amargo en el producto final, haciendo inviable la aplicación industrial de estos procedimientos.

Debido a la escasa variedad de fermentos comerciales existentes en el mercado actual, en nuestro laboratorio se realizó el aislamiento de bacterias lácticas a partir de quesos artesanales de leche cruda de oveja y cabra. Partiendo de dichos aislamientos, la presente Tesis Doctoral se planteó con los siguientes objetivos:

- Conocer la actividad acidificante y proteolítica en leche de los nuevos aislamientos de bacterias lácticas.
- Conocer la actividad peptidásica de extractos libres de células de estos aislamientos sobre diversos sustratos sintéticos.
- Investigar la influencia de un nuevo fermento láctico en las características del queso Manchego elaborado a partir de leche de oveja.
- Seleccionar bacterias lácticas con actividad sobre péptidos hidrófobos, mediante fabricaciones de quesos modelo.
- Investigar el efecto desamargante de las bacterias lácticas seleccionadas y empleadas como adjunto al fermento en la maduración de queso semiduro de leche de vaca.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS AISLAMIENTOS DE BACTERIAS LÁCTICAS

Se partió de un total de 733 nuevos aislamientos de bacterias lácticas procedentes de quesos de leche cruda de oveja o cabra. Con el fin de obtener la mayor variabilidad, se seleccionaron quesos de diferentes productores, con distinta localización geográfica y fabricados en distintas épocas del año.

Se investigó la actividad acidificante en leche, la actividad proteolítica en leche y en soluciones de caseína y la actividad peptidásica sobre distintos sustratos sintéticos.

Según su distribución por géneros, 355 aislamientos eran lactococos, 86 lactobacilos, 159 leuconostocs y 133 enterococos.

2.1.1. Actividad acidificante

La actividad acidificante en leche se determinó midiendo el pH de un cultivo inoculado al 1% de cada uno de los aislamientos en leche de vaca desnatada en polvo de bajo tratamiento térmico reconstituida al 10% (Nilac, NIZO, Holanda) tras 6 h de incubación a 30°C.

2.1.2. Actividad proteolítica

Se estudió la actividad proteolítica de los aislamientos tanto en leche de vaca desnatada en polvo reconstituida al 10% (Nilac), como sobre soluciones de caseína entera y caseína β (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EE.UU.).

2.1.2.1. Actividad proteolítica en leche

La actividad proteolítica de los aislamientos en leche fue cuantificada según el método de Church *et al.* (1983). Para ello, las bacterias lácticas se inocularon en 5 ml de caldo M17 o MRS (Difco, Detroit, MI, EE.UU.) y se incubaron durante 18 h a 30°C. A continuación, las células se separaron centrifugando a 6.000 g durante 15 min, se lavaron en tampón fosfato sódico 0,32 mM pH 7,2 estéril y se resuspendieron en 5 ml de

dicho tampón. Se inocularon 20 ml de leche de vaca (Nilac) con 0,2 ml de la suspensión celular en tampón fosfato y se incubaron 18 h a 30°C. Tras la incubación, la leche se mezcló con agua y ácido tricloroacético 0,75 N en una proporción 5:1:10 y se agitó durante 10 min en un agitador orbital. A continuación las muestras se filtraron con papel Whatman N° 2. Se mezclaron 150 µl de filtrado con 3 ml de reactivo OPA (25 ml de tetraborato sódico 100 mM, 2,5 ml de SDS al 20%, 40 mg de *o*-ftaldialdehído disueltos en 1 ml de metanol, 100 µl de β-mercaptoetanol y 21,4 ml de agua para HPLC) preparado en el día y se midió la absorbancia de la mezcla a 340 nm tras la incubación durante 2 min a temperatura ambiente.

Los resultados se expresaron como el incremento de absorbancia a 340 nm respecto a un control de leche preparado de la misma forma pero sin inocular.

2.1.2.2. Actividad proteolítica sobre soluciones de caseína

Se seleccionaron los aislamientos con mayor actividad proteolítica en leche según el método de Church *et al.* (1983) para el estudio de su capacidad de degradación de caseína bovina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, según la técnica de Hill y Gasson (1986). Con este fin, los aislamientos se sembraron en superficie en agar leche citratada (Efstathiou y McKay, 1976) y se incubaron 18 h a 30°C. Se recogió el césped y se resuspendió en 0,2 ml de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,2. A 150 µl de la suspensión celular se le añadieron 10 µl de una solución de caseína entera o de β-caseína bovina (Sigma) a una concentración de 5 mg/ml en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,2. Después de incubar durante 6 h a 30°C se añadieron 32 µl de tampón de solubilización (2 ml de SDS al 20%, 2,5 ml de tampón del gel de apilamiento diluido 4 veces, 4,5 ml de agua destilada y 1 ml de β-mercaptoetanol) y se calentaron las muestras a 80°C durante 10 min. A continuación las muestras se centrifugaron durante 5 min a 9.500 g. Tras la centrifugación se añadieron 15 µl de una solución de glicerol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0,04% (p/v) a 85 µl de sobrenadante de cada una de las muestras. Las muestras se mantuvieron a -40°C hasta el momento de su aplicación al gel de poliacrilamida.

El gel estaba formado por una zona superior de apilamiento (T=5,4%, C=7,6%) preparada en tampón Tris HCl 1 M pH 6,8 y una zona inferior separadora (T=14,25%,

C=1,8%) en tampón Tris HCl 1 M pH 8,8. La electroforesis se realizó en cubetas verticales SE 400 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, EE.UU.) con una fuente modelo 494 (ISCO, Lincoln, NE, EE.UU.). Se aplicaron 10 μ l de la muestra previamente calentada a 100°C durante 3 min y la electroforesis se desarrolló a 30 mA de intensidad. Cada gel poseía una calle con marcadores de peso molecular (Dalton Mark VII-L, Sigma), y una calle control con la solución de caseína sin degradar.

Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma) al 0,2% en una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 18 h y se destiñeron a continuación con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 10% durante 24 h.

Los geles se leyeron a 565 nm mediante un densitómetro GS-300 (Hoefer Scientific Instruments).

2.1.3. Actividad peptidásica

La actividad peptidásica de los aislamientos se midió en los correspondientes extractos libres de células. Se evaluaron las actividades aminopeptidásica, dipeptidásica, tripeptidásica, endopeptidásica y carboxipeptidásica.

2.1.3.1. Obtención de extractos libres de células

Los aislamientos de bacterias lácticas se cultivaron en 50 ml de caldo M17 o MRS durante 18 h a 30°C. Las células se separaron mediante centrifugación a 6.000 g durante 15 min a 4°C, se lavaron dos veces con tampón fosfato potásico 10 mM pH 7 y se resuspendieron en 5 ml del mismo tampón. Las suspensiones celulares se sometieron a sonicación durante 10 min a 4°C en un sonicador modelo Vibra-cell 600W (Sonics & Materials Inc., Danbury, CO, EE.UU.). A continuación, las células intactas y los fragmentos celulares se eliminaron por centrifugación a 20.000 g durante 30 min, manteniendo la muestra a 4°C. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación se utilizó para el ensayo de las distintas actividades enzimáticas, determinándose el contenido en proteína del extracto mediante el método de Lowry *et al.* (1951), usando como patrón seroalbúmina bovina.

2.1.3.2. Medida de la actividad aminopeptidásica

La actividad aminopeptidásica se midió sobre distintos sustratos cromogénicos derivados de la *p*-nitroanilina según el método de El Soda y Desmazeaud (1982). Los sustratos utilizados fueron Ala-*p*NA, Glu-*p*NA, Gly-*p*NA, Leu-*p*NA, Lys-*p*NA, Pro-*p*NA, Gly-Pro-*p*NA, Arg-Pro-*p*NA y Gly-Phe-*p*NA (Sigma).

La mezcla de reacción estaba formada por 0,1 ml de sustrato 16,4 mM en metanol, 2,8 ml de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7 y 0,1 ml de extracto enzimático. Las muestras se incubaron a 37°C durante 10 min y la actividad enzimática se valoró midiendo el incremento de absorbancia a 410 nm producido por la liberación de la *p*-nitroanilina de los sustratos mediante un espectrofotómetro Beckman DU 7 (Beckman Instruments España SA, Madrid, España). La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de sustrato por min. La actividad aminopeptidásica se expresó como actividad específica, en unidades de actividad enzimática por mg de proteína del extracto.

2.1.3.3. Medida de las actividades dipeptidásica, tripeptidásica y carboxipeptidásica

Las actividades dipeptidásica, tripeptidásica y carboxipeptidásica se midieron según el método de Doi *et al.* (1981) usando Pro-Phe, Ala-Met, Ala-His y Pro-Ile (Sigma) como sustratos para la detección de la actividad dipeptidásica, Leu-Gly-Phe y Leu-Leu-Tyr (Sigma) para la actividad tripeptidásica, y carbobenzoxi (CBZ) CBZ-Gly-Phe, CBZ-Glu-Tyr e Hipuril-Arg (Sigma) para la actividad carboxipeptidásica.

La mezcla de reacción estaba compuesta por 0,9 ml de sustrato 1 mM en tampón Tris HCl 50 mM pH 7,0 y 0,1 ml de extracto celular. La mezcla se incubó durante 30 min a 30°C, tomándose muestras de 50 µl cada 15 min. A cada una de las muestras se le añadió 1 ml de reactivo Cd-ninhidrina (0,8 g de ninhidrina, 80 ml de etanol al 99,5%, 10 ml de ácido acético y 1 g de CdCl₂ disuelto en 1 ml de agua) y la mezcla resultante se calentó a 84°C durante 5 min. La actividad enzimática se determinó midiendo el incremento de absorbancia a 507 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 7. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce un

incremento de 0,1 unidades de absorbancia en 15 min en las condiciones del ensayo. Las actividades dipeptidásica, tripeptidásica y carboxipeptidásica se expresaron como actividad específica, en unidades de actividad enzimática por mg de proteína del extracto.

2.1.3.4. Medida de la actividad endopeptidásica

La actividad endopeptidásica se midió según el método de El Soda y Desmazeaud (1982). Se utilizaron como sustratos succinil-Phe-pNA, Glu-Phe-pNA y benzoil-Arg-pNA (Sigma). La mezcla de reacción estaba formada por 0,1 ml de sustrato 16,4 mM en metanol, 2,8 ml de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0 y 0,1 ml de extracto enzimático. La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C y se midió el incremento de absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 7. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de absorbancia de 0,01 unidades/h en las condiciones del ensayo. La actividad endopeptidásica se expresó como actividad específica, en unidades de actividad enzimática por mg de proteína presente en el extracto.

2.2. ELABORACIÓN DE QUESO MANCHEGO DE LECHE CRUDA Y DE LECHE PASTERIZADA CON UN NUEVO FERMENTO

Se investigó el efecto de una mezcla de cuatro aislamientos de *L. lactis* subsp. *lactis* que se emplearon como fermento en la elaboración de queso Manchego de leche cruda o pasterizada de oveja, sobre las características químicas, reológicas y sensoriales del queso. Se seleccionaron los aislamientos ESI 153, ESI 240, ESI 277 y ESI 718, procedentes de queso Manchego de leche cruda y con actividad proteolítica en leche.

Se realizaron dos fabricaciones de queso Manchego en la quesería experimental del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

En cada fabricación se elaboraron dos cubas de leche cruda y dos cubas de leche pasterizada de oveja de 30 l cada una. La pasterización se efectuó a 72°C durante 15 s. De cada dos cubas, la primera actuó como control y se inoculó al 1% con un

fermento comercial mesófilo tipo LD CH-N01 (Chr. Hansen-Lacta S.A., Madrid, España) y la segunda se inoculó con un 1% de la mezcla de los cultivos coagulados en leche de cada uno de los cuatro aislamientos de *L. lactis* subsp. *lactis* seleccionados. Tras 20 min a 30-31°C con el fermento, se añadieron 4 ml de cuajo Maxiren (fuerza 1:15.000) (Gist-Brocades, Delft, Holanda). A los 40 min se procedió al corte de la cuajada en cubos de 4-6 mm y a su recalentamiento a 37°C durante 10 min. Una vez realizado el desuerado se llenaron los moldes y los quesos se prensaron durante 20 h a 20°C. Se salaron introduciéndolos en una salmuera (20% NaCl) a 10°C durante 24 h y finalmente se pasaron a una cámara de maduración a 12°C durante 60 d.

Se tomaron muestras de leche, cuajada y queso de 1, 15, 30, 45 y 60 d de maduración. Se determinó el pH y el extracto seco. Se investigó la degradación de caseínas, las fracciones nitrogenadas solubles, los niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos de la fracción soluble en agua. Se analizó la textura de los quesos durante la maduración, así como su valoración organoléptica a los 30 y 60 d. Se determinaron, además, los niveles de microorganismos totales y de lactobacilos.

2.3. ELABORACIÓN DE QUESOS MODELO PARA LA SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD SOBRE PÉPTIDOS HIDRÓFOBOS

Se realizaron diversas fabricaciones de quesos modelo en el laboratorio, con el fin de evaluar la capacidad degradadora de péptidos hidrófobos por nuevos aislamientos de bacterias lácticas cuando se añadían como adjuntos al fermento comercial.

Se seleccionaron los dos aislamientos de *Lactobacillus* y los dos aislamientos de *Leuconostoc* de mayor actividad peptidásica. Asimismo, se ensayaron diversos fermentos termófilos comerciales con el mismo objetivo.

Se realizaron ocho fabricaciones de quesos modelo con leche pasteurizada de vaca. En cada fabricación, la leche se calentó a 30°C y se le adicionó un 0,1% de una solución de CaCl_2 al 10%. La leche se inoculó con un 1% de un cultivo coagulado en leche del fermento mesófilo Hansen CH-N01 y se repartió en cuatro cubas. La primera cuba actuó como control. A la segunda y a la cuarta cuba se les adicionó 0,012

unidades Anson (UA)/l de Neutrased (Novo-Nordisk Bioindustrial S.A., Madrid, España), una proteinasa neutra de *B. subtilis*, con el fin de incrementar la cantidad de péptidos hidrófobos en el producto final. La tercera y la cuarta cuba se inocularon con un cultivo al 10% de los aislamientos de lactobacilos o leuconostocs seleccionados por presentar la actividad peptidásica más elevada. La leche se coaguló con Maxiren en proporción equivalente a 120 µg de quimosina por litro de leche. A los 40 min se cortó la cuajada y se recalentó a 37°C durante 10 min. Los quesos se prensaron durante 20 h a 20°C, se salaron en salmuera al 20% durante 8-10 h, se envolvieron en película de plástico y se dejaron madurar durante 72 h a 20°C para acelerar su maduración. Se tomaron muestras a las 24 h y a las 72 h, y se determinó el pH, el extracto seco y el contenido en péptidos hidrófobos e hidrófilos de la fracción soluble en agua de las mismas.

Asimismo, se fabricaron quesos modelo de leche pasteurizada de vaca con ocho fermentos comerciales termófilos TA 052, TA 054, TA 060, TA 061, TA 062, TA 557, TA 558 y TA 559 (Texel, Rhône-Poulenc, Madrid, España) compuestos por *S. thermophilus*. En estas fabricaciones la acidificación de la leche se realizó mediante la adición de δ -gluconolactona como sustituto del fermento mesófilo comercial. En cada fabricación, a la leche, que contenía 0,1% de una solución de CaCl₂ al 10%, se le añadió δ -gluconolactona al 1% dejando actuar a ésta a 30°C durante 20 min antes de inocular con el fermento termófilo al 1%. La leche se repartió en dos cubas. La primera cuba actuó como control, y a la segunda cuba se le adicionaron 0,012 UA/l de Neutrased. La leche se coaguló con Maxiren y se procedió como en las fabricaciones anteriores. Los quesos se prensaron a 32°C durante 6 h y a 20 °C durante 12 h y se salaron en salmuera al 10% durante 6 h. A continuación los quesos se envolvieron en película de plástico y se maduraron a 20°C, tomándose muestras al final de este período. Se midió el pH, el extracto seco y el contenido en péptidos hidrófobos e hidrófilos de la fracción soluble en agua de las mismas.

2.4. ELABORACIÓN DE QUESO SEMIDURO DE LECHE CRUDA Y LECHE PASTERIZADA DE VACA CON BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS COMO ADJUNTO

Se utilizaron como adjuntos al fermento *L. plantarum* ESI 144 y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598, y un cultivo termófilo TA-558, con el fin de conocer su comportamiento en la eliminación del sabor amargo durante la maduración del queso.

Se realizaron cuatro fabricaciones por cada aislamiento, dos con leche cruda y dos con leche pasterizada a 72°C durante 15 s. En el caso de la leche pasterizada, se adicionó un 0,1% de una solución de CaCl₂ al 10%. En cada fabricación la leche se repartió en cuatro cubas de 60 l cada una. Se calentó a 30°C y se añadió un 1% del fermento CH-N01. La cuba primera actuó como control. A las cubas tercera y cuarta se les añadió el cultivo adjunto al 1%. A los 20 min se añadió a las cubas 2 y 4 Neutrased (0,01 UA/l). La leche se coaguló con Maxiren. Después de 40 min, la cuajada se cortó en cubos de 4-6 mm y se recalentó a 37°C durante 10 min. A continuación se realizó el desuerado, se llenaron los moldes y se prensaron los quesos durante 18 h a 20 °C cuando la leche fue inoculada con aislamientos mesófilos como adjuntos al fermento. En el caso de la inoculación de termófilos junto al fermento comercial los quesos se prensaron a 30°C durante 4 h, seguido de un prensado a 20°C durante 14 h. Los quesos prensados se introdujeron en salmuera al 12% durante 24 h y a continuación se colocaron en una cámara de maduración a 12°C durante 60 d.

Se tomaron muestras de leche, cuajada y queso de 1, 15, 30, 45 y 60 d de maduración. En todas las muestras se midió el pH, el extracto seco, se investigó la degradación de caseínas, se analizaron las fracciones de nitrógeno soluble a pH 4,6, en TCA al 12% y en PTA al 5%, y los niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos en la fracción soluble en agua. Además, en los quesos de 30 y 60 d se realizó análisis sensorial y análisis de la textura del queso. Asimismo, se hicieron recuentos microbiológicos de viables totales y/o del fermento adjunto.

2.5. ANÁLISIS QUÍMICOS DE LECHE Y QUESO

2.5.1. Toma de muestras

Muestras de leche. Se tomaron aproximadamente 200 ml de leche en frascos de plástico que se enfriaron inmediatamente y se mantuvieron en refrigeración en hielo fundente durante el transporte al laboratorio.

Muestras de cuajada. Se tomaron aproximadamente 150 g de cuajada y se introdujeron en bolsas de plástico que se enfriaron y se mantuvieron en hielo fundente durante el transporte al laboratorio.

Muestras de queso. Las muestras de queso se tomaron cada 15 d a lo largo de la maduración. Para cada toma de muestras se utilizó un queso diferente. Los quesos se transportaron al laboratorio en condiciones de refrigeración.

2.5.2. pH

pH de la leche. Se determinó con un pHmetro Micro pH 2002 Crison (Crison Instruments S.A., Barcelona, España).

pH del queso. Se determinó en un homogeneizado de 10 g de queso con 20 ml de agua destilada a 70°C preparado en un Stomacher Colworth 400 (A.J. Seward Ltd., Londres, Reino Unido). El pH se midió cuando el homogeneizado se había enfriado a 20°C (Perry y Sharpe, 1960).

2.5.3. Extracto seco

Se determinó por desecación de las muestras de queso a 100°C durante 24 h según el método de la A.O.A.C. (1990). Para ello se pesaron 1-2 g de muestra en cápsulas de porcelana con arena de mar y una varilla de vidrio desecadas previamente a 100°C durante 24 h. Se realizaron tres determinaciones por cada muestra de queso.

2.5.4. Caseínas residuales

La degradación de α y β -caseína en el queso se determinó según el método de Andrews (1983) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Preparación de las muestras. Se tomaron 20 g de cuajada o queso y se homogeneizaron mediante una batidora Omni-Mixer (Ivan Sorvall Inc., Norwalk, CO, EE.UU.) con 100 ml de citrato sódico al 2% durante 10 min (Núñez *et al.*, 1986).

Electroforesis. Se realizó en cubetas verticales SE 400 (Hoefer Scientific Instruments), con fuente de alimentación modelo 494 (ISCO). Los geles se prepararon en tampón Tris-HCl pH 7,6 en el gel superior (T=4,2% y C=5%) y pH 8,9 en el gel inferior (T=12,5% y C=4%). Las muestras de leche se diluyeron en una proporción 1:15 y los homogeneizados de queso y cuajada fueron diluidos en una proporción 1:6 en tampón Tris-HCl 60 mM, pH 7,6 con 2-mercaptoetanol 0,1 M y urea 8 M. Las muestras así preparadas se calentaron a 35°C durante 15 min y se aplicaron 10 μ l de la fase acuosa en los pocillos del gel. En cada gel se dispusieron muestras de leche, cuajada y queso en los distintos momentos de la maduración. Se realizaron dos geles por cada cuba y fabricación. La tinción de los geles se realizó con Coomasie Blue G250 al 0,25% en una solución de TCA al 12,5% y metanol al 50% durante 60 min. A continuación, los geles fueron desteñidos en una solución de acético al 10% y metanol al 20%. La lectura de los geles se realizó con un densitómetro GS-300 (Hoefer Scientific Instruments), midiéndose el área de los picos obtenidos en unidades densitométricas con el programa GS-300 H Data System (Hoefer Scientific Instruments). La cuantificación de las caseínas α y β residuales se realizó comparando el área del pico de la fracción de caseína de la muestra respecto al área del pico de la misma fracción de caseína de la muestra de leche correspondiente, teniendo en cuenta el peso del queso y el peso de la leche tanto en la muestra utilizada para electroforesis como en la cuba. La fórmula aplicada fue la siguiente:

$$\% \text{ cas residual} = \frac{\text{unidades (densitómetro) muestra queso} \times \frac{\text{peso total de queso}}{\text{peso de queso en la muestra}}}{\text{unidades (densitómetro) muestra leche} \times \frac{\text{peso total de leche}}{\text{peso de leche en la muestra}}}$$

2.5.5. Fracciones de nitrógeno soluble

La determinación del contenido en nitrógeno total y de las distintas fracciones de nitrógeno en leche y queso se realizó según el método Kjeldahl. Se utilizó un digestor Digestion System 6, 1007 Digestor (Tecator ab, Höganäs, Suecia), un destilador Kjeltect System 1002 Destilling Unit (Tecator), y pastillas Kjeltabs S (Tecator) como catalizador de la reacción.

Homogeneizados de queso. Se utilizaron los homogeneizados preparados como se describió para el análisis del contenido en caseína.

Nitrógeno total. Se evaluó en la muestra de leche o en el homogeneizado de queso.

Nitrógeno soluble a pH 4,6. Se determinó según Núñez *et al.* (1986), en el filtrado obtenido por precipitación con ácido acético-acetato sódico a pH 4,6 y filtración con papel Whatman N° 42. El resultado se expresó como porcentaje del nitrógeno total.

Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 12%. Se determinó según Núñez *et al.* (1986), en el filtrado obtenido por precipitación con TCA a una concentración final del 12% y filtración con papel Whatman N° 42. El resultado se expresó como porcentaje del nitrógeno total.

Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (PTA) al 5%. Se determinó según Núñez *et al.* (1986) en el filtrado obtenido por precipitación con PTA a una concentración

final del 5% y filtración con papel Whatman N° 42. El resultado se expresó como porcentaje del nitrógeno total.

2.5.6. Péptidos de la fracción soluble en agua

La extracción de la fracción soluble en agua se realizó según el método de Aston y Creamer (1986). Se partió de una muestra de 60 g de queso rallado que se calentó a 40°C. A continuación, la muestra se centrifugó a 30.000 g durante 30 min a 40°C para separar la grasa del queso. El precipitado obtenido tras la centrifugación, una vez decantada la fase grasa, se batió con 50 ml de agua destilada en un homogeneizador Omni-Mixer durante 2 min. El batido se centrifugó a 6.000 g durante 20 min a 5°C. La fase acuosa obtenida se centrifugó de nuevo a 30.000 g durante 30 min a 5°C. El precipitado se batió de nuevo con 50 ml de agua destilada durante 2 min, para obtener un batido que se centrifugó a 30.000 g durante 30 min a 5°C. Las fases acuosas de estas dos últimas centrifugaciones se mezclaron y, a continuación, se añadió a la mezcla la mitad de volumen de metanol, dejando precipitar durante la noche a 4°C. Después, la muestra fue filtrada con papel Whatman N° 42, el metanol se evaporó en un rotavapor R-124 (Buchi, Suiza), y por último se liofilizó el filtrado.

La determinación de los péptidos hidrófobos e hidrófilos se realizó según el método descrito por Lau *et al.* (1991). Se pesaron 0,3 g de liofilizado y se disolvieron en 3 ml de agua para HPLC. Las muestras se filtraron con filtros de 0,45 µm Millex-HV₁₃ (Millipore Products Division, Bedford, MA, EE.UU.). Las muestras se analizaron en un cromatógrafo Beckman System Gold (Beckman Instruments España S.A.) formado por dos bombas modelo 126, un detector de batería de diodos modelo 168 e inyector automático modelo 502, todo ello gestionado mediante el programa System Gold. Se utilizó una columna Ultrasphere ODS (4,6 mm x 250 mm) (Beckman) con precolumna Ultrasphere ODS (4,6 mm x 45 mm) (Beckman) que se equilibró a temperatura ambiente con 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). Se inyectaron, por duplicado, 20 µl de muestra que eluyeron con un gradiente lineal desde el 0,05% de TFA en agua hasta el 0,035% de TFA en acetonitrilo:agua (90:10, vol/vol) durante 30 min. El flujo se mantuvo en 1 ml/min y la detección se llevó a cabo a 214 y 280 nm. La fase móvil se filtró bajo vacío a través de un filtro HV (Millipore) de 0,45 µm y se desgasificó mediante baño de

ultrasonidos antes de añadir el TFA. Los resultados se expresaron como unidades de área del cromatograma por mg de peso seco de queso.

2.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LECHE Y QUESO

2.6.1. Toma y preparación de muestras

Muestras de leche. Se tomaron aproximadamente 100 ml de leche en frascos estériles y se mantuvieron en refrigeración durante el transporte al laboratorio para su análisis. Se realizaron diluciones decimales directamente a partir de la leche en agua peptonada estéril al 0,1%.

Muestras de cuajada. Las muestras de cuajada fueron tomadas en bolsas de plástico estériles y transportadas en frío hasta el lugar de análisis. En el laboratorio se tomaron 5 g de cuajada y se homogeneizaron con 45 ml de citrato trisódico al 2% estéril en un Stomacher. A partir del homogeneizado se realizaron las correspondientes diluciones decimales de la muestra en agua peptonada estéril al 0,1%.

Muestras de queso. Las muestras de queso fueron tomadas de forma estéril en el laboratorio. Se homogeneizaron 5 g de queso con 45 ml de citrato trisódico estéril al 2% en un Stomacher. A continuación se realizaron diluciones en serie de la muestra en agua peptonada estéril al 0,1%.

2.6.2. Recuento de microorganismos viables totales

El recuento de viables totales se realizó en Plate Count Agar (PCA) según la Norma FIL (1987). Las placas se sembraron por duplicado mediante un sistema espiral modelo DS (Interscience, Saint-Nom-Le Breteche, Francia) con las correspondientes diluciones y se incubaron durante 72 h a 30°C.

2.6.3. Recuento de lactobacilos

El recuento de lactobacilos se realizó en agar Rogosa (Difco) sembrando las placas por duplicado mediante un sistema espiral modelo DS con las correspondientes diluciones e incubando durante 72 h a 30°C en anaerobiosis.

2.6.4. Recuento de leuconostocs

Debido a las dificultades que supone el recuento de *Leuconostoc* y a la poca eficacia de los medios selectivos existentes para este tipo de microorganismos, la estimación de la población de *Leuconostoc* se realizó mediante la identificación de la proporción de éstos presentes en las placas de PCA. Para ello se tomaron 20 colonias de cada placa de PCA y se sembraron en agar KCA (Nickels y Leesment, 1964) donde los leuconostocs y lactobacilos crecen dando colonias rosas-rojas con halo (cit⁺) tras incubar durante 72 h a 30°C. Las colonias características fueron sembradas en agar Rogosa y se incubaron en anaerobiosis a 30°C durante 72 h para descartar las correspondientes a lactobacilos.

2.6.5. Recuento de termófilos

El recuento de microorganismos termófilos se realizó en agar M17 sembrando las placas por duplicado mediante un sistema espiral, con las correspondientes diluciones (dos placas por dilución) e incubando durante 48 h a 37°C y 22 °C. La diferencia en los recuentos entre ambas temperaturas se estimó como debida al crecimiento de los microorganismos termófilos.

2.7. ANÁLISIS REOLÓGICO

La determinación de la textura se realizó en seis probetas cilíndricas (17 mm de diámetro x 17 mm de altura) extraídas de la zona externa, intermedia e interna de porciones de queso con forma de cuña. Las probetas se extrajeron y se analizaron a 15°C, en una prensa Instron modelo 4301 (Instron Ltd., Buckinghamshire, Reino Unido) que comprimó las probetas hasta el 25% de su altura con una velocidad de carga de 50 mm/min. Así se determinó la fracturabilidad, la firmeza y la elasticidad del queso.

La **fracturabilidad** es la fuerza necesaria para la ruptura de la probeta, se expresa en Newtons y corresponde a la fuerza que se alcanza en el primer punto de inflexión de la curva de compresión.

La **firmeza** es la energía absorbida hasta el 75% de compresión, y se expresa en Julios. Corresponde al área bajo la curva de compresión.

La **elasticidad** es la presión que se requiere para empezar a deformar la probeta. Se obtiene a partir de la pendiente de la parte inicial de la curva de compresión y se expresa en N/mm^2 .

2.8. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

Los quesos se evaluaron organolépticamente a los 30 y 60 d de maduración por un panel de 12 catadores.

Los quesos se cortaron en cuñas y éstas en láminas triangulares, eliminando 1 cm de la *porción externa*. Se mantuvieron alrededor de 2 h a temperatura ambiente. A cada muestra se le asignó un código consistente en un número aleatorio de tres cifras y fueron presentadas a los catadores de forma igualmente aleatoria. Se utilizaron pan y agua para eliminar el sabor entre dos muestras sucesivas.

Los catadores valoraron la calidad y la intensidad de sabor, así como la *presencia de sabor amargo puntuando sobre una escala de 0 a 10 puntos, representada por una línea vertical en la que estaban marcados sus extremos y punto medio*. La puntuación se obtuvo midiendo la distancia existente entre el punto de origen de la recta y el lugar marcado por el catador.

2.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa BMD P8V (BMDP Statistical Software, CA, EE.UU.) para realizar los análisis de varianza.

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de la mínima diferencia significativa o MSD con $P=0,05$ según el test LSD (Steel y Torrie, 1980).

El programa BMD 01R (Dpt. Biomathematics, UCLA, CA, EE.UU.) se utilizó para realizar los análisis de regresión lineal.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS AISLAMIENTOS DE BACTERIAS LÁCTICAS

3.1.1. Resultados

3.1.1.1. Actividad acidificante

La actividad acidificante en leche se midió en un total de 733 aislamientos de bacterias lácticas, 360 procedentes de queso Manchego de leche cruda de oveja y 373 procedentes de queso de Gredos de leche cruda de cabra (Tablas 1 y 2).

El grupo con mayor actividad acidificante fue el correspondiente al género *Lactococcus*: 55 de los 169 aislamientos procedentes de queso Manchego y 64 de los 186 aislamientos de queso de Gredos pertenecientes a este género dieron lugar a un pH en leche inferior a 6,0 después de incubar 6 h a 30°C. El pH más bajo obtenido fue 5,30 por *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 240 procedente de una muestra de queso Manchego.

El segundo grupo más acidificante fue el género *Enterococcus*. En el caso de los aislamientos de queso Manchego, sólo 1 de los 59 estudiados originó un pH inferior a 6,0 tras las 6 h de incubación. Sin embargo, los enterococos aislados de queso de Gredos mostraron mayor actividad acidificante, ya que 13 de los 74 aislamientos analizados consiguieron un pH en leche inferior a 6,0 después de la incubación.

Los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* mostraron escasa actividad acidificante. Ninguno de los 31 lactobacilos aislados de queso Manchego ni de los 55 aislados de queso de Gredos fueron capaces de alcanzar valores de pH inferiores a 6,0. Lo mismo sucedió con los 101 leuconostocs aislados de queso Manchego y con los 58 aislamientos de leuconostocs obtenidos a partir de muestras de queso de Gredos.

Tabla 1. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso Manchego según su actividad acidificante¹ en leche.

pH	Lactococos	Enterococos	Leuconostocs	Lactobacilos
6,60-6,31	76	45	101	26
6,30-6,01	38	13	0	5
6,00-5,71	38	1	0	0
5,70-5,41	16	0	0	0
< 5,40	1	0	0	0
Total aislamientos	169	59	101	31

¹ Medida como pH tras 6 h de incubación a 30°C.

Tabla 2. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso de Gredos según su actividad acidificante¹ en leche.

pH	Lactococos	Enterococos	Leuconostocs	Lactobacilos
6,60-6,31	52	52	57	53
6,30-6,01	70	9	1	2
6,00-5,71	44	12	0	0
5,70-5,41	20	1	0	0
< 5,40	0	0	0	0
Total aislamientos	186	74	58	55

¹ Medida como pH tras 6 h de incubación a 30°C.

3.1.1.2. Actividad proteolítica

3.1.1.2.1. Actividad proteolítica en leche

La actividad proteolítica se determinó en un total de 673 aislamientos de bacterias lácticas, 337 aislamientos procedentes de queso Manchego y 336 aislamientos procedentes de queso de Gredos (Tablas 3 y 4).

Los lactococos presentaron los valores más altos de proteólisis en leche; 38 de los 169 lactococos aislados de queso Manchego y 62 de los 186 lactococos aislados de queso de Gredos dieron lugar a incrementos de absorbancia a 340 nm, sobre el valor obtenido en leche no inoculada, superiores a 0,20.

Al igual que sucedió con la actividad acidificante el segundo grupo de bacterias más proteolítico fue el de los enterococos, 6 de los 59 aislamientos de enterococos de queso Manchego y 14 de los 186 aislamientos de enterococos de queso de Gredos dieron lugar a incrementos de absorbancia a 340 nm en la leche superiores a 0,20. En este grupo se encontraron los 2 aislamientos con actividad proteolítica más elevada, correspondiente a un incremento de absorbancia de 0,40.

En cuanto a los lactobacilos, únicamente 1 de los 31 aislamientos de queso Manchego produjo un incremento de absorbancia a 340 nm en leche superior a 0,20.

Los leuconostocs presentaron una actividad proteolítica escasa o nula. Ninguno de los 78 aislamientos de queso Manchego estudiados dio lugar a incrementos de absorbancia a 340 nm superiores a 0,10 y únicamente 1 de los 21 aislamientos de queso de Gredos estudiados dio lugar a un incremento de absorbancia superior a este valor.

Se observó la existencia de correlación significativa ($P < 0,001$) entre la producción de ácido y la actividad proteolítica en leche por los lactococos y los enterococos aislados a partir de ambas variedades de queso. Los coeficientes de determinación y el nivel de significación de la regresión se indican en la Tabla 5.

Tabla 3. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso Manchego según su actividad proteolítica¹ en leche.

Δ Abs 340 nm	Lactococos	Enterococos	Leuconostocs	Lactobacilos
< 0,10	57	42	78	28
0,11-0,20	74	11	0	2
0,21-0,30	38	6	0	1
0,31-0,40	0	0	0	0
0,41-0,50	0	0	0	0
Total aislamientos	169	59	78	31

¹ Medida como incremento de absorbancia a 340 nm.

Tabla 4. Distribución de las bacterias lácticas aisladas de queso de Gredos según su actividad proteolítica¹ en leche.

Δ Abs 340 nm	Lactococos	Enterococos	Leuconostocs	Lactobacilos
< 0,10	76	50	20	52
0,11-0,20	48	10	1	3
0,21-0,30	56	12	0	0
0,31-0,40	6	0	0	0
0,41-0,50	0	2	0	0
Total aislamientos	186	74	21	55

¹ Medida como incremento de absorbancia a 340 nm.

Tabla 5. Valores del coeficiente de determinación (r^2) y nivel de significación de la regresión entre actividad acidificante y actividad proteolítica en leche para cada género de bacterias lácticas.

Origen	Género	nº de aislamientos	r^2	P
Manchego	Lactococos	169	0,391	0,0000
	Enterococos	59	0,491	0,0000
	Lactobacilos	31	0,044	0,0185
	<i>Leuconostocs</i>	78	0,162	0,0003
Gredos	Lactococos	186	0,493	0,0000
	Enterococos	74	0,553	0,0000
	Lactobacilos	55	0,081	0,0349
	<i>Leuconostocs</i>	21	0,082	0,2084
Total	Lactococos	355	0,434	0,0000
	Enterococos	133	0,526	0,0000
	Lactobacilos	86	0,000	0,9040
	<i>Leuconostocs</i>	99	0,062	0,0150

3.1.1.2.2. Actividad proteolítica sobre soluciones de caseína

Se caracterizó la actividad proteolítica de 34 aislamientos de lactococos de queso Manchego y 45 aislamientos de lactococos de queso de Gredos. Se seleccionó este género por presentar la mayor actividad proteolítica en leche, con incrementos de absorbancia a 340 nm superiores a 0,25. Los resultados se indican en las Tablas 6 y 7.

Se observó que de los 34 aislamientos de queso Manchego estudiados 26 degradaban totalmente la β -caseína después de 6 h de incubación a 30°C y 8 de ellos sólo la degradaban parcialmente en el mismo tiempo de incubación. En cuanto a la degradación de α_{s1} -caseína, únicamente 1 de los 34 aislamientos la degradó totalmente, 4 aislamientos la degradaron parcialmente y los 29 restantes no degradaron esta fracción de caseína.

De los 45 aislamientos de queso de Gredos estudiados, 41 degradaron la β -caseína totalmente y 4 la degradaron parcialmente. Sin embargo, ninguno de estos aislamientos degradó totalmente la α_{s1} -caseína y únicamente 5 de ellos fueron capaces de degradarla de forma parcial. Los 40 restantes no mostraron capacidad de degradación de esta fracción caseínica.

La β -caseína mostró, por tanto, ser mejor sustrato para las proteinasas de las bacterias lácticas estudiadas que la α_{s1} -caseína.

El patrón de degradación de la β -caseína durante 6 h de incubación a 30°C con el tiempo en los 12 lactococos analizados era similar en todos los casos. Se produjeron 4 productos intermedios que se degradaron progresivamente y provocaban la acumulación del de menor peso molecular. En la Figura 1 se muestra el patrón de degradación de esta fracción caseínica originada por los aislamientos *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 169 y *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 174.

Tabla 6. Degradación de las caseínas por 34 aislamientos de lactococos de queso Manchego tras 6 h de incubación a 30°C.

Aislamiento	α_{s1} -caseína	β -caseína	Aislamiento	α_{s1} -caseína	β -caseína
ESI 149	-	++	ESI 225	-	++
ESI 150	-	++	ESI 226	-	++
ESI 151	++	++	ESI 228	-	++
ESI 153	-	+	ESI 229	-	++
ESI 158	-	++	ESI 230	+	++
ESI 169	+	++	ESI 231	-	++
ESI 174	+	++	ESI 232	-	+
ESI 175	-	++	ESI 240	-	+
ESI 196	-	++	ESI 241	-	+
ESI 197	-	++	ESI 242	-	++
ESI 203	-	++	ESI 287	-	++
ESI 204	-	++	ESI 295	-	++
ESI 205	-	+	ESI 408	-	++
ESI 216	-	+	ESI 427	-	++
ESI 221	-	+	ESI 718	+	++
ESI 222	-	++	ESI 720	-	++
ESI 224	-	+	ESI 721	-	++

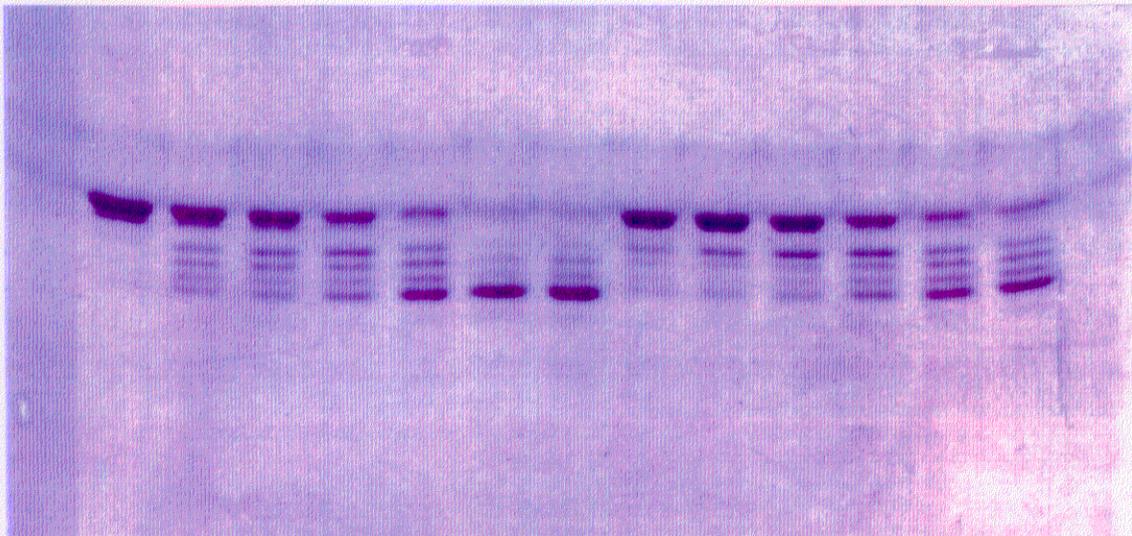
++ Hidrólisis total; + Hidrólisis parcial

Tabla 7. Degradación de las caseínas por 45 aislamientos de lactococos de queso de Gredos tras 6 h de incubación a 30°C.

Aislamiento	α_{s1} -caseína	β -caseína	Aislamiento	α_{s1} -caseína	β -caseína
ESI 445	-	++	ESI 561	-	+
ESI 450	-	++	ESI 563	-	++
ESI 454	-	++	ESI 564	-	++
ESI 456	-	+	ESI 566	-	++
ESI 458	-	+	ESI 567	-	++
ESI 466	-	++	ESI 568	-	++
ESI 471	-	++	ESI 573	-	++
ESI 484	-	+	ESI 575	-	++
ESI 491	-	++	ESI 576	-	++
ESI 498	-	++	ESI 577	-	++
ESI 506	+	++	ESI 582	-	++
ESI 509	+	++	ESI 583	-	++
ESI 514	-	++	ESI 606	-	++
ESI 515	+	++	ESI 610	-	++
ESI 516	-	++	ESI 619	-	++
ESI 521	-	++	ESI 621	-	++
ESI 523	-	++	ESI 623	-	++
ESI 534	-	++	ESI 627	-	++
ESI 531	-	++	ESI 630	-	++
ESI 532	-	++	ESI 669	-	++
ESI 535	-	++	ESI 687	-	++
ESI 548	+	++	ESI 688	-	++
ESI 556	+	++			

++ Hidrólisis total; + Hidrólisis parcial

Figura 1. Degradación de β -caseína por *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 169 y por *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 174.



Calle 1: β -caseína a las 0 h de incubación; calles 2, 3, 4, 5, 6 y 7: β -caseína después de 15, 30, 60, 120, 240 y 360 min de incubación con *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 169 a 30°C; calles 8, 9, 10, 11, 12 y 13: β -caseína después de 15, 30, 60, 120, 240 y 360 min de incubación con *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 174.

3.1.1.3. Actividad peptidásica

Se determinó la actividad aminopeptidásica de 128 aislamientos de lactococos, 38 aislamientos de lactobacilos y 9 aislamientos de leuconostocs de queso Manchego y de Gredos. La distribución de estos aislamientos según su actividad se indica en las Tablas 8, 9 y 10, respectivamente.

En todos los casos la actividad fue más elevada frente a Lys-pNA y Leu-pNA que frente a Gly-pNA y Ala-pNA. No se detectó actividad frente a Pro-pNA y Glu-pNA.

Las actividades registradas frente a Lys-pNA y Leu-pNA fueron, en general, bajas. Únicamente 17 de los 128 aislamientos de lactococos estudiados mostraron actividades superiores a 50 U/mg frente a Lys-pNA o Leu-pNA. De los 38 aislamientos de lactobacilos analizados, sólo 8 mostraron actividad aminopeptidásica frente a Lys-pNA o Leu-pNA superior a 50 U/mg y únicamente 2 de los aislamientos de leuconostocs presentaron valores de actividad superiores a este valor. Las actividades aminopeptidásicas frente a los distintos sustratos de estos 27 aislamientos más activos frente a Lys-pNA se indica en la Tabla 11. La mayor actividad registrada fue 177 U/mg por *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESI 207 frente a Leu-pNA.

Se seleccionaron estos 27 aislamientos para el estudio de las actividades dipeptidil-aminopeptidásica, endopeptidásica, dipeptidásica, tripeptidásica y carboxipeptidásica.

Los resultados de actividad dipeptidil-aminopeptidásica para lactococos, lactobacilos y leuconostocs se recogen en las Tablas 12, 13 y 14, respectivamente. Se observó que la actividad dipeptidil-aminopeptidásica fue mayor cuando se usó Arg-Pro-pNA o Gly-Pro-pNA como sustrato que cuando se utilizó Gly-Phe-pNA. Con el último sustrato, la actividad fue escasa o nula, siendo 9 U/mg la mayor actividad detectada. El valor más alto fue de 133 U/mg frente a Gly-Pro-pNA (actividad X-prolil-dipeptidil-aminopeptidásica) por un aislamiento de *L. lactis* de queso de Gredos. Tanto los lactobacilos como los leuconostocs presentaron niveles de actividad inferiores.

Tabla 8. Distribución de 128 aislamientos de lactococos según su actividad aminopeptidásica¹.

Actividad	Sustrato					
	Gly-pNA	Ala-pNA	Leu-pNA	Lys-pNA	Glu-pNA	Pro-pNA
0-20	128	126	125	31	127	128
21-40	0	2	3	68	1	0
41-60	0	0	0	21	0	0
61-80	0	0	0	5	0	0
81-100	0	0	0	2	0	0
>100	0	0	0	1	0	0

¹ Expresada en nmoles de nitroanilina liberada por minuto y por mg de proteína.

Tabla 9. Distribución de 38 aislamientos de lactobacilos según su actividad aminopeptidásica¹.

Actividad	Sustrato					
	Gly-pNA	Ala-pNA	Leu-pNA	Lys-pNA	Glu-pNA	Pro-pNA
0-20	37	37	34	11	38	38
21-40	0	1	3	16	0	0
41-60	0	0	0	8	0	0
61-80	1	0	0	2	0	0
81-100	0	0	0	0	0	0
>100	0	0	1	1	0	0

¹ Expresada en nmoles de nitroanilina liberada por minuto y por mg de proteína.

Tabla 10. Distribución de 9 aislamientos de leuconostocs según su actividad aminopeptidásica¹.

Actividad	Sustrato					
	Gly-pNA	Ala-pNA	Leu-pNA	Lys-pNA	Glu-pNA	Pro-pNA
0-20	9	9	8	2	9	9
21-40	0	0	1	3	0	0
41-60	0	0	0	3	0	0
61-80	0	0	0	1	0	0
81-100	0	0	0	0	0	0
>100	0	0	0	0	0	0

¹ Expresada en nmoles de nitroanilina liberada por minuto y por mg de proteína.

Tabla 11. Actividad aminopeptidásica¹ de los extractos libres de células de 27 aislamientos de lactococos, lactobacilos y leuconostocs con actividad específica frente a Lys-pNA igual o mayor de 50 U/mg.

Género	Aislamiento	Sustrato					
		Gly-pNA	Ala-pNA	Leu-pNA	Lys-pNA	Glu-pNA	Pro-pNA
<i>Lactococcus</i>	ESI 169	0	2	12	68	0	2
	ESI 179	0	2	13	53	1	1
	ESI 197	2	7	11	63	0	0
	ESI 287	3	2	14	61	0	1
	ESI 292	0	0	11	62	1	1
	ESI 345	1	6	11	53	0	0
	ESI 392	2	3	22	119	1	2
	ESI 413	2	6	19	86	2	3
	ESI 432	2	4	13	58	4	1
	ESI 441	2	4	8	60	2	12
	ESI 493	0	11	8	51	2	4
	ESI 508	0	2	14	57	0	0
	ESI 564	4	4	16	63	0	3
	ESI 569	0	0	13	54	1	1
	ESI 583	0	2	1	73	0	2
	ESI 623	4	4	17	76	5	2
	ESI 665	1	8	16	51	2	1
<i>Lactobacillus</i>	ESI 38	2	2	20	50	1	1
	ESI 45	3	9	16	57	4	5
	ESI 144	10	33	29	131	0	0
	ESI 207	2	14	177	141	0	3
	ESI 662	9	16	21	56	6	3
	ESI 706	4	11	24	75	6	2
	ESI 707	1	1	21	69	1	3
	ESI 710	2	9	19	58	4	3
<i>Leuconostoc</i>	ESI 598	1	9	13	51	0	1
	ESI 712	5	19	26	69	0	3

¹ Expresada en nmoles de nitroanilina liberada por minuto y por mg de proteína.

Tabla 12. Actividad dipeptidil aminopeptidásica¹ de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.

Aislamiento	Sustrato		
	Arg-Pro-pNA	Gly-Pro-pNA	Gly-Phe-pNA
ESI 169	29	37	0
ESI 179	25	26	0
ESI 197	6	2	0
ESI 287	55	57	0
ESI 292	62	74	2
ESI 345	69	72	0
ESI 392	55	59	2
ESI 413	33	34	0
ESI 432	30	30	1
ESI 441	54	55	0
ESI 493	47	53	0
ESI 508	27	21	0
ESI 564	29	28	2
ESI 569	18	20	0
ESI 583	27	32	0
ESI 623	118	133	0
ESI 665	3	1	0

¹ Expresada en nmoles de nitroanilina liberada por min y por mg de proteína.

Tabla 13. Actividad dipeptidil aminopeptidásica¹ de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.

Aislamiento	Sustrato		
	Arg-Pro-pNA	Gly-Pro-pNA	Gly-Phe-pNA
ESI 38	9	7	0
ESI 45	18	16	0
ESI 144	17	7	0
ESI 207	30	53	9
ESI 662	15	18	0
ESI 706	26	38	1
ESI 707	6	9	0
ESI 710	14	18	2

¹ Expresada en nmoles de nitroanilina liberada por min y por mg de proteína.

Tabla 14. Actividad dipeptidil aminopeptidásica¹ de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.

Aislamiento	Sustrato		
	Arg-Pro-pNA	Gly-Pro-pNA	Gly-Phe-pNA
ESI 598	5	4	4
ESI 712	4	2	2

¹ Expresada en nmoles de nitroanilina liberada por min y por mg de proteína.

La actividad endopeptidásica fue baja con los tres sustratos empleados, tanto en los aislamientos de lactococos (Tabla 15) como en los de lactobacilos (Tabla 16) y los leuconostocs (Tabla 17). Sólo 3 de los 27 aislamientos estudiados, 1 lactococo y 2 lactobacilos, mostraron una actividad superior a 1 U/mg frente a alguno de los sustratos analizados. La mayor actividad registrada fue 4 U/mg y correspondió al aislamiento de queso Manchego *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESI 207. Ninguno de los aislamientos del género *Leuconostoc* mostró valores de actividad superiores a 1 U/mg.

La actividad dipeptidásica resultó ser muy baja o nula cuando se utilizó como sustrato Ala-Met en la mezcla de reacción, detectándose las actividades más elevadas frente al sustrato Ala-His, tanto en el caso de los lactococos (Tabla 18) como en el de los lactobacilos (Tabla 19) y los leuconostocs (Tabla 20). Los lactococos y los leuconostocs mostraron mayor actividad frente al sustrato Pro-Phe que frente al sustrato Pro-Ile. Sin embargo, los lactobacilos mostraron mayor actividad frente al sustrato Pro-Ile. La actividad más elevada registrada fue 49 U/mg y correspondió al aislamiento *L. plantarum* ESI 144 de quesos de Gredos.

La actividad tripeptidásica de los extractos libres de células de los diferentes aislamientos fue más elevada que la actividad dipeptidásica en el caso de los lactobacilos (Tabla 22) y en los leuconostocs (Tabla 23). En los lactococos (Tabla 21), en general, la actividad tripeptidásica también resultó ser más elevada que la actividad dipeptidásica, aunque en algunos aislamientos la actividad dipeptidásica resultó muy superior. La actividad tripeptidásica fue, en general, mayor frente al sustrato Leu-Leu-Tyr que frente a Leu-Gly-Phe. La actividad más elevada registrada fue 135 U/mg detectada en *L. plantarum* ESI 144 aislado de queso de Gredos.

En cuanto a la actividad carboxipeptidásica (Tablas 24, 25 y 26), fue muy baja o nula en todos los aislamientos estudiados con los tres sustratos ensayados, siendo 5 U/mg la actividad más elevada detectada.

Tabla 15. Actividad endopeptidásica¹ de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.

Aislamiento	Sustrato		
	Suc-Phe-pNA	Glu-Phe-pNA	Ben-Arg-pNA
ESI 169	0	0	0
ESI 179	0	0	0
ESI 197	1	1	1
ESI 287	0	1	0
ESI 292	0	0	0
ESI 345	0	1	0
ESI 392	0	0	0
ESI 413	0	2	1
ESI 432	0	0	0
ESI 441	0	0	0
ESI 493	1	1	0
ESI 508	1	1	0
ESI 564	0	0	1
ESI 569	0	0	1
ESI 583	0	0	0
ESI 623	1	1	0
ESI 665	1	0	0

¹ Expresada en U de actividad siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 410 nm de 0,01 por h y por mg de proteína.

Tabla 16. Actividad endopeptidásica¹ de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.

Aislamiento	Sustrato		
	Suc-Phe-pNA	Glu-Phe-pNA	Ben-Arg-pNA
ESI 38	0	0	0
ESI 45	2	2	0
ESI 144	0	1	0
ESI 207	0	4	0
ESI 662	0	0	0
ESI 706	0	1	0
ESI 707	1	1	1
ESI 710	0	1	0

¹ Expresada en U de actividad siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 410 nm de 0,01 por h y por mg de proteína.

Tabla 17. Actividad endopeptidásica¹ de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.

Aislamiento	Sustrato		
	Suc-Phe-pNA	Glu-Phe-pNA	Ben-Arg-pNA
ESI 598	0	0	0
ESI 712	1	0	0

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 410 nm de 0,01 por h.

Tabla 18. Actividad dipeptidásica¹ de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.

Aislamiento	Sustrato			
	Pro-Phe	Ala-His	Pro-Ile	Ala-Met
ESI 169	4	0	3	0
ESI 179	11	3	2	0
ESI 197	6	12	2	0
ESI 287	8	13	3	1
ESI 292	10	8	3	1
ESI 345	13	4	4	4
ESI 392	11	0	2	1
ESI 413	11	6	3	1
ESI 432	8	2	2	0
ESI 441	1	16	0	0
ESI 493	3	19	1	0
ESI 508	9	22	4	2
ESI 564	8	0	3	1
ESI 569	15	14	3	1
ESI 583	6	25	13	2
ESI 623	2	44	1	1
ESI 665	1	3	0	0

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 19. Actividad dipeptidásica¹ de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.

Aislamiento	Sustrato			
	Pro-Phe	Ala-His	Pro-Ile	Ala-Met
ESI 38	1	16	12	1
ESI 45	1	20	5	3
ESI 144	5	49	6	0
ESI 207	11	0	14	4
ESI 662	1	17	2	1
ESI 706	0	2	0	4
ESI 707	0	1	0	0
ESI 710	0	0	1	3

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 20. Actividad dipeptidásica¹ de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.

Aislamiento	Sustrato			
	Pro-Phe	Ala-His	Pro-Ile	Ala-Met
ESI 598	1	1	0	0
ESI 712	1	39	0	1

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una U la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 21. Actividad tripeptidásica¹ de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.

Aislamiento	Sustrato	
	Leu-Gly-Phe	Leu-Leu-Tyr
ESI 169	4	1
ESI 179	11	84
ESI 197	5	14
ESI 287	8	18
ESI 292	9	9
ESI 345	12	11
ESI 392	22	0
ESI 413	14	9
ESI 432	6	0
ESI 441	4	25
ESI 493	3	22
ESI 508	8	5
ESI 564	7	0
ESI 569	14	0
ESI 583	0	27
ESI 623	20	43
ESI 665	0	51

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 22. Actividad tripeptidásica¹ de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.

Aislamiento	Sustrato	
	Leu-Gly-Phe	Leu-Leu-Tyr
ESI 38	3	20
ESI 45	8	52
ESI 144	8	135
ESI 207	5	3
ESI 662	5	0
ESI 706	9	53
ESI 707	5	17
ESI 710	0	20

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 23. Actividad tripeptidásica¹ de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.

Aislamiento	Sustrato	
	Leu-Gly-Phe	Leu-Leu-Tyr
ESI 598	7	12
ESI 712	4	55

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 24. Actividad carboxipeptidásica¹ de los extractos libres de células de 17 aislamientos de lactococos.

Aislamiento	Sustrato		
	CBZ-Gly-Phe	CBZ-Glu-Tyr	Hip-Arg
ESI 169	0	0	0
ESI 179	0	1	0
ESI 197	0	0	0
ESI 287	0	0	0
ESI 292	0	0	0
ESI 345	1	0	0
ESI 392	0	1	0
ESI 413	0	1	1
ESI 432	0	0	0
ESI 441	1	1	0
ESI 493	2	0	1
ESI 508	0	0	0
ESI 564	0	0	0
ESI 569	0	1	0
ESI 583	1	1	5
ESI 623	1	0	0
ESI 665	0	0	1

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 25. Actividad carboxipeptidásica¹ de los extractos libres de células de 9 aislamientos de lactobacilos.

Aislamiento	Sustrato		
	CBZ-Gly-Phe	CBZ-Glu-Tyr	Hip-Arg
ESI 38	0	0	0
ESI 45	1	0	0
ESI 144	2	1	0
ESI 207	0	1	0
ESI 662	0	0	0
ESI 706	0	0	1
ESI 707	0	0	0
ESI 710	0	0	1

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una U la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

Tabla 26. Actividad carboxipeptidásica¹ de los extractos libres de células de 2 aislamientos de leuconostocs.

Aislamiento	Sustrato		
	CBZ-Gly-Phe	CBZ-Glu-Tyr	Hip-Arg
ESI 598	0	0	2
ESI 712	1	0	5

¹ Expresada en U de actividad por mg de proteína, siendo una unidad la cantidad de enzima que provoca un incremento de absorbancia a 507 nm de 0,1 en 15 min.

3.1.2. Discusión

3.1.2.1. Actividad acidificante

La capacidad de producir ácido es una de las propiedades más importantes de las bacterias lácticas utilizadas en la elaboración de quesos. Un criterio bastante utilizado en la selección de fermentos es la determinación del pH alcanzado en leche inoculada al 1% e incubada 6 h a 30°C para los microorganismos mesófilos. En el caso de los lactococos, un descenso del pH de la leche de ~6,6 a 5,2 se considera indicativo de un buen productor de ácido.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad acidificante de 733 aislamientos, podemos considerar que las bacterias lácticas procedentes de quesos de leche cruda presentan, en general, una producción de acidez en leche baja, especialmente si se comparan con los fermentos comerciales. Otros trabajos sobre bacterias lácticas aisladas de quesos de leche cruda, como queso de Cabrales (Núñez y Medina, 1979), queso de La Serena (Fernández del Pozo, 1991) y queso de Arzúa (Centeno *et al.*, 1996) confirman los resultados obtenidos en el presente trabajo. Requena (1991) también comprobó una mayor actividad acidificante en lactococos procedentes de queso Majorero que entre los lactobacilos del mismo origen.

La capacidad acidificante de los distintos géneros de bacterias lácticas puede deberse a los requerimientos nutricionales de éstas y a su actividad proteolítica, que determinará la accesibilidad de la fuente de nitrógeno para el desarrollo microbiano. Morishita *et al.* (1981) observaron que el crecimiento de los lactococos era mayor que el de los lactobacilos en presencia de los mismos sustratos.

3.1.2.2. Actividad proteolítica

La presencia de un sistema proteolítico que permita a una bacteria láctica desarrollarse en leche es otra característica importante de los fermentos lácticos desde un punto de vista tecnológico. Este sistema proteolítico es también fundamental en la maduración del queso.

Entre nuestros aislamientos, los lactococos presentaron los valores más altos de proteólisis en leche, seguidos de los enterococos. Los lactobacilos y los leuconostocs presentaron una actividad proteolítica muy baja.

De 20 aislamientos de *L. lactis* subsp. *lactis* de queso de Cabrales, sólo 5 mostraron actividad proteolítica en leche, con incrementos de absorbancia a 340 nm entre 0,14 y 0,17 (Mayo *et al.*, 1990). Esta actividad sólo se detectó en los aislamientos Lac¹ y fue comparable a la obtenida por los mismos autores con 4 fermentos comerciales. Church *et al.* (1983) comprobaron un incremento de ~0,2 con *L. lactis* subsp. *lactis* C2 incubado en leche a 22°C. Requena (1991) también identificó a los lactococos como el grupo más proteolítico entre sus aislamientos de queso de cabra. Posiblemente, las condiciones de incubación empleadas en este trabajo no eran las más adecuadas para estimar la actividad proteolítica de los lactobacilos mesófilos, ya que Khalid y Marth (1990) observaron que un tiempo mínimo de incubación de 74 h a 37°C era necesario para que *L. plantarum* y *L. casei* iniciaran la hidrólisis de caseínas de la leche. En cuanto a los leuconostocs, su actividad proteolítica es muy baja o nula (Millière *et al.*, 1989).

La β -caseína resultó ser mejor sustrato para las proteinasas de las bacterias lácticas estudiadas que la α_{s1} -caseína. La mayoría de los lactococos degradaron totalmente la β -caseína en 6 h a 30°C y el resto lo hicieron parcialmente. Sin embargo, la α_{s1} -caseína fue degradada por una proporción muy baja de los aislamientos. Este mismo resultado fue obtenido por Requena (1991) en el estudio de bacterias lácticas procedentes de queso de cabra. También estudios realizados por otros autores en lactococos (Geis *et al.*, 1985; Bockelmann *et al.*, 1989; Smid *et al.*, 1991) indican que la β -caseína es degradada más fácilmente que la α_{s1} -caseína, aunque existen cepas capaces de degradar esta última fracción.

El patrón de degradación de la β -caseína por los 12 lactococos analizados fue similar en todos los casos, y semejante al obtenido por Hill y Gasson (1986), que observaron la degradación de β -caseína por la cepa *S. lactis* MG 1299 a partir de los 5 min de incubación, con un patrón de degradación formado por 4 fracciones. Con dicha

cepa la degradación continuó, obteniéndose péptidos de menor peso molecular hasta su completa hidrólisis después de 8 h de incubación.

3.1.2.3. Actividad peptidásica

Los péptidos de tamaño pequeño y los aminoácidos están asociados con los cambios en la textura y el desarrollo del aroma y sabor del queso. Por otra parte, péptidos derivados de la β -caseína y de la α_{s1} -caseína han sido implicados en el defecto del sabor amargo del queso. Estos péptidos pueden acumularse en el queso si su degradación por las peptidasas es baja. En esta degradación juega un papel importante el sistema peptidásico de las bacterias lácticas.

Las actividades peptidásicas de estos nuevos aislamientos de bacterias lácticas fueron en general reducidas. La actividad aminopeptidásica fue superior frente a los sustratos Lys-pNA y Leu-pNA.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Requena (1991), quien también comprobó que las actividades aminopeptidásicas eran más elevadas frente a Leu-pNA y Lys-pNA que frente al resto de los sustratos en aislamientos de bacterias lácticas de quesos de leche de cabra. Sin embargo, las actividades detectadas fueron más elevadas y se localizaron principalmente en la fracción intracelular. Los valores de actividad registrados en nuestro trabajo son similares a los encontrados por Sasaki *et al.* (1995) en diversas cepas de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

El Soda y Desmazeaud (1982) observaron actividad aminopeptidásica en *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* y *L. acidophilus*, con diferencias de especificidad entre las distintas especies y mayor afinidad frente a Leu-pNA que frente a Lys-pNA. Frey *et al.* (1986b) compararon la actividad aminopeptidásica en distintas especies de lactobacilos procedentes de yogur y de fermentos de queso. *L. helveticus* presentó mayor actividad que *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. lactis* y *L. jugurti*. Los valores de actividad fueron, en todos los casos, superiores a los encontrados en el presente trabajo. También fue elevada la actividad aminopeptidásica de un aislamiento de *L. casei* de queso investigado por Arora y Lee (1990). Estos autores encontraron mayor actividad frente a Leu-pNA que frente a Lys-pNA, Met-pNA, Arg-pNA, Ala-pNA, Val-pNA, Pro-pNA

y Glu-pNA. El Abboudi *et al.* (1991b) relacionaron el empleo de determinadas cepas de *L. casei* en la fabricación de queso con el amargor de éstos. La actividad aminopeptidásica de las cepas que no provocaban amargor fue mayor que la de la cepa que daba lugar a la aparición de sabor amargo en el queso.

Kamaly y Marth (1988) estudiaron la actividad peptidásica en extractos libres de células de mutantes Lac⁻Prf⁻ de lactococos, encontrando niveles más altos de actividad peptidásica que en las respectivas parentales. Detectaron la mayor actividad aminopeptidásica sobre Lys-pNA seguida de Leu-pNA. Apuntaron la posibilidad de utilizar las cepas con mayor actividad como adjuntos al fermento láctico con capacidad desamargante en la elaboración de queso.

La baja actividad aminopeptidásica observada en nuestro trabajo frente a Pro-pNA está de acuerdo con los datos obtenidos por otros autores (Hickey *et al.*, 1983; El Abboudi *et al.*, 1991b; Arora y Lee, 1990).

En cuanto a la actividad dipeptidil-aminopeptidásica, El Abboudi *et al.* (1991b) obtuvieron resultados similares en la utilización de los distintos sustratos por *L. casei*, con menor actividad sobre Gly-Phe-pNA. La actividad dipeptidil-aminopeptidásica de nuestros aislamientos fue, en general, mayor entre lactococos que en lactobacilos y leuconostocs. La actividad X-prolil-dipeptidil aminopeptidásica más elevada fue de 133 U/mg frente a Gly-Pro-pNA, para un aislamiento de *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 623. Por el contrario, la actividad fue muy baja en los 2 aislamientos del género *Leuconostoc* estudiados. Nuestros resultados están de acuerdo con los observados por Sasaki *et al.* (1995) al estudiar diversas cepas de lactococos y lactobacilos procedentes de muestras de leche cruda y de productos lácteos.

Khalid *et al.* (1991) no detectaron actividad endopeptidásica en ninguna de las 3 cepas de *L. helveticus* y de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* estudiadas. En nuestro trabajo los niveles de esta actividad fueron muy bajos.

La actividad dipeptidásica resultó más elevada frente a Ala-His que frente a Ala-Met. Arora y Lee (1990) encontraron una actividad alta frente a Ala-Met en *L. casei*. Sin embargo, Khalid *et al.* (1991) hallaron actividad dipeptidásica frente a Ala-His en *L.*

helveticus y en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Entre los aislamientos estudiados en el presente trabajo, la actividad fue mayor frente a Pro-Phe que frente a Pro-Ile, con excepción de los lactobacilos.

La actividad tripeptidásica de nuestros aislamientos fue superior a la dipeptidásica. El Abboudi *et al.* (1991b) observaron que las cepas desamargantes de lactobacilos presentaban mayor actividad dipeptidásica y tripeptidásica que las cepas no amargantes, así como mayor actividad tripeptidásica que dipeptidásica en *L. casei*. Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos por Arora y Lee (1990), que encontraron mayor actividad dipéptidásica que tripeptidásica en 6 cepas de *L. casei*. La actividad más elevada registrada entre nuestros aislamientos fue de 135 U/mg para *L. plantarum* ESI 144.

La actividad carboxipeptidásica de nuestros aislamientos frente a 3 sustratos también fue muy baja. Arora y Lee (1990) no detectaron actividad carboxipeptidásica en 6 aislamientos de *L. casei* sobre 7 sustratos, ni El Soda y Desmazeaud (1982) en *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* y *L. bulgaricus*. Sin embargo, Abo-Elnaga y Plapp (1987) sí encontraron esta actividad enzimática en *L. casei*, con una especificidad amplia. Los extractos libres de células de 11 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* empleadas como fermentos en la elaboración de queso no hidrolizaron los sustratos CBZ-Gly-Val ni CBZ-Ala-Glu (Kaminogawa *et al.*, 1984b). En el género *Lactococcus* no ha sido descrita la existencia de actividad carboxipeptidásica, por lo que la escasa actividad encontrada en los lactococos estudiados en este trabajo podría deberse a la capacidad que tienen ciertas endopeptidasas de hidrolizar los sustratos de las carboxipeptidasas (Sasaki *et al.*, 1995).

3.2. EMPLEO DE BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS COMO FERMENTO EN LA ELABORACIÓN DE QUESO MANCHEGO

3.2.1. Resultados

3.2.1.1. Características generales

El contenido en microorganismos totales y lactobacilos de queso Manchego elaborado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con un fermento comercial (queso control) o con el fermento ECLAIR se recoge en la Tabla 27.

No se registraron diferencias significativas entre los niveles de microorganismos totales de los quesos de leche cruda y de leche pasteurizada. En los quesos con el fermento ECLAIR, los microorganismos totales alcanzaron valores significativamente ($P < 0,001$) más altos que en los quesos control. En los quesos de leche cruda no se detectó esta diferencia entre los fermentos, mientras que en los quesos de leche pasteurizada elaborados con el fermento ECLAIR, los microorganismos totales alcanzaron valores más elevados durante toda la maduración.

Se determinaron los niveles de lactobacilos, como indicadores de la flora láctica del queso no añadida con el fermento. Los lactobacilos presentaron niveles más altos ($P < 0,001$) en los quesos de leche cruda que en los de leche pasteurizada y en los quesos control que en los elaborados con el fermento ECLAIR. En los quesos de leche cruda no se detectó esta diferencia, que fue significativa ($P < 0,05$) en los quesos de leche pasteurizada, con mayor número de lactobacilos en los quesos control, elaborados con el fermento comercial.

Se registró un pH significativamente ($P < 0,001$) menor en los quesos de leche pasteurizada y en los quesos con fermento ECLAIR (Tabla 28). Tanto en los quesos de leche cruda como en los quesos de leche pasteurizada, los valores de pH fueron significativamente ($P < 0,01$) más bajos cuando se empleó el fermento ECLAIR en la fabricación del queso. El extracto seco de los quesos de leche pasteurizada fue significativamente ($P < 0,05$) superior al observado en los quesos de leche cruda (Tabla

Tabla 27. Microorganismos totales y lactobacilos (log ufc/g)¹ en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.

	Días	Cruda		Pasteurizada	
		Control	Eclair	Control	Eclair
Viables totales	1	8,71	9,18	9,02	9,42
	15	8,07	8,42	7,70	8,68 ^a
	30	7,85	8,02	7,27	8,36 ^a
	45	7,88	7,80	7,05	8,01 ^a
	60	7,76	7,47	6,60	7,31
Lactobacilos	1	5,33	5,10	1,15	1,40
	15	7,39	7,40	6,68	4,45 ^a
	30	7,91	7,77	6,41	5,82
	45	7,99	7,75	6,51	5,50
	60	7,49	7,84	6,19	6,58

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente diferente del control ($P < 0,05$).

Tabla 28. Valores de pH¹ y extracto² seco en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.

	Días	Cruda		Pasteurizada	
		Control	Eclair	Control	Eclair
pH	1	5,19	5,09 ^a	5,07	5,04
	15	5,02	5,00	4,96	4,93
	30	4,92	4,88	4,97	4,85 ^a
	45	4,97	4,96	4,97	4,87 ^a
	60	5,15	4,98 ^a	5,06	4,94 ^a
Extracto seco, %	1	53,87	54,31	51,67	53,31 ^a
	15	56,23	58,86 ^a	55,58	58,14 ^a
	30	57,02	60,10 ^a	58,55	60,06 ^a
	45	58,65	62,87 ^a	60,49	63,31 ^a
	60	59,53	62,92 ^a	61,33	64,36 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

² Media de determinaciones realizadas por triplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente diferente del control ($P < 0,05$).

28). Como consecuencia de la mayor actividad acidificante del fermento ECLAIR, los quesos con dicho fermento mostraron valores de extracto seco significativamente ($P < 0,001$) superiores a los quesos control, hecho observado tanto en los quesos de leche cruda como en los quesos de leche pasteurizada.

3.2.1.2. Proteolisis

Los niveles de α_s -caseína y de β -caseína residuales en los quesos de leche cruda fueron significativamente más altos ($P < 0,001$) que en los quesos de leche pasteurizada (Tabla 29). La α_s -caseína se degradó más intensamente que la β -caseína a lo largo de la maduración. Tratando conjuntamente los resultados obtenidos en quesos de leche cruda y de leche pasteurizada, los quesos con el fermento ECLAIR registraron niveles de α_s -caseína residual significativamente superiores ($P < 0,01$) a los encontrados en queso control. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la degradación de β -caseína por ambos fermentos. En los quesos de leche cruda los niveles residuales de ambas caseínas a los 60 d fueron similares, mientras que en los quesos de leche pasteurizada elaborados con fermento ECLAIR se detectaron porcentajes más elevados ($P < 0,05$) de α_s -caseína y β -caseína residual que en los quesos control.

En los quesos de leche cruda se alcanzaron valores significativamente ($P < 0,001$) más elevados de N soluble a pH 4,6 y N soluble en PTA que en los quesos de leche pasteurizada (Tabla 30), mientras que el N soluble en TCA presentó niveles más bajos ($P < 0,001$). El tipo de fermento afectó significativamente ($P < 0,001$) a las concentraciones de N soluble a pH 4,6 y N soluble en TCA, con valores más elevados en los quesos control, mientras que el N soluble en PTA no se vio afectado por el fermento utilizado. Las diferencias en N soluble a pH 4,6 entre los quesos control y los quesos con fermento ECLAIR fueron ya significativas ($P < 0,05$) a las 24 h y se mantuvieron durante todo el periodo de maduración en los de leche pasteurizada. Los niveles de N soluble en TCA fueron significativamente superiores ($P < 0,05$) en los quesos control de leche pasteurizada, mientras que no se detectaron diferencias en los valores de esta fracción en los quesos de leche cruda elaborados con distinto fermento.

Tabla 29. Caseínas residuales¹ en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.

	Días	Cruda		Pasteurizada	
		Control	Eclair	Control	Eclair
α_s -caseína	1	94,8	71,2 ^a	80,4	82,2
	15	65,7	63,2	32,3	49,7 ^a
	30	52,9	49,6	24,6	37,4 ^a
	45	48,7	46,7	18,3	29,2 ^a
	60	30,6	37,3	15,6	25,9 ^a
β -caseína	1	49,1	45,1	50,8	46,4 ^a
	15	50,0	44,5 ^a	40,1	42,2 ^a
	30	50,4	45,0 ^a	39,9	45,7 ^a
	45	54,5	46,6 ^a	38,3	45,6 ^a
	60	46,0	45,7 ^a	36,4	43,7 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del contenido en α_s -caseína o β -caseína de la leche.

^a Significativamente diferente del control (P<0,05).

Tabla 30. Fracciones nitrogenadas¹ en queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.

	Días	Cruda		Pasteurizada	
		Control	Eclair	Control	Eclair
N sol a pH 4,6	1	10,88	9,40	11,27	9,98 ^a
	15	13,67	11,28 ^a	12,48	10,48 ^a
	30	14,02	13,39	14,08	12,79 ^a
	45	15,81	14,04	14,59	14,23
	60	17,15	15,25	15,64	14,69 ^a
N sol en TCA	1	4,91	4,03	5,33	5,05
	15	5,57	6,51	6,58	6,45
	30	7,25	7,59	7,53	8,15 ^a
	45	8,83	8,98	8,87	8,33 ^a
	60	10,09	9,60	9,99	9,09 ^a
N sol en PTA	1	1,32	1,47	1,37	1,29
	15	1,99	2,19	1,74	1,80
	30	2,38	2,94 ^a	2,17	2,26
	45	3,63	3,44	2,29	2,39
	60	3,91	4,03	2,84	2,42

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del nitrógeno total del queso.

^a Significativamente diferente del control ($P < 0,05$).

3.2.1.3. Péptidos de la fracción soluble en agua

En las Figuras 2 y 3 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante HPLC en fase reversa de la fracción soluble en agua de queso Manchego de 60 d elaborado con distintos fermentos y detección a 214 y 280 nm, respectivamente.

Los niveles de péptidos hidrófobos, hidrófilos y la relación hidrófobos:hidrófilos a 214 y 280 nm se recogen en la Tabla 31.

En general, dichos niveles fueron significativamente ($P < 0,001$) más elevados en los quesos de leche pasteurizada que en los quesos de leche cruda, y en los quesos elaborados con el fermento control que en los quesos con fermento ECLAIR.

A 214 nm, tanto los niveles de péptidos hidrófobos como de hidrófilos resultaron significativamente ($P < 0,001$) más altos en los quesos control, tanto de leche cruda como de leche pasteurizada. Sin embargo, en quesos de leche pasteurizada la relación hidrófobos:hidrófilos resultó superior ($P < 0,001$) en los quesos con fermento ECLAIR, aunque estos valores fueron más altos únicamente durante los primeros 15 d de maduración.

A 280 nm, en los quesos de leche cruda se detectaron niveles superiores ($P < 0,001$) de péptidos hidrófobos y de la relación hidrófobos:hidrófilos en el queso control que en el queso con el fermento ECLAIR. En los quesos de leche pasteurizada los niveles de péptidos hidrófobos ($P < 0,05$) e hidrófilos ($P < 0,001$) resultaron superiores en el queso control, mientras que la relación hidrófobos:hidrófilos fue más alta ($P < 0,01$) en los quesos con fermento ECLAIR hasta los 45 d de maduración.

3.2.1.4. Reología

La fracturabilidad, la firmeza y la elasticidad del queso determinadas a partir de las curvas de compresión obtenidas con una prensa Instron (Tabla 32) resultaron significativamente ($P < 0,001$) superiores en los quesos de leche pasteurizada que en los quesos de leche cruda. Así mismo, aumentaron significativamente ($P < 0,001$) con el

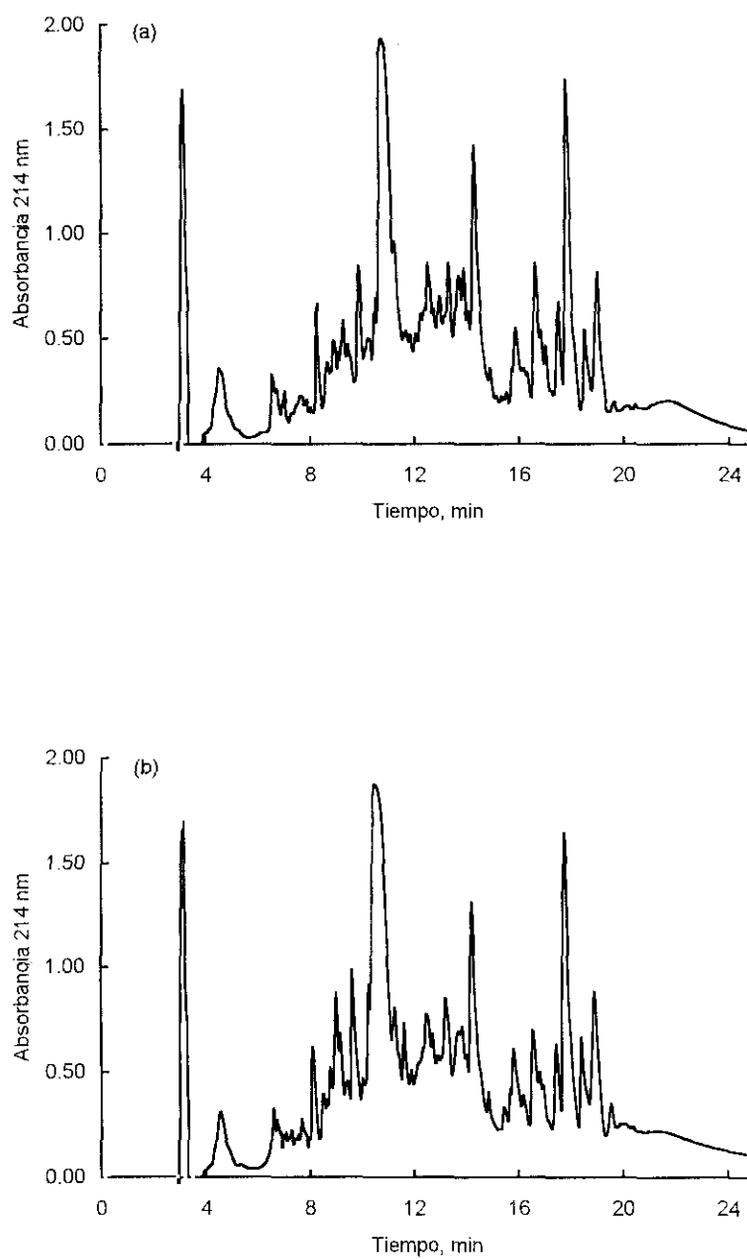


Figura 2. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso Manchego de 60 d elaborado con un fermento comercial (a) y con fermento ECLAIR (b) a 214 nm.

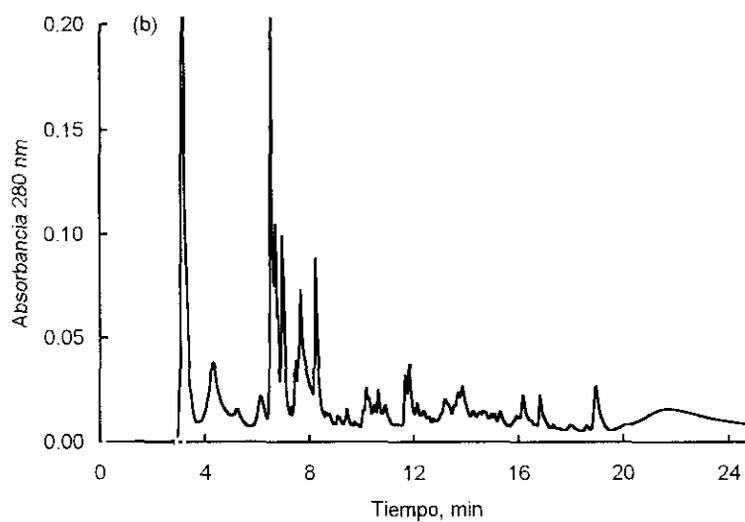
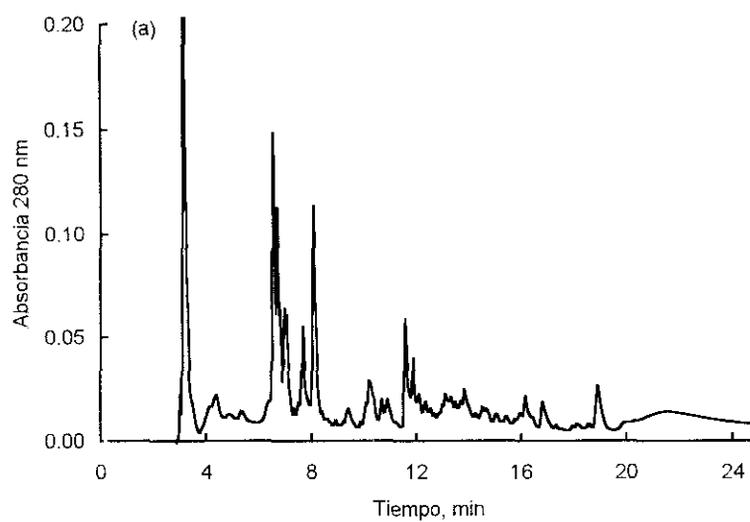


Figura 3. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso Manchego de 60 d elaborado con un fermento comercial (a) y con fermento ECLAIR (b) a 280 nm.

Tabla 31. Peptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos, determinados por HPLC en fase reversa a 214 y 280 nm.

λ	Días	Cruda		Pasteurizada		
		Control	Eclair	Control	Eclair	
214 nm	Hidrófobos	1	52,48	57,50	47,65	64,57 ^a
		15	106,32	88,36 ^a	121,22	104,94 ^a
		30	125,69	90,84 ^a	131,48	108,60 ^a
		45	129,41	111,42 ^a	130,25	122,56 ^a
		60	133,39	93,82 ^a	140,53	126,40 ^a
	Hidrófilos	1	34,33	33,03	42,08	34,31
		15	113,53	102,58 ^a	139,88	110,22 ^a
		30	168,60	140,98 ^a	174,28	138,78 ^a
		45	192,26	174,77 ^a	194,37	171,34 ^a
		60	223,26	190,51 ^a	213,95	179,35 ^a
	Relación	1	1,54	1,75 ^a	1,17	1,88 ^a
		15	0,94	0,85 ^a	0,87	0,92 ^a
		30	0,75	0,64 ^a	0,77	0,76
		45	0,68	0,64	0,69	0,72
		60	0,60	0,49 ^a	0,66	0,70
280 nm	Hidrófobos	1	0,29	0,37	0,26	0,46 ^a
		15	1,41	0,90 ^a	1,44	0,94 ^a
		30	1,70	0,35 ^a	0,98	1,11 ^a
		45	1,48	0,44 ^a	0,87	0,94
		60	1,96	0,43 ^a	1,13	0,86 ^a
	Hidrófilos	1	3,01	3,10	3,29	2,62 ^a
		15	4,41	4,40	4,67	3,68 ^a
		30	5,15	4,19 ^a	5,31	4,54 ^a
		45	6,16	6,10	5,93	5,22 ^a
		60	7,17	6,81 ^a	6,26	5,57 ^a
	Relación	1	0,09	0,12 ^a	0,08	0,18 ^a
		15	0,31	0,21 ^a	0,30	0,25 ^a
		30	0,33	0,07 ^a	0,19	0,24 ^a
		45	0,24	0,07 ^a	0,15	0,19 ^a
		60	0,27	0,07 ^a	0,18	0,16

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente diferente del control (P<0,05).

Tabla 32. Características reológicas¹ del queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos.

	Días	Cruda		Pasteurizada	
		Control	Eclair	Control	Eclair
Fracturabilidad, N	1	15,72	18,97 ^a	12,11	12,91
	15	16,34	27,47 ^a	18,46	23,25 ^a
	30	19,47	35,64 ^a	20,28	29,88 ^a
	45	21,02	35,93 ^a	22,16	33,99 ^a
	60	24,15	42,25 ^a	28,01	43,94 ^a
Firmeza, J	15	0,16	0,25	0,18	0,23 ^a
	30	0,20	0,32 ^a	0,20	0,29 ^a
	45	0,21	0,33 ^a	0,22	0,36 ^a
	60	0,24	0,40 ^a	0,28	0,45 ^a
Elasticidad, N/mm²	1	0,22	0,26	0,17	0,19
	15	0,25	0,49 ^a	0,37	0,51
	30	0,43	0,83 ^a	0,50	0,79 ^a
	45	0,54	1,05 ^a	0,65	1,02 ^a
	60	0,76	1,31	1,09	1,58 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por sextuplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente diferente del control (P<0,05).

empleo del fermento ECLAIR, con valores más altos que en los quesos control durante prácticamente todo el período de maduración.

3.2.1.5. Características sensoriales

Tanto la calidad como la intensidad del sabor del queso obtuvieron puntuaciones significativamente ($P < 0,001$) superiores en los quesos de leche cruda que en los de leche pasteurizada (Tabla 33). En cuanto al sabor amargo, las puntuaciones obtenidas fueron, en general, bajas. Los valores medios otorgados por los catadores fueron superiores en los quesos de leche pasteurizada que en los de leche cruda, aunque no se detectaron diferencias significativas.

Ni la calidad ni la intensidad del sabor de los quesos control y los quesos elaborados con el fermento ECLAIR resultaron significativamente diferentes. Se comprobó la existencia de diferencias significativas ($P < 0,001$) en las puntuaciones de amargor del queso entre los dos fermentos empleados, resultando más amargos los quesos control, elaborados con el fermento comercial. Este hecho se comprobó tanto en los quesos de leche cruda como en los de leche pasteurizada a los 60 d de maduración.

3.2.2. Discusión

Entre las diferencias que se han observado en las características de los quesos elaborados a partir de leche cruda y los de leche pasteurizada se encuentra la presencia, en general, de un sabor más intenso en los quesos de leche cruda (Price y Call, 1969, Gaya *et al.*, 1990; McSweeney *et al.*, 1993). Nuestros resultados coinciden con los de trabajos anteriores.

Se han atribuido diversas razones a la existencia de estas diferencias, como son el papel desempeñado por la flora presente en la leche cruda (McSweeney *et al.*, 1993) o los cambios químicos producidos por el tratamiento térmico en los componentes de la leche. Según Lau *et al.* (1991), las características y el grado de proteólisis del queso resulta alterado por la pasteurización de la leche. Esta alteración puede derivar de las interacciones entre las proteínas del suero desnaturadas, que permanecen retenidas

Tabla 33. Características sensoriales¹ del queso Manchego fabricado a partir de leche cruda o leche pasteurizada con distintos fermentos a los 60 días de maduración.

	Cruda		Pasteurizada	
	Control	Eclair	Control	Eclair
Calidad	6,29	6,69	5,86	5,49
Intensidad	6,41	6,27	5,94	5,56
Amargor	0,92	0,32 ^a	0,93	0,51 ^a

¹ Media de las puntuaciones otorgadas por un panel de 12 catadores en catas duplicadas de dos fabricaciones, utilizando una escala de 10 puntos.

^a Significativamente diferente del control ($P < 0,05$).

en el queso, y las micelas de caseína. Tal asociación reduciría la accesibilidad de las enzimas a las caseínas (Lau *et al.*, 1990).

Los quesos de leche pasteurizada presentaron un valor medio de extracto seco superior al de los quesos de leche cruda, dato también observado por Lau *et al.* (1990) en queso Cheddar y Gaya *et al.* (1990) en queso Manchego. Sin embargo, otros autores (Price y Call, 1969) encontraron un extracto seco superior en los quesos de leche cruda. Debido a una mayor actividad acidificante del fermento ECLAIR durante las primeras fases de la elaboración, se produjo un mayor desuerado del queso, que dio lugar a valores de extracto seco superiores durante la maduración en los quesos de leche cruda y leche pasteurizada fabricados con el fermento ECLAIR.

La pasteurización tuvo un efecto significativo en la degradación de la α_s -caseína y de la β -caseína, con mayor proteólisis en el queso de leche pasteurizada. Gaya *et al.* (1990) atribuyen el incremento de la proteólisis en queso de leche pasteurizada a la mayor retención de cuajo en el queso. Durante las primeras 24 h, la degradación de β -caseína fue superior a la observada en α_s -caseína. A las 24 h se detectó en queso de leche cruda un 83% de α_s -caseína y un 47% de β -caseína. Estos valores fueron del 81% y del 49%, respectivamente, en queso de leche pasteurizada. La α_s -caseína fue degradada con mayor intensidad que la β -caseína durante la maduración. A los 60 d se comprobó la presencia de un 34% y de un 21% de α_s -caseína residual en queso de leche cruda y de leche pasteurizada. Dichos valores fueron del 46% y del 40% para β -caseína residual, respectivamente.

En queso Cheddar, Ledford *et al.* (1966) comprobaron la degradación casi completa de la α_s -caseína, mientras que la β -caseína permaneció prácticamente intacta. Gaya *et al.* (1990) en queso Manchego de leche cruda de 60 d de maduración, encontraron valores del 25% de α_s -caseína residual, siendo este valor del 21% en queso de leche pasteurizada. Dichos valores fueron del 27% y del 23% para la β -caseína. Lau *et al.* (1991) no observaron diferencias en la degradación de α_s -caseína en queso de leche cruda y de leche pasteurizada, de la que se degradó un 85% en 6 meses de maduración. En queso de leche cruda se degradó un 46% de la β -caseína original, mientras que en queso de leche pasteurizada se degradó un 35%.

Durante las primeras 24 h se observaron, en los quesos de leche pasteurizada, valores de N soluble a pH 4,6 y N soluble en TCA superiores a los detectados en los quesos de leche cruda. Esta mayor proteólisis inicial se atribuye a la retención de cuajo en la cuajada de leche pasteurizada, que coincide con los valores inferiores de extracto seco durante este periodo. La actividad proteolítica en los quesos elaborados con el fermento ECLAIR, de acuerdo con la degradación de caseínas observada y los niveles de las fracciones nitrogenadas, principalmente N soluble a pH 4,6, resultó inferior a la detectada en queso control, aunque las diferencias fueron pequeñas en las fracciones de N soluble en TCA y N soluble en PTA, principales participantes en el desarrollo del aroma y sabor del queso. Posiblemente, la mayor actividad peptidolítica del fermento ECLAIR es responsable de la hidrólisis a péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos.

En queso Cheddar de leche pasteurizada, el N soluble a pH 4,6 únicamente fue superior al presente en quesos de leche cruda a los 4 d, mientras que se alcanzaron niveles similares durante el resto de la maduración (Lau *et al.*, 1991). La cantidad de N soluble en TCA en queso de leche pasteurizada resultó inferior a la observada en queso de leche cruda durante toda la maduración (Lau *et al.*, 1991). Según Gaya *et al.* (1990), en queso Manchego de leche cruda de 30 y 60 d de maduración, los valores de N soluble a pH 4,6 fueron ligeramente superiores a los detectados en queso de leche pasteurizada, los valores de N soluble en TCA fueron similares y los de N soluble en PTA más elevados en los quesos de leche cruda.

En nuestro trabajo, la menor actividad proteolítica de los quesos con fermento ECLAIR podría atribuirse al mayor descenso del pH debida a este fermento durante las primeras fases de maduración del queso, que podría disminuir la actividad de la *plasmina de la leche*. Al final del periodo de maduración, los niveles de caseína residual resultaron más elevados en los quesos con el fermento ECLAIR. Sin embargo, el N soluble en TCA de los quesos de leche cruda y el N soluble en PTA de los quesos de leche cruda y de leche pasteurizada alcanzaron valores similares con el empleo de ambos fermentos.

Los productos de la proteólisis, péptidos y aminoácidos, se encuentran en la fracción del queso no volátil soluble en agua. McGugan *et al.* (1979) identifican a esta fracción como la que más contribuye a la intensidad de sabor del queso. Por otra parte,

el nivel de péptidos hidrófobos está relacionado con la presencia de sabor amargo en el queso. Champion y Stanley (1982) comprobaron que los extractos de queso Cheddar calificados como amargos por un jurado de catadores contenían una elevada concentración de péptidos hidrófobos.

Según McSweeney *et al.* (1993), los perfiles de péptidos difieren en los quesos de leche cruda y de leche pasteurizada debido a las proteinasas y peptidasas de la flora láctica que no forma parte del fermento, presente en los quesos de leche cruda.

De acuerdo con nuestros resultados, los niveles de péptidos hidrófobos determinados a 214 nm en los quesos de leche pasteurizada eran superiores a los detectados en los quesos de leche cruda, aunque a 280 nm no se detectaron diferencias significativas. Los quesos de leche pasteurizada recibieron mayor puntuación de amargor que los quesos de leche cruda. Asimismo, los quesos con fermento ECLAIR, que recibieron las menores puntuaciones de amargor tanto con leche cruda como con leche pasteurizada, presentaron en todos los casos niveles significativamente más bajos de péptidos hidrófobos. La menor concentración de péptidos hidrófobos a los 60 d de maduración, a 214 y 280 nm, correspondió a los quesos de leche cruda elaborados con fermento ECLAIR. Por otra parte, los valores de calidad e intensidad de sabor de estos quesos no diferían de los elaborados con el fermento comercial.

Los quesos de leche pasteurizada, aunque con una ligera mayor proteólisis que apuntaría a un mayor reblandecimiento (Creamer y Olson, 1982; Fernández del Pozo *et al.*, 1988), presentaron unos valores de textura más elevados que los quesos de leche cruda. El mayor extracto seco de los quesos de leche pasteurizada a los 30, 45 y 60 d de maduración explicaría su textura más firme, efecto que predominaría sobre la influencia de la proteólisis (Chen *et al.*, 1979). La textura más firme determinada en los quesos fabricados con el fermento ECLAIR se relaciona, por una parte, con la menor proteólisis experimentada, en general, en estos quesos. Por otra parte, debido a la presencia de leuconostocs productores de gas en el fermento comercial utilizado como control se formaron en el queso ojos pequeños y regulares, que contribuyeron a reducir los valores de los tres parámetros reológicos estudiados y ocasionaron diferencias superiores a las atribuibles a una menor proteólisis y/o a un mayor extracto seco.

El fermento ECLAIR dio lugar a quesos con una calidad de sabor comparable a la obtenida utilizando el fermento comercial. Igualmente, la intensidad de sabor resultó similar en los quesos elaborados con ambos fermentos, con valores ligeramente más altos aunque no diferentes significativamente en los quesos con el nuevo fermento. Sin embargo, los quesos elaborados con el fermento ECLAIR resultaron menos amargos que los quesos control. Los quesos fabricados con fermento ECLAIR a partir de leche cruda recibieron la puntuación más baja de amargor.

Como conclusión, podemos apuntar que el empleo del fermento ECLAIR compuesto por cuatro aislamientos de *L. lactis* subsp. *lactis* procedentes de queso Manchego de leche cruda, en la elaboración de quesos de leche cruda o de leche pasteurizada, da lugar a un producto con una buena calidad organoléptica y unas características generales comparables a las obtenidas con un fermento comercial utilizado en la producción industrial de queso Manchego. Este nuevo fermento presenta, además, la ventaja de producir un queso con una puntuación de amargor más baja que la obtenida por el queso fabricado con el fermento comercial.

3.3. SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD SOBRE PÉPTIDOS HIDRÓFOS PARA SU EMPLEO COMO ADJUNTOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO

Se investigó la actividad de degradación de péptidos hidrófobos en bacterias lácticas seleccionadas por su capacidad peptidásica en quesos modelo elaborados con leche pasteurizada de vaca. Se emplearon como adjuntos al fermento los aislamientos de lactobacilos *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESI 207 y *L. plantarum* ESI 144, de leuconostocs *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 y *L. lactis* ESI 712. Se ensayaron igualmente los fermentos comerciales termófilos TA 053, TA 054, TA 557, TA 558, TA 559, TA 060, TA 061 y TA 062 en quesos modelo acidificados con glucono- δ -lactona.

Se realizaron diversas fabricaciones de quesos modelo con adición de Neutrase para acelerar la hidrólisis de caseína y favorecer la formación de péptidos hidrófobos implicados en la aparición de sabor amargo en queso. Los quesos se mantuvieron durante 72 h a 20°C y se investigaron los niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos de la fracción soluble en agua del queso.

3.3.1. Resultados

3.3.1.1. Lactobacilos como adjuntos al fermento

Los niveles de péptidos hidrófobos, hidrófilos y la relación hidrófobos:hidrófilos medidos a 214 y 280 nm en quesos modelo elaborados con *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESI 207 y *L. plantarum* ESI 144 como adjuntos al fermento comercial se indican en las Tablas 34 y 35, respectivamente.

En los quesos elaborados con adición de *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESI 207 (Tabla 34) se observó, a 214 nm, un valor significativamente menor de péptidos hidrófobos ($P < 0,05$) y de péptidos hidrófilos ($P < 0,001$) que en los quesos sin lactobacilos, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la relación hidrófobos:hidrófilos. La adición de Neutrase también ocasionó valores

Tabla 34. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESI 207 (Lb) y Neutrased (N), determinados por HPLC en fase reversa.

λ		Hidrófobos		Hidrófilos		Relación	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
214 nm	Control	30,85 ^a	85,94 ^a	20,22 ^a	77,79 ^a	1,52 ^a	1,11 ^a
	+ Lb	27,51 ^a	74,68 ^a	19,95 ^a	69,04 ^b	1,38 ^{ab}	1,08 ^a
	+ N	105,68 ^b	125,62 ^b	80,00 ^b	131,46 ^c	1,32 ^b	0,96 ^a
	+ N + Lb	101,12 ^b	108,40 ^b	72,51 ^c	104,99 ^d	1,40 ^b	1,03 ^a
280 nm	Control	0,17 ^a	0,56 ^a	1,38 ^a	3,38 ^a	0,12 ^a	0,17 ^a
	+ Lb	0,15 ^a	0,54 ^a	1,10 ^b	3,13 ^b	0,14 ^a	0,17 ^a
	+ N	2,59 ^b	2,56 ^b	3,45 ^c	4,99 ^c	0,75 ^b	0,52 ^b
	+ N + Lb	2,48 ^b	2,25 ^c	3,30 ^c	5,43 ^d	0,75 ^b	0,42 ^c

¹ Valores medios de dos determinaciones, expresados como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^{a,b,c,d} Medias con el mismo superíndice en la misma columna y a la misma longitud de onda no difieren significativamente ($P < 0,01$).

Tabla 35. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrased (N), determinados por HPLC en fase reversa.

λ		Hidrófobos		Hidrófilos		Relación	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
214 nm	Control	25,17 ^a	36,71 ^a	13,44 ^a	24,26 ^a	1,88 ^a	1,51 ^a
	+ Lb	23,82 ^a	33,46 ^a	13,23 ^a	29,92 ^b	1,81 ^a	1,11 ^{ab}
	+ N	76,20 ^b	86,92 ^b	44,62 ^b	82,26 ^c	1,71 ^a	1,06 ^b
	+ N + Lb	62,87 ^b	67,73 ^c	40,13 ^b	65,76 ^d	1,57 ^a	1,03 ^b
280 nm	Control	0,22 ^a	0,29 ^a	1,13 ^a	1,70 ^a	0,20 ^a	0,17 ^a
	+ Lb	0,44 ^b	0,27 ^a	1,00 ^a	1,48 ^a	0,44 ^b	0,19 ^a
	+ N	1,73 ^c	1,70 ^b	1,94 ^b	3,63 ^b	0,90 ^c	0,47 ^b
	+ N + Lb	1,61 ^c	1,39 ^c	1,47 ^c	2,05 ^c	1,10 ^d	0,68 ^c

¹ Valores medios de dos determinaciones, expresados como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^{a,b,c,d} Medias con el mismo superíndice en la misma columna y a la misma longitud de onda no difieren significativamente ($P < 0,01$).

significativamente mayores ($P < 0,001$) de péptidos hidrófobos y de péptidos hidrófilos, y una relación hidrófobos:hidrófilos significativamente ($P < 0,001$) menor. Los niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos se incrementaron significativamente ($P < 0,001$) tras 72 h de maduración a 20°C, mientras que la relación hidrófobos:hidrófilos se redujo significativamente ($P < 0,001$) a las 72 h. A 280 nm, la cantidad de péptidos hidrófilos ($P < 0,05$), hidrófobos ($P < 0,01$) y la relación hidrófobos:hidrófilos ($P < 0,05$) fueron significativamente menores cuando se adicionaron los lactobacilos. La adición de Neutrased provocó un aumento significativo ($P < 0,001$) en el contenido de péptidos hidrófobos, hidrófilos y en la relación de ambos. El tiempo de maduración de los quesos tuvo un efecto significativo ($P < 0,001$) en el nivel de péptidos hidrófobos e hidrófilos, mayor a las 72 h que a las 24 h de maduración, y en la relación hidrófobos:hidrófilos ($P < 0,001$), mayor a las 24 h que a las 72 h de maduración.

En los quesos elaborados con *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento (Tabla 35), a 214 nm se observó una disminución significativa en el nivel de péptidos hidrófobos ($P < 0,01$) y de péptidos hidrófilos ($P < 0,001$). La relación hidrófobos:hidrófilos también fue significativamente ($P < 0,001$) menor cuando se adicionaron los lactobacilos. La adición de Neutrased dio lugar a niveles de péptidos hidrófobos ($P < 0,001$), hidrófilos ($P < 0,001$), y de la relación de ambos ($P < 0,01$) significativamente superiores. En cuanto al tiempo de maduración, los péptidos hidrófobos ($P < 0,01$) e hidrófilos ($P < 0,001$) alcanzaron niveles significativamente mayores a las 72 h de maduración, mientras que la relación hidrófobos:hidrófilos fue significativamente ($P < 0,001$) más alta a las 24 h de maduración. A 280 nm se obtuvieron resultados similares, con un nivel de péptidos hidrófobos significativamente inferior ($P < 0,05$), así como de péptidos hidrófilos ($P < 0,001$) y una relación hidrófobos:hidrófilos significativamente ($P < 0,001$) superior en los quesos con lactobacilos. La adición de Neutrased provocó valores significativamente ($P < 0,001$) mayores de péptidos hidrófobos, hidrófilos y de la relación hidrófobos:hidrófilos. La cantidad de péptidos hidrófilos fue significativamente superior ($P < 0,001$) a las 72 h de maduración del queso, mientras que los péptidos hidrófobos alcanzaron niveles significativamente ($P < 0,01$) más altos a las 24 h de maduración, y la relación hidrófobos:hidrófilos fue significativamente ($P < 0,001$) superior a las 24 h de maduración a 20°C.

Los niveles de péptidos hidrófobos en quesos con Neutrased y con lactobacilos como adjuntos al fermento comercial, a los 3 d a 20°C, se redujeron un 22,1% a 214 nm y un 18,2% a 280 nm en los quesos con *L. plantarum* ESI 144. Esta reducción fue de 13,7% a 214 nm y de 12,1% a 280 nm en los quesos con *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESI 207.

3.3.1.2. Leuconostocs como adjuntos al fermento

Los niveles de péptidos hidrófobos, hidrófilos y la relación hidrófobos:hidrófilos a 214 y 280 nm en quesos modelo elaborados con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 y *L. lactis* ESI 712 como adjuntos al fermento comercial se indican en las Tablas 36 y 37, respectivamente.

La fabricación con adición de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 dio lugar a quesos con un contenido en péptidos hidrófobos e hidrófilos (Tabla 36), determinados a 214 nm, significativamente ($P < 0,001$) menor que los quesos sin leuconostocs, no siendo significativa dicha adición en la relación hidrófobos:hidrófilos. Los quesos con Neutrased presentaron niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos significativamente ($P < 0,001$) mayores, mientras que la relación entre ambos resultó ser significativamente menor ($P < 0,001$). El contenido en péptidos hidrófilos fue significativamente ($P < 0,001$) superior a las 72 h de maduración, y la relación hidrófobos:hidrófilos mayor ($P < 0,001$) a las 24 h de maduración, no existiendo diferencias significativas en el contenido de péptidos hidrófobos. A 280 nm, la adición de leuconostocs dio lugar a contenidos significativamente menores de péptidos hidrófobos e hidrófilos, y no se detectaron diferencias significativas en la relación de ambos. La adición de Neutrased provocó un contenido de péptidos hidrófobos, hidrófilos y de la relación hidrófobos:hidrófilos significativamente más elevado ($P < 0,001$), siendo además significativamente ($P < 0,001$) superiores estos valores a las 72 h de maduración.

Los quesos elaborados con *L. lactis* ESI 712 como adjunto al fermento (Tabla 37) presentaron a 214 nm niveles significativamente menores ($P < 0,001$) de péptidos

Tabla 36. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase (N), determinados por HPLC en fase reversa.

λ		Hidrófobos		Hidrófilos		Relación	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
214 nm	Control	49,73 ^a	68,16 ^b	27,97 ^a	56,70 ^a	1,78 ^b	1,22 ^a
	+ Leuc	49,90 ^a	52,33 ^a	31,30 ^a	46,55 ^a	1,59 ^{ab}	1,13 ^a
	+ N	127,06 ^c	112,10 ^c	91,08 ^c	109,01 ^c	1,40 ^a	1,03 ^a
	+ N + Leuc	87,84 ^b	73,46 ^b	58,36 ^b	72,51 ^b	1,51 ^a	1,02 ^a
280 nm	Control	1,07 ^a	0,38 ^a	1,88 ^a	2,08 ^a	0,57 ^{ab}	0,18 ^a
	+ Leuc	1,24 ^a	0,20 ^a	2,58 ^{ab}	1,20 ^a	0,48 ^a	0,16 ^a
	+ N	3,13 ^c	1,89 ^c	4,66 ^c	3,15 ^b	0,67 ^b	0,60 ^b
	+ N + Leuc	2,40 ^b	1,06 ^b	3,09 ^b	1,74 ^a	0,78 ^c	0,61 ^b

¹ Valores medios de dos determinaciones, expresados como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^{a,b,c,d} Medias con el mismo superíndice en la misma columna y a la misma longitud de onda no difieren significativamente ($P < 0,01$).

Tabla 37. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con *L. lactis* ESI 712 (Leuc) y Neutrased (N), determinados por HPLC en fase reversa.

λ		Hidrófobos		Hidrófilos		Relación	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
214 nm	Control	37,45 ^a	71,15 ^b	20,71 ^a	62,19 ^b	1,81 ^b	1,15 ^{bc}
	+ Leuc	46,66 ^b	48,91 ^a	29,60 ^b	40,71 ^a	1,58 ^a	1,20 ^c
	+ N	158,91 ^d	109,19 ^d	99,43 ^d	121,67 ^d	1,60 ^a	0,90 ^a
	+ N + Leuc	99,94 ^c	77,42 ^c	64,03 ^c	71,42 ^c	1,57 ^a	1,09 ^b
280 nm	Control	0,65 ^a	0,58 ^{ab}	1,50 ^a	1,95 ^b	0,43 ^a	0,30 ^a
	+ Leuc	1,23 ^b	0,33 ^a	2,59 ^b	1,14 ^a	0,48 ^a	0,29 ^a
	+ N	4,35 ^d	1,62 ^c	4,89 ^d	3,79 ^c	0,89 ^b	0,43 ^{ab}
	+ N + Leuc	2,71 ^c	0,95 ^b	3,73 ^c	1,78 ^b	0,73 ^b	0,54 ^b

¹ Valores medios de dos determinaciones, expresados como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^{a,b,c,d} Medias con el mismo superíndice en la misma columna y a la misma longitud de onda no difieren significativamente ($P < 0,01$).

hidrófobos e hidrófilos que los quesos sin leuconostocs, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la relación hidrófobos:hidrófilos. La adición de Neutrasedio lugar a niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos significativamente ($P < 0,001$) mayores, siendo la relación entre ambos significativamente ($P < 0,001$) menor con adición de la enzima. A las 24 h de maduración el nivel de péptidos hidrófobos y la relación hidrófobos:hidrófilos fue significativamente ($P < 0,001$) mayor que a las 72 h, mientras que el nivel de péptidos hidrófilos fue significativamente ($P < 0,001$) superior a las 72 h de maduración. A 280 nm, la adición de *L. lactis* ESI 712 dio lugar a quesos con un contenido en péptidos hidrófobos e hidrófilos significativamente ($P < 0,01$) menor que en quesos sin leuconostocs, mientras que no tuvo efecto significativo en la relación hidrófobos:hidrófilos. La adición de Neutrasedio originó quesos con niveles significativamente ($P < 0,001$) mayores de péptidos hidrófobos, hidrófilos y de la relación de éstos, siendo todos estos valores significativamente ($P < 0,001$) mayores a las 24 h que a las 72 h de maduración a 20°C.

La reducción en el contenido de péptidos hidrófobos a las 72 h de maduración en los quesos con Neutrasedio y leuconostocs fue de un 29,1% a 214 nm y de un 41,4% a 280 nm en los quesos elaborados con *L. lactis* ESI 712 como adjunto al fermento comercial. Esta reducción fue de un 34,5% a 214 nm y de un 43,9% a 280 nm en los quesos a los que se adicionó *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598.

3.3.1.3. Estreptococos termófilos como adjuntos al fermento

Los niveles de péptidos hidrófobos, hidrófilos y la relación hidrófobos:hidrófilos a 214 y 280 nm en quesos modelo de 72 h elaborados con 8 fermentos termófilos comerciales se recogen en la Tabla 38.

Tras efectuar el análisis de varianza, se comprobó la influencia significativa ($P < 0,001$) del fermento termófilo empleado en los niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos de la fracción soluble en agua de los quesos, a ambas longitudes de onda.

Tabla 38. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de quesos modelo elaborados con estreptococos termófilos y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa.

λ		Hidrófobos	Hidrófilos	Relación
214 nm	Control	213,74 ^b	95,31 ^a	2,24 ^c
	TA 053	191,16 ^b	132,91 ^b	1,44 ^{ab}
	TA 054	175,17 ^{ab}	118,94 ^b	1,47 ^{ab}
	TA 557	199,10 ^b	117,20 ^b	1,70 ^b
	TA 558	125,04 ^a	90,24 ^a	1,39 ^{ab}
	TA 559	180,31 ^b	124,35 ^b	1,45 ^{ab}
	TA 060	174,68 ^{ab}	141,68 ^c	1,23 ^a
	TA 061	191,31 ^b	147,40 ^c	1,30 ^a
	TA 062	189,05 ^b	146,34 ^c	1,30 ^a
280 nm	Control	4,02 ^{ab}	2,06 ^a	1,99 ^a
	TA 053	8,07 ^d	6,41 ^f	1,26 ^a
	TA 054	5,95 ^c	5,33 ^{de}	1,12 ^a
	TA 557	5,26 ^{bc}	4,46 ^c	1,18 ^a
	TA 558	3,36 ^d	3,31 ^b	1,01 ^a
	TA 559	4,81 ^{ab}	4,91 ^{cd}	0,98 ^a
	TA 060	4,56 ^{abc}	5,39 ^{de}	0,85 ^a
	TA 061	4,91 ^{abc}	5,28 ^{de}	0,93 ^a
	TA 062	5,49 ^{bc}	5,84 ^{ef}	0,95 ^a

¹ Valores medios de dos determinaciones, expresados como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^{a,b,c,d,e,f} Medias con el mismo superíndice en la misma columna y a la misma longitud de onda no difieren significativamente (P<0,01).

A 214 nm, todos los fermentos termófilos redujeron el contenido en péptidos hidrófobos respecto al queso control, siendo el fermento TA 558 el que ocasionó una mayor disminución, con una reducción del 41,5% respecto al control. Los niveles de péptidos hidrófilos resultaron significativamente ($P < 0,01$) superiores a los encontrados en queso control con todos los fermentos ensayados, a excepción del TA 558 que no mostró diferencias significativas. Sin embargo, en todos los quesos con fermento termófilo se detectó un valor significativamente superior ($P < 0,01$) para la relación hidrófobos:hidrófilos que en el queso control.

A 280 nm, únicamente el fermento TA 558 redujo el contenido en péptidos hidrófobos en un 16,9% respecto al control, no encontrándose reducción alguna en el contenido en péptidos hidrófobos por ninguno de los otros fermentos a esta longitud de onda. Los niveles de péptidos hidrófilos resultaron significativamente ($P < 0,01$) superiores a los detectados en queso control con todos los fermentos termófilos estudiados, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la relación hidrófobos:hidrófilos.

La mayor reducción de péptidos hidrófobos en quesos modelo fabricados con diferentes cultivos de estreptococos termófilos se obtuvo con el fermento TA 558.

3.3.2. Discusión

La proteólisis que tiene lugar durante la fabricación y maduración del queso puede provocar la aparición de péptidos amargos a partir de fragmentos hidrófobos de las caseínas.

Se considera que la concentración de péptidos hidrófobos está relacionada con el defecto de sabor amargo. Los péptidos hidrófobos se acumulan en el queso cuando la velocidad de producción es mayor que la de degradación. La fracción del queso soluble en agua es la que presenta una mayor contribución a la intensidad de sabor del queso (McGugan *et al.*, 1979), siendo el amargor más intenso en esta fracción. Champion y Stanley (1982) comprobaron que los extractos de queso Cheddar amargo

contenían una elevada proporción de péptidos hidrófobos. Cliffe y Law (1990) observaron que en papillas de queso tratadas con proteinasa neutra de *B. subtilis* aumentaba el número y la altura de los picos del cromatograma y lo relacionaron con la aparición de amargor.

De acuerdo con nuestros resultados, los niveles de péptidos hidrófobos en quesos con Neutrased y con lactobacilos como adjuntos al fermento comercial, después de 72 h a 20°C, se redujeron en mayor proporción con *L. plantarum* ESI 144. Debido a la mayor reducción obtenida con este aislamiento, que apunta a una posible actividad desamargante, se seleccionó para su aplicación como adjunto en las fabricaciones en quesería.

La reducción en el contenido de péptidos hidrófobos a las 72 h de maduración en los quesos con Neutrased y leuconostocs fue superior en los quesos a los que se adicionó *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598, por lo que se seleccionó este aislamiento para las fabricaciones en quesería.

Igualmente, en quesos modelo elaborados con estreptococos termófilos se obtuvo la mayor reducción de péptidos hidrófobos con el fermento TA 558, por lo que fue seleccionado para las fabricaciones en quesería.

La mayoría de los trabajos publicados sobre el empleo de bacterias lácticas como adjuntos al fermento se han realizado en queso madurado. Ardö y Pettersson (1988) comprobaron la eliminación del sabor amargo producido por Neutrased en queso mediante el empleo de cultivos atenuados de *L. helveticus*. Por su parte, Park *et al.* (1995) comprobaron que en papillas o slurries de queso con Neutrased se producía una disminución del área de dos picos correspondientes a dos péptidos hidrófobos procedentes de α_{s1} - y β -caseína, cuando se añadía un extracto enzimático de *L. casei*, atribuyendo este fenómeno a la actividad peptidásica presente en el extracto.

3.4. ACTIVIDAD DESAMARGANTE DE BACTERIAS LÁCTICAS COMO ADJUNTOS DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESO SEMIDURO DE LECHE DE VACA

Se realizaron fabricaciones de queso a partir de leche cruda y leche pasteurizada de vaca, utilizando como adjuntos al fermento láctico mesófilo comercial los aislamientos *L. plantarum* ESI 144 y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598, así como el fermento termófilo TA 558. Para cada adjunto se realizaron cuatro fabricaciones, dos con leche cruda y dos con leche pasteurizada.

3.4.1. Resultados

3.4.1.1. Quesos de leche cruda

3.4.1.1.1. *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda

3.4.1.1.1.1. Microbiología, pH y extracto seco

La adición de un 1% de *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento láctico influyó significativamente ($P < 0,001$) como cabía esperar en los niveles de lactobacilos en el queso. Se alcanzaron valores de 8,2 log ufc/g a las 24 h, que aumentaron hasta 9,2 log ufc/g a los 45-60 d de maduración. Los quesos sin lactobacilos presentaron niveles de 6,1 log ufc/g a las 24 h y de hasta 8,1 log ufc/g a los 15 d de maduración. La adición de Neutrased no afectó al contenido de lactobacilos del queso.

El empleo de lactobacilos como adjuntos al fermento láctico disminuyó ($P < 0,001$) significativamente el pH del queso (Tabla 39). En queso sin Neutrased, las diferencias de pH se mantuvieron durante toda la maduración, mientras que en los quesos con Neutrased no se detectaron diferencias significativas en el valor de este parámetro debidas a la adición de lactobacilos.

Tabla 39. Valores de pH¹ y extracto² seco en queso de leche cruda elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
pH	1	4,95	4,92 ^a	4,93	4,93
	15	4,90	4,82 ^a	4,84	4,88
	30	5,00	4,91 ^a	4,96	4,98
	45	5,07	4,96 ^a	5,11	5,09
	60	5,09	5,04 ^a	5,15	5,12
Extracto seco, %	1	48,55	49,86	48,19	47,54
	15	52,32	53,77	50,03	53,60 ^a
	30	55,58	56,72	54,87	58,14 ^a
	45	56,38	56,07	56,35	57,71
	60	58,66	58,17	58,47	58,45

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

² Media de determinaciones realizadas por triplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

El extracto seco de los quesos resultó significativamente ($P < 0,001$) superior cuando se adicionó *L. plantarum* (Tabla 39). En los quesos sin Neutrased esta diferencia no fue significativa, mientras que en los quesos con Neutrased, el extracto seco alcanzó valores más altos en los quesos con lactobacilos a los 15 y 30 d de maduración.

3.4.1.1.1.2. Proteolisis

La degradación de α_{s1} - y β -caseína en los quesos sin Neutrased no resultó afectada por la adición de lactobacilos a la leche, incrementándose ($P < 0,001$) con el tiempo de maduración (Tabla 40). Sin embargo, en los quesos con Neutrased se comprobó la existencia de diferencias significativas ($P < 0,001$) en los niveles de α_{s1} - y β -caseína residuales debidas a la presencia de lactobacilos. Los quesos con Neutrased y lactobacilos registraron niveles superiores de α_{s1} -caseína residual durante prácticamente toda la maduración, mientras que los niveles de β -caseína residual fueron más altos hasta los 30 d, con valores similares a los 45 y 60 d de maduración.

Los niveles de N soluble a pH 4,6, N soluble en TCA y N soluble en PTA resultaron significativamente más bajos ($P < 0,001$) en los quesos con lactobacilos (Tabla 41). En los quesos sin Neutrased, sin embargo, se registraron valores medios de N soluble a pH 4,6 significativamente ($P < 0,001$) más altos cuando se añadieron lactobacilos a la leche, siendo las otras dos fracciones analizadas inferiores en estos quesos. En quesos con Neutrased los valores medios de las tres fracciones nitrogenadas resultaron más bajos en los quesos con lactobacilos que en los quesos sin este microorganismo.

3.4.1.1.1.3. Péptidos de la fracción soluble en agua

En los quesos sin Neutrased, la adición de *L. plantarum* no afectó a los niveles de péptidos hidrófobos determinados a 214 nm (Tabla 42). Los péptidos hidrófilos a esta longitud de onda registraron niveles significativamente ($P < 0,001$) superiores y la relación hidrófobos:hidrófilos fue significativamente ($P < 0,001$) inferior. A 280 nm (Tabla 43) la adición de lactobacilos disminuyó significativamente ($P < 0,001$) los niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos sin afectar a la relación hidrófobos:hidrófilos.

Tabla 40. Caseínas residuales¹ en queso de leche cruda elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
α_{s1} -caseína	1	77,1	76,7	57,8	72,6 ^a
	15	53,8	55,1	41,4	46,2 ^a
	30	43,4	45,5	30,0	40,3 ^a
	45	38,1	38,4	26,2	26,6
	60	31,9	34,9	21,4	25,7 ^a
β -caseína	1	79,7	76,1	38,5	55,8 ^a
	15	67,3	69,9	34,6	42,7 ^a
	30	62,8	62,2	32,3	38,7 ^a
	45	54,9	55,5	25,5	26,7
	60	54,4	50,9	24,7	26,2

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del contenido en α_{s1} -caseína o β -caseína de la leche.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Tabla 41. Fracciones nitrogenadas¹ en queso de leche cruda elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
N sol pH 4,6	1	8,62	9,69 ^a	16,64	13,95 ^a
	15	11,93	12,09	17,30	16,61 ^a
	30	12,94	13,37 ^a	19,71	17,75 ^a
	45	14,22	14,61	23,30	21,21 ^a
	60	17,11	17,12	23,55	21,91 ^a
N sol TCA	1	3,54	4,19 ^a	5,34	4,84 ^a
	15	6,29	5,70 ^a	8,29	8,67 ^a
	30	7,71	6,60 ^a	9,05	9,16
	45	9,03	7,53 ^a	11,40	10,86 ^a
	60	10,51	9,09 ^a	10,76	12,48 ^a
N sol PTA	1	1,89	1,74	2,53	1,93 ^a
	15	2,41	1,90 ^a	3,77	3,36 ^a
	30	3,68	3,39	4,67	5,28 ^a
	45	4,85	4,20 ^a	7,09	6,02 ^a
	60	5,67	4,71 ^a	7,35	7,77 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del nitrógeno total del queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Tabla 42. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Hidrófobos	1	34,67	32,54	79,05	78,32
	15	60,99	54,26	127,80	104,18 ^a
	30	68,51	67,46	157,94	118,21 ^a
	45	73,50	72,04	150,39	129,87 ^a
	60	71,55	83,16	129,35	121,04 ^a
Hidrófilos	1	40,67	40,34	69,35	56,37 ^a
	15	84,76	82,10	167,12	132,18 ^a
	30	109,37	111,75	213,71	176,52 ^a
	45	140,15	150,39 ^a	264,30	246,84 ^a
	60	152,18	167,73 ^a	269,07	235,19 ^a
Relación	1	0,86	0,81 ^a	1,14	1,39 ^a
	15	0,72	0,66 ^a	0,77	0,79 ^a
	30	0,63	0,60 ^a	0,74	0,67 ^a
	45	0,53	0,48 ^a	0,57	0,53 ^a
	60	0,48	0,51 ^a	0,49	0,51

¹Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^aSignificativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Tabla 43. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Hidrófobos	1	0,56	0,46 ^a	1,34	1,32
	15	0,77	0,62 ^a	2,17	1,74 ^a
	30	0,89	0,88	2,64	1,78 ^a
	45	0,65	0,69	1,92	1,94
	60	0,88	0,98 ^a	2,01	2,00
Hidrófilos	1	4,26	3,27 ^a	5,15	4,00 ^a
	15	4,43	3,91 ^a	7,30	5,89 ^a
	30	5,62	5,42 ^a	10,34	8,17 ^a
	45	6,13	7,09 ^a	13,18	11,36 ^a
	60	7,43	7,23 ^a	14,41	13,20 ^a
Relación	1	0,13	0,14	0,26	0,34 ^a
	15	0,18	0,15	0,30	0,30
	30	0,16	0,17	0,26	0,22 ^a
	45	0,11	0,10	0,15	0,17 ^a
	60	0,12	0,14	0,15	0,15

¹Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Cuando se añadió Neutrase a la leche se incrementó ($P < 0,001$) la formación de péptidos hidrófobos e hidrófilos así como su relación, medidos tanto a 214 como a 280 nm. A 214, los valores de péptidos hidrófobos e hidrófilos se redujeron ($P < 0,001$) cuando se añadió el adjunto, mientras que la relación hidrófobos:hidrófilos aumentó significativamente. A 280 nm se obtuvieron resultados similares.

A los 60 d de maduración, el nivel de péptidos hidrófobos fue un 6,4% menor a 214 nm en quesos con Neutrase y lactobacilos que en los quesos con Neutrase sin el adjunto, mientras que a 280 nm no se detectaron diferencias. Sin embargo, a los 30 d, los niveles de péptidos hidrófobos fueron un 25,2% y un 32,6% menores a 214 y 280 nm, respectivamente, cuando se añadió el adjunto de *L. plantarum*.

3.4.1.1.1.4. Reología

En los quesos sin Neutrase, la adición de *L. plantarum* aumentó significativamente ($P < 0,001$) los valores de los tres parámetros reológicos estudiados (Tabla 44). La adición de Neutrase dio lugar a un reblandecimiento de los quesos, con una fracturabilidad, una firmeza y una elasticidad significativamente ($P < 0,001$) inferiores. En los quesos con Neutrase se produjo un incremento significativo ($P < 0,001$) de los valores de fracturabilidad, firmeza y elasticidad por la adición de *L. plantarum*.

3.4.1.1.1.5. Características sensoriales

Los quesos sin Neutrase y con lactobacilos obtuvieron una puntuación de calidad de sabor significativamente ($P < 0,05$) inferior a la de los quesos sin adjunto (Tabla 45), aunque esta diferencia solo se detectó a los 30 d de maduración. La intensidad del sabor también fue significativamente ($P < 0,001$) más baja en los quesos con lactobacilos y no se comprobaron diferencias en el amargor.

La adición de Neutrase dio lugar a quesos con la misma calidad pero mayor ($P < 0,001$) intensidad y más amargor ($P < 0,001$). Los quesos con Neutrase y lactobacilos obtuvieron puntuaciones similares en la calidad y la intensidad del sabor que los elaborados sin la adición de *L. plantarum*, pero resultaron significativamente ($P < 0,05$) menos amargos, aunque la diferencia se detectó únicamente a los 30 d de maduración.

Tabla 44. Características reológicas¹ del queso de leche cruda elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Fracturabilidad, N	30	23,11	26,16 ^a	16,04	20,85 ^a
	60	24,02	30,07 ^a	15,02	23,75 ^a
Firmeza, J	30	0,221	0,254 ^a	0,162	0,211 ^a
	60	0,247	0,324 ^a	0,171	0,242 ^a
Elasticidad, N/mm ²	30	0,609	0,644 ^a	0,460	0,608 ^a
	60	0,758	0,949 ^a	0,560	0,890 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por sextuplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente (P<0,05) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Tabla 45. Características sensoriales¹ del queso de leche cruda elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Calidad	30	5,97	5,01 ^a	5,05	4,70
	60	5,89	5,48	5,88	6,05
Intensidad	30	5,17	4,43 ^a	5,77	5,30
	60	5,63	5,15 ^a	6,56	6,05
Amargor	30	0,81	0,37	1,45	0,83 ^a
	60	0,11	0,40	0,85	0,61

¹ Media de las puntuaciones otorgadas por un panel de 12 catadores en catas duplicadas de dos fabricaciones, utilizando una escala de 10 puntos.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

3.4.1.1.2. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda

3.4.1.1.2.1. Microbiología, pH y extracto seco

La adición de un 1% de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto al fermento en queso de leche cruda dio lugar a niveles significativamente ($P < 0,001$) superiores de leuconostocs en el queso, como era de esperar. A las 24 h se observaron valores de 8,1-8,3 log ufc/g, que se mantuvieron prácticamente constantes durante la maduración. Los quesos sin adjunto contenían 7,5-7,9 log ufc/g a las 24 h y niveles similares a los 60 d.

El pH de los quesos de leche cruda no resultó afectado por la inoculación con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Tabla 46), ni tampoco por la adición de Neutrase a la leche.

Los quesos sin Neutrase con leuconostocs presentaron un extracto seco significativamente ($P < 0,001$) inferior que el de los quesos sin el adjunto (Tabla 46). La presencia de Neutrase incrementó ($P < 0,001$) el extracto seco. En los quesos con Neutrase y leuconostocs el extracto seco fue mayor ($P < 0,05$), aunque las diferencias se detectaron fundamentalmente a partir de los 45 d de maduración.

3.4.1.1.2.2. Proteolisis

La hidrólisis de las caseínas en los quesos sin Neutrase no se vio afectada por la inoculación de la leche con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Tabla 47). La presencia de Neutrase en el queso incrementó significativamente ($P < 0,001$) la degradación de ambas fracciones caseínicas. En los quesos con Neutrase y leuconostocs se registraron niveles de α_{s1} -caseína ($P < 0,01$) y β -caseína ($P < 0,001$) residual significativamente más altos que en los quesos sin leuconostocs, aunque esta diferencia sólo fue significativa en el queso de 24 h. No se detectaron diferencias en la cantidad de α_{s1} - y β -caseína residuales a lo largo del resto de la maduración.

Tabla 46. Valores de pH¹ y extracto² seco en queso de leche cruda elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
pH	1	4,96	5,04	4,99	4,97
	15	5,03	5,07	4,96	5,04
	30	5,05	5,12	5,00	5,03
	45	5,05	5,12	5,29	5,10
	60	5,11	5,13	5,10	5,07
Extracto seco, %	1	49,34	46,73 ^a	45,26	47,08 ^a
	15	51,84	50,65 ^a	53,44	53,20
	30	54,19	51,62 ^a	53,87	53,63
	45	55,31	52,93 ^a	54,67	56,23 ^a
	60	54,00	55,56 ^a	58,65	57,78 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

² Media de determinaciones realizadas por triplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 47. Caseínas residuales¹ en queso de leche cruda elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
α_{s1} -caseína	1	56,5	61,2	42,2	49,1 ^a
	15	36,9	39,4	23,9	22,2
	30	26,4	19,5	16,4	18,4
	45	15,6	13,6	12,8	12,5
	60	16,3	11,8	10,3	11,8
β -caseína	1	65,6	69,8	22,0	33,5 ^a
	15	58,8	59,2	19,9	17,6
	30	49,8	48,7	14,6	16,0
	45	40,9	41,8	12,5	12,1
	60	39,9	36,5	10,3	10,7

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del contenido en α_{s1} -caseína o β -caseína de la leche.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

En quesos sin Neutrased, la adici3n de leuconostocs afect3 significativamente a los valores de N soluble a pH 4,6 ($P < 0,01$), que fueron m3s altos en los quesos sin leuconostocs (Tabla 48), aunque la diferencia s3lo se detect3 a los 45 d. Tambi3n el N soluble en PTA alcanz3 valores superiores ($P < 0,001$) en quesos sin leuconostocs, con diferencias significativas a partir de los 30 d, aunque a los 60 d dicha fracci3n fue mayor en el queso con el adjunto. Sin embargo, los quesos con leuconostocs presentaron un mayor contenido en N soluble en TCA desde las primeras 24 h en adelante. La adici3n de Neutrased al queso de leche cruda increment3 significativamente ($P < 0,001$) los valores de las tres fracciones nitrogenadas. En los quesos con Neutrased y leuconostocs se detect3 mayor cantidad de N soluble a pH 4,6 ($P < 0,001$) y N soluble en TCA ($P < 0,001$) que en los quesos con Neutrased y sin leuconostocs, mientras que no se comprobaron diferencias significativas en el N soluble en PTA.

3.4.1.1.2.3. P3ptidos de la fracci3n soluble en agua

En quesos sin Neutrased, la cantidad de p3ptidos hidr3fobos determinados a 214 nm (Tabla 49) result3 significativamente ($P < 0,001$) superior cuando se utiliz3 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto. La relaci3n hidr3fobos:hidr3filos tambi3n fue m3s alta ($P < 0,001$) mientras que los niveles de p3ptidos hidr3filos fueron m3s bajos ($P < 0,001$). A 280 nm se registraron resultados similares (Tabla 50), con un mayor nivel ($P < 0,001$) de p3ptidos hidr3fobos y de la relaci3n hidr3fobos:hidr3filos y menor ($P < 0,001$) de p3ptidos hidr3filos en los quesos con leuconostocs.

La adici3n de Neutrased increment3 significativamente ($P < 0,001$) la cantidad de p3ptidos hidr3fobos, hidr3filos y su relaci3n, tanto a 214 como a 280 nm. La adici3n de leuconostocs a los quesos con Neutrased redujo significativamente ($P < 0,001$) la cantidad de p3ptidos hidr3fobos e hidr3filos, sin afectar la relaci3n hidr3fobos:hidr3filos determinados a 214 nm. Los resultados obtenidos a 280 nm fueron similares. A los 60 d de maduraci3n, en los quesos con Neutrased y leuconostocs a 214 nm, el nivel de p3ptidos hidr3fobos fue un 32,8% inferior al detectado en quesos con Neutrased y sin leuconostocs. Esta reducci3n fue del 13,3% cuando se determinaron los p3ptidos a 280 nm.

Tabla 48. Fracciones nitrogenadas¹ en queso de leche cruda elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
N sol a pH 4,6	1	13,76	12,62	17,87	17,31
	15	15,16	13,99	19,14	18,72
	30	18,88	18,62	21,00	24,44 ^a
	45	20,41	17,08 ^a	23,80	27,55 ^a
	60	22,37	21,98	25,66	29,82 ^a
N sol en TCA	1	4,62	7,03 ^a	5,54	4,74 ^a
	15	7,58	8,30 ^a	8,50	8,08 ^a
	30	9,05	9,45 ^a	10,64	11,82 ^a
	45	10,48	11,43 ^a	14,08	14,39 ^a
	60	11,68	12,60 ^a	14,37	15,61 ^a
N sol en PTA	1	1,47	1,40	1,98	2,02
	15	2,47	2,42	3,48	3,00
	30	4,37	3,54 ^a	4,69	4,27
	45	5,13	4,73 ^a	5,40	6,05
	60	5,31	5,50 ^a	6,51	6,66

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del nitrógeno total del queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 49. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Hidrófobos	1	36,33	34,75	79,43	67,81 ^a
	15	82,00	87,72 ^a	142,33	142,42
	30	119,54	123,70	202,88	183,36 ^a
	45	128,54	157,01 ^a	244,59	228,66 ^a
	60	112,97	120,17 ^a	248,92	167,15 ^a
Hidrófilos	1	31,84	28,94	49,39	41,15 ^a
	15	103,31	93,75 ^a	130,88	128,41
	30	181,61	164,58 ^a	233,93	222,40 ^a
	45	210,15	215,96 ^a	378,67	319,94 ^a
	60	236,74	191,50 ^a	444,57	342,64 ^a
Relación	1	1,16	1,21 ^a	1,61	1,65
	15	0,82	0,92 ^a	1,09	1,13
	30	0,65	0,75 ^a	0,87	0,83
	45	0,61	0,72 ^a	0,65	0,72
	60	0,48	0,63 ^a	0,56	0,47

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente (P<0,05) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 50. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Hidrófobos	1	0,54	0,52	2,05	1,57 ^a
	15	1,38	1,43	3,90	3,72
	30	1,19	1,65 ^a	4,62	4,15 ^a
	45	1,74	2,18 ^a	5,78	5,01 ^a
	60	1,49	1,44	4,47	3,00 ^a
Hidrófilos	1	2,29	2,17	2,50	1,93 ^a
	15	4,47	3,28 ^a	5,48	4,86 ^a
	30	7,29	5,76 ^a	9,98	8,93 ^a
	45	8,99	7,67 ^a	17,63	13,70 ^a
	60	10,82	7,32 ^a	16,59	13,58 ^a
Relación	1	0,23	0,25 ^a	0,83	0,81
	15	0,31	0,44 ^a	0,72	0,77
	30	0,16	0,28 ^a	0,46	0,47
	45	0,19	0,29 ^a	0,33	0,36
	60	0,15	0,20 ^a	0,26	0,23

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

3.4.1.1.2.4. Reología

El empleo de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto en la fabricación de quesos sin Neutrasedio dio lugar a valores de fracturabilidad, firmeza y elasticidad significativamente ($P < 0,001$) más bajos que en los quesos sin leuconostocs (Tabla 51). La adición de Neutrasedio produjo un reblandecimiento del queso, disminuyendo ($P < 0,001$) los valores de los tres parámetros. La adición de leuconostocs a los quesos con Neutrasedio también redujo significativamente ($P < 0,001$) los valores de fracturabilidad y firmeza, sin afectar a la elasticidad del queso.

3.4.1.1.2.5. Características sensoriales

La utilización de leuconostocs como adjuntos al fermento comercial no influyó sobre la calidad del sabor, la intensidad del sabor ni el nivel de amargor en el queso de leche cruda (Tabla 52). La adición de Neutrasedio redujo ($P < 0,001$) la calidad del sabor y aumentó ($P < 0,001$) la intensidad del sabor y el amargor del queso. En los quesos con Neutrasedio, la adición de leuconostocs disminuyó ($P < 0,05$) la calidad del sabor en queso de 30 d y no afectó a la intensidad ni al sabor amargo del queso.

3.4.1.1.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjuntos al fermento en quesos de leche cruda

3.4.1.1.3.1. Microbiología, pH y extracto seco

Los microorganismos termófilos alcanzaron sus niveles máximos, de 9,3 log ufc/g, en queso sin Neutrasedio y con el adjunto a los 15 d de maduración. A los 60 d presentaron niveles de 8,4 y 8,5 log ufc/g en los quesos con y sin Neutrasedio, respectivamente.

Se registraron diferencias significativas en el pH (Tabla 53), con valores más altos en los quesos con estreptococos termófilos. La adición de Neutrasedio a la leche no afectó al pH del queso. Con Neutrasedio y cultivo termófilo el pH también fue más elevado que en los quesos sin adjunto.

Tabla 51. Características reológicas¹ del queso de leche cruda elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Fracturabilidad, N	30	10,72	8,95	9,13	6,43 ^a
	60	18,68	14,11 ^a	14,79	11,39 ^a
Firmeza, J	30	0,104	0,092	0,106	0,078 ^a
	60	0,206	0,151 ^a	0,173	0,143 ^a
Elasticidad, N/mm ²	30	0,165	0,123	0,238	0,199
	60	0,442	0,262 ^a	0,487	0,399

¹ Media de determinaciones realizadas por sextuplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente (P<0,05) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 52. Características sensoriales¹ del queso de leche cruda elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Calidad	30	6,06	5,58	5,90	5,20 ^a
	60	6,54	6,92	5,76	5,90
Intensidad	30	5,90	5,92	6,44	6,63
	60	6,60	6,45	7,02	7,26
Amargor	30	0,11	0,32	0,51	0,63
	60	0,17	0,06	0,42	0,48

¹ Media de las puntuaciones otorgadas por un panel de 12 catadores en catas duplicadas de dos fabricaciones, utilizando una escala de 10 puntos.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 53. Valores de pH¹ y extracto² seco en queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
pH	1	5,00	5,15 ^a	4,95	5,08 ^a
	15	4,93	4,98 ^a	4,99	5,03 ^a
	30	4,95	4,98 ^a	5,02	5,07 ^a
	45	5,02	5,02	5,16	5,12 ^a
	60	5,07	5,02 ^a	5,05	5,09 ^a
Extracto seco, %	1	49,58	50,31	50,70	48,58 ^a
	15	52,30	51,05 ^a	53,13	51,55 ^a
	30	56,75	54,81 ^a	57,50	54,91 ^a
	45	58,26	56,02 ^a	59,24	56,83 ^a
	60	61,76	57,48 ^a	62,45	61,41 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

² Media de determinaciones realizadas por triplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Los quesos de leche cruda con estreptococos termófilos presentaron un extracto seco menor ($P < 0,001$) que los quesos sin adjunto (Tabla 53). Las diferencias fueron significativas desde los 15 d y se mantuvieron durante toda la maduración. Los quesos con Neutrased mostraron un extracto seco más alto ($P < 0,001$) que los quesos sin Neutrased, y cuando se añadió Neutrased y el adjunto termófilo presentaron un extracto seco menor que sin el adjunto desde las primeras 24 h.

3.4.1.1.3.2. Proteolisis

En los quesos sin Neutrased, la adición del adjunto termófilo aceleró la proteolisis, detectándose menos ($P < 0,001$) α_{s1} -caseína residual en los quesos con este cultivo (Tabla 54). También los quesos con estreptococos termófilos presentaron menos ($P < 0,001$) β -caseína residual.

La adición de Neutrased aceleró significativamente ($P < 0,001$) la hidrólisis de la α_{s1} - y β -caseína. Sin embargo, en los quesos con Neutrased y el cultivo termófilo se registraron niveles más altos ($P < 0,001$) de ambas fracciones caseínicas residuales.

En los quesos de leche cruda sin Neutrased, se observaron valores más altos ($P < 0,001$) de N soluble a pH 4,6 y N soluble en TCA (Tabla 55) cuando se adicionó el cultivo termófilo a la leche, mientras que la concentración de N soluble en PTA fue menor a los 30 y 45 d de maduración. La presencia de Neutrased no afectó a los niveles de N soluble a pH 4,6, mientras que aumentó ($P < 0,001$) el N soluble en TCA y el N soluble en PTA. En los quesos con Neutrased y estreptococos termófilos no se observaron diferencias significativas en el N soluble a pH 4,6, el N soluble en TCA fue superior ($P < 0,01$) en queso elaborado con el adjunto, mientras que el N soluble en PTA presentó una concentración más baja en presencia del cultivo termófilo.

3.4.1.1.3.3. Péptidos de la fracción soluble en agua

La concentración de péptidos hidrófobos e hidrófilos determinados a 214 nm resultó significativamente ($P < 0,001$) superior en los quesos elaborados con el adjunto termófilo (Tabla 56), aunque la relación hidrófobos:hidrófilos fue inferior ($P < 0,001$). A 280 nm se obtuvieron mayores niveles ($P < 0,001$) de péptidos hidrófobos, hidrófilos y

Tabla 54. Caseínas residuales¹ en queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
α_{s1} -caseína	1	78,2	58,7 ^a	42,8	51,8 ^a
	15	56,3	44,1 ^a	30,2	36,4 ^a
	30	36,8	29,1 ^a	24,6	22,0 ^a
	45	29,6	23,2 ^a	17,8	17,6
	60	26,5	17,7 ^a	12,2	17,6 ^a
β -caseína	1	81,7	77,9	30,8	44,6 ^a
	15	77,7	71,6 ^a	34,4	42,8 ^a
	30	66,5	63,2	33,5	37,7 ^a
	45	55,6	55,1	20,8	33,4 ^a
	60	52,1	35,7 ^a	14,4	29,4 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del contenido en α_{s1} -caseína o β -caseína de la leche.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Tabla 55. Fracciones nitrogenadas¹ en queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
N sol pH 4,6	1	11,08	9,43 ^a	15,09	16,33
	15	13,03	11,29 ^a	19,53	20,47
	30	15,40	13,58 ^a	24,14	21,05
	45	19,90	22,44 ^a	24,61	23,04
	60	21,17	25,37 ^a	26,01	25,57
N sol TCA	1	4,78	3,17 ^a	5,92	5,33 ^a
	15	6,28	6,65 ^a	8,24	9,42 ^a
	30	7,83	8,02	10,43	10,22
	45	10,07	11,24 ^a	11,46	12,15 ^a
	60	10,12	11,64 ^a	12,53	13,17 ^a
N sol PTA	1	1,58	1,54	2,42	1,82 ^a
	15	2,34	2,05	3,31	3,64 ^a
	30	3,97	2,47 ^a	5,30	4,21 ^a
	45	4,50	3,58 ^a	6,37	5,21 ^a
	60	4,52	4,34	6,77	6,36 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del nitrógeno total del queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Tabla 56. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Hidrófobos	1	28,70	26,28	61,79	54,53 ^a
	15	57,22	60,43	132,73	125,03 ^a
	30	78,09	80,09	160,74	146,89 ^a
	45	78,70	116,20 ^a	216,17	187,84 ^a
	60	59,84	84,40 ^a	122,39	127,87
Hidrófilos	1	26,75	26,65	45,51	36,86
	15	76,62	92,35 ^a	155,14	144,88
	30	120,85	131,99	217,11	195,28 ^a
	45	162,15	199,19 ^a	333,87	295,22 ^a
	60	129,33	185,88 ^a	224,78	242,20 ^a
Relación	1	1,08	0,99 ^a	1,37	1,47 ^a
	15	0,75	0,66 ^a	0,86	0,87
	30	0,65	0,61 ^a	0,74	0,76 ^a
	45	0,49	0,58 ^a	0,65	0,65
	60	0,46	0,46	0,55	0,53 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

una mayor relación hidrófobos:hidrófilos cuando se añadió el adjunto (Tabla 57).

La adición de Neutrase aumentó ($P<0,001$) el contenido de péptidos hidrófobos e hidrófilos del queso, así como la relación hidrófobos:hidrófilos a las dos longitudes de onda. En quesos con Neutrase y adjunto termófilo, la cantidad de péptidos hidrófobos e hidrófilos determinados a 214 nm fue significativamente ($P<0,001$) menor que en los quesos sin el cultivo termófilo, aunque a los 60 d no se detectaron diferencias en los niveles de péptidos hidrófobos. La relación hidrófobos:hidrófilos fue mayor. A 280 nm se obtuvieron resultados similares.

A los 60 d no se observó disminución de los niveles de péptidos hidrófobos en quesos con Neutrase y el adjunto termófilo, aunque se detectó un descenso del 8,6% a 214 nm a los 30 d. A 280 nm tampoco se observó este fenómeno a los 60 d, mientras que a los 30 d se obtuvo un descenso del 9,3%.

3.4.1.1.3.4. Reología

La adición de un 1% de cultivo termófilo como adjunto a la leche cruda dio lugar a quesos más blandos (Tabla 58), con una fracturabilidad, una firmeza y una elasticidad inferiores ($P<0,001$) a las observadas en queso sin el adjunto termófilo.

La adición de Neutrase disminuyó ($P<0,001$) los valores de fracturabilidad y firmeza, sin afectar a la elasticidad del queso. Cuando se añadió el adjunto de estreptococos termófilos a los quesos con Neutrase también disminuyeron significativamente ($P<0,001$) los valores de los tres parámetros reológicos investigados.

3.4.1.1.3.5. Características sensoriales

Ni la calidad ni la intensidad del sabor del queso de leche cruda resultaron afectadas por el empleo del adjunto termófilo (Tabla 59). Tampoco se detectaron diferencias en el sabor amargo del queso. La adición de Neutrase disminuyó ($P<0,001$) la calidad e incrementó ($P<0,001$) la intensidad, dando lugar a quesos que recibieron una puntuación más alta ($P<0,001$) de amargor. No se detectaron diferencias entre las

Tabla 57. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Hidrófobos	1	0,39	0,45 ^a	1,59	1,25 ^a
	15	0,78	1,12 ^a	2,77	2,90 ^a
	30	0,98	1,29 ^a	3,56	3,23 ^a
	45	0,80	1,52 ^a	4,38	3,82 ^a
	60	0,46	1,01 ^a	2,64	2,61
Hidrófilos	1	2,46	2,26 ^a	2,70	1,96 ^a
	15	3,68	3,54 ^a	6,23	5,74 ^a
	30	5,81	5,47 ^a	9,29	7,54 ^a
	45	6,46	8,12 ^a	16,77	12,61 ^a
	60	6,13	6,71 ^a	10,44	9,24 ^a
Relación	1	0,17	0,23 ^a	0,61	0,62
	15	0,21	0,32 ^a	0,45	0,51 ^a
	30	0,17	0,24 ^a	0,39	0,43 ^a
	45	0,13	0,19 ^a	0,26	0,31 ^a
	60	0,08	0,15 ^a	0,27	0,28

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Tabla 58. Características reológicas¹ del queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Fracturabilidad, N	30	28,29	16,25 ^a	22,52	14,93 ^a
	60	27,81	15,76 ^a	21,72	19,84 ^a
Firmeza, J	30	0,298	0,175 ^a	0,247	0,171 ^a
	60	0,305	0,170 ^a	0,237	0,220
Elasticidad, N/mm ²	30	0,909	0,459 ^a	0,897	0,498 ^a
	60	0,999	0,414 ^a	0,803	0,677

¹ Media de determinaciones realizadas por sextuplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Tabla 59. Características sensoriales¹ del queso de leche cruda elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Calidad	30	5,26	5,49	4,67	4,98
	60	6,71	6,74	5,93	6,19
Intensidad	30	5,41	5,67	5,80	6,08
	60	7,41	7,31	7,73	7,61
Amargor	30	0,28	0,43	0,88	1,16
	60	0,08	0,16	0,60	0,33

¹ Media de las puntuaciones otorgadas por un panel de 12 catadores en catas duplicadas de dos fabricaciones, utilizando una escala de 10 puntos.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

características sensoriales de los quesos con Neutrased y adjunto y las de los quesos con Neutrased y sin estreptococos termófilos.

3.4.1.2. Quesos de leche pasterizada

3.4.1.2.1. *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche pasterizada

3.4.1.2.1.1. Microbiología, pH y extracto seco

En quesos con *L. plantarum* como adjunto, los lactobacilos alcanzaron niveles de 8,6-8,7 log ufc/g en queso de 24 h, aumentando hasta 9,3-9,4 log ufc/g a los 45 d. En queso sin lactobacilos se obtuvieron valores de 7,4-7,6 log ufc/g durante la maduración. La adición de Neutrased no influyó significativamente en el desarrollo de este microorganismo en el queso.

El pH resultó significativamente ($P < 0,001$) más bajo cuando se añadieron lactobacilos a la leche (Tabla 60), indicando la producción de ácido láctico por el adjunto. En quesos sin Neutrased no se detectaron diferencias de pH hasta los 30 d, momento a partir del cual el pH fue más bajo en los quesos con lactobacilos. En queso con Neutrased y lactobacilos el pH fue significativamente ($P < 0,001$) menor durante toda la maduración.

No se observaron diferencias significativas en el extracto seco del queso debidas a la inoculación con *L. plantarum* (Tabla 60). Por el contrario, la adición de Neutrased ($P < 0,01$) y el tiempo de maduración ($P < 0,001$) incrementaron los valores de este parámetro.

3.4.1.2.1.2. Proteolisis

En queso sin Neutrased la degradación de α_{s1} - y β -caseína disminuyó ($P < 0,001$) por la inoculación con *L. plantarum* y se incrementó ($P < 0,001$) con el tiempo de

Tabla 60. Valores de pH¹ y extracto² seco en queso de leche pasteurizada elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
pH	1	4,90	4,91	4,91	4,88 ^a
	15	4,89	4,88	4,93	4,90 ^a
	30	4,99	4,94 ^a	4,99	4,87 ^a
	45	5,18	5,01 ^a	5,21	4,99 ^a
	60	5,19	5,09 ^a	5,21	5,09 ^a
Extracto seco, %	1	48,29	48,26	46,67	47,53
	15	54,07	52,49	53,96	54,33
	30	56,10	56,84	57,05	57,03
	45	57,12	56,42	58,24	59,07
	60	57,92	59,94	59,05	58,95

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

² Media de determinaciones realizadas por triplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

maduración (Tabla 61). Las diferencias causadas por la adición de lactobacilos fueron observadas desde las primeras 24 h.

La adición de Neutrase incrementó significativamente ($P < 0,001$) la hidrólisis de α_{s1} - y β -caseína. En quesos con Neutrase, la inoculación con *L. plantarum* disminuyó la degradación de α_{s1} -caseína ($P < 0,01$) y de β -caseína ($P < 0,001$). En el queso de 24 h, tanto la α_{s1} -caseína como la β -caseína residuales eran significativamente más altas con lactobacilos. A partir de los 15 d no se detectaron diferencias en el contenido de α_{s1} -caseína residual entre quesos con y sin lactobacilos. Sin embargo, la β -caseína permaneció con niveles significativamente más altos en los quesos con lactobacilos durante todo el periodo de maduración.

En quesos sin Neutrase la formación de N soluble a pH 4,6, N soluble en TCA y N soluble en PTA durante la maduración (Tabla 62) disminuyó ($P < 0,001$) por la adición de lactobacilos. La adición de Neutrase a la leche incrementó significativamente ($P < 0,001$) la formación de N soluble a pH 4,6, N soluble en TCA y N soluble en PTA. En quesos con Neutrase, la inoculación con *L. plantarum* disminuyó ($P < 0,001$) la formación de N soluble a pH 4,6 durante el segundo mes de maduración, posiblemente debido a la menor actividad de las enzimas caseinolíticas a causa del bajo pH de estos quesos. Sin embargo, el N soluble en TCA fue superior ($P < 0,001$) en los quesos con lactobacilos. El N soluble en PTA fue más bajo ($P < 0,001$) también en los quesos con lactobacilos, probablemente por el efecto adverso del pH en la actividad peptidolítica del queso, así como por la metabolización de pequeños péptidos y aminoácidos por los lactobacilos.

3.4.1.2.1.3. Péptidos de la fracción soluble en agua

En las Figuras 4 y 5 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante HPLC en fase reversa de la fracción soluble en agua de queso de 60 d elaborado sin o con lactobacilos y detección a 214 y 280 nm, respectivamente.

En quesos sin Neutrase, la adición de lactobacilos dio lugar a niveles inferiores ($P < 0,001$) de péptidos hidrófobos e hidrófilos medidos a 214 y 280 nm (Tablas 63 y 64).

Tabla 61. Caseínas residuales¹ en queso de leche pasteurizada elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
α_{s1} -caseína	1	86,1	97,0 ^a	68,6	78,7 ^a
	15	56,5	61,8	43,7	47,2
	30	42,4	51,5 ^a	39,5	39,2
	45	36,8	49,1 ^a	31,6	32,3
	60	26,0	39,5 ^a	27,2	29,5
β -caseína	1	84,6	94,4 ^a	46,8	59,9 ^a
	15	77,4	80,5	35,1	42,7 ^a
	30	70,5	72,8	31,8	40,2 ^a
	45	63,2	71,4 ^a	28,4	37,2 ^a
	60	56,7	64,2 ^a	25,3	31,8 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del contenido en α_{s1} -caseína o β -caseína de la leche.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Tabla 62. Fracciones nitrogenadas¹ en queso de leche pasteurizada elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
N sol pH 4,6	1	10,39	11,71 ^a	18,62	19,02
	15	11,88	12,42	20,12	20,43
	30	15,05	13,53 ^a	21,41	21,78
	45	20,90	14,68 ^a	25,74	23,73 ^a
	60	22,00	16,37 ^a	28,04	24,88 ^a
N sol TCA	1	3,79	4,26 ^a	5,89	4,68 ^a
	15	5,77	6,70 ^a	8,19	8,57 ^a
	30	6,88	7,63 ^a	10,05	11,05 ^a
	45	10,60	8,67 ^a	13,31	13,79 ^a
	60	10,87	9,08 ^a	14,83	15,09
N sol PTA	1	1,68	1,73	2,33	1,96 ^a
	15	2,42	2,05 ^a	3,81	3,92
	30	3,60	3,33 ^a	5,38	5,06 ^a
	45	5,32	4,35 ^a	6,75	6,04 ^a
	60	5,68	4,64 ^a	8,21	7,90 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del nitrógeno total del queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

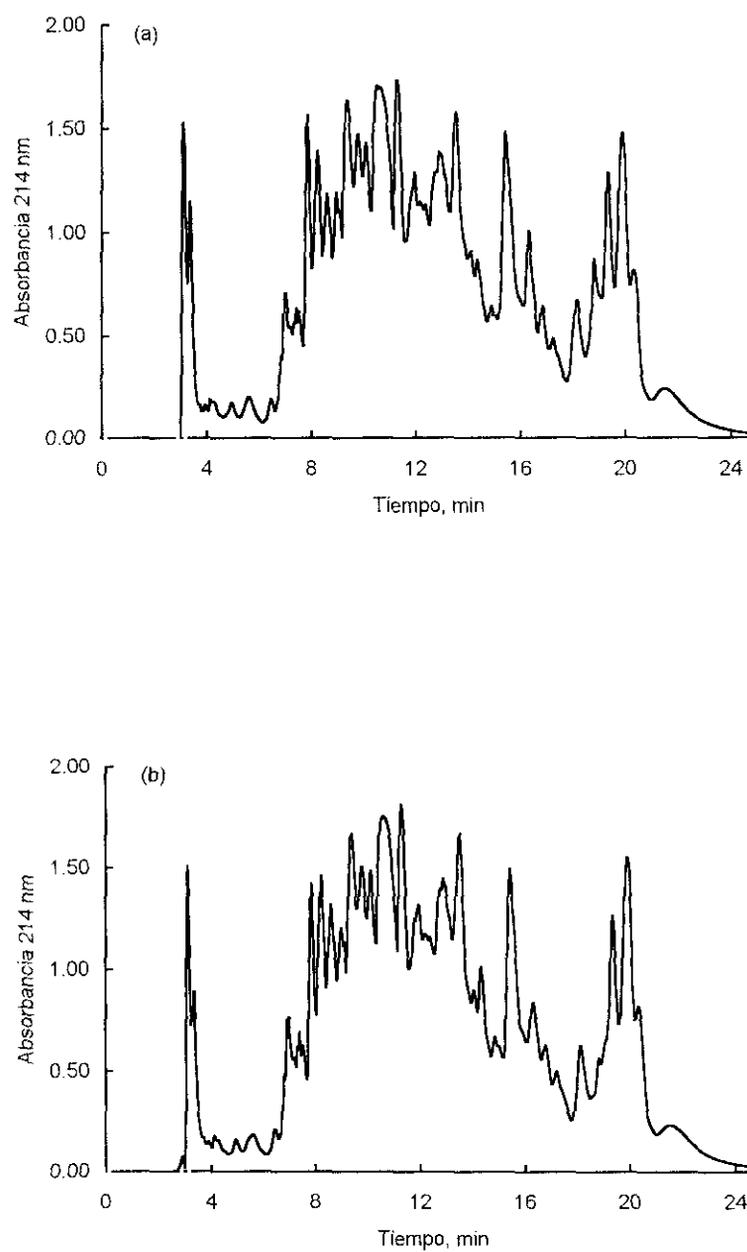


Figura 4. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y *L. plantarum* ESI 144 (b) a 214 nm.

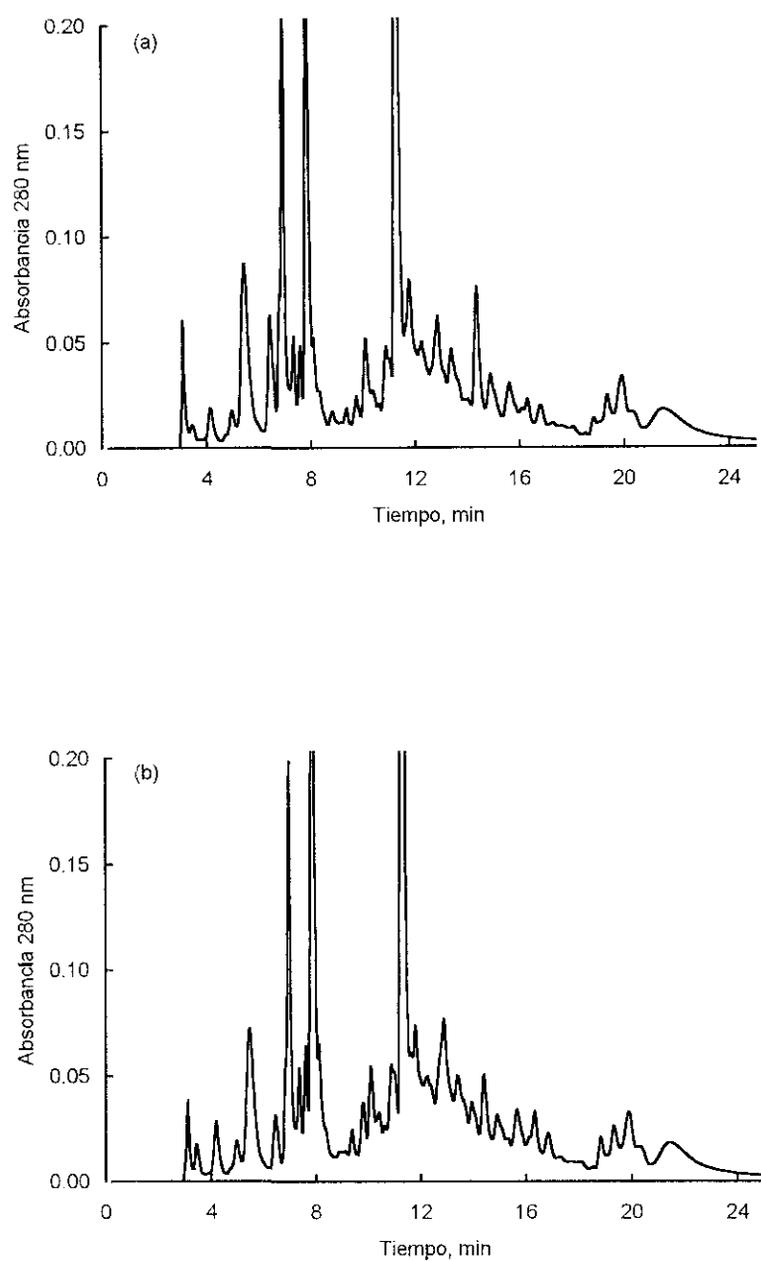


Figura 5. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y *L. plantarum* ESI 144 (b) a 280 nm.

Tabla 63. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Hidrófobos	1	42,17	31,65 ^a	91,92	74,43 ^a
	15	75,29	61,14 ^a	120,49	114,39 ^a
	30	87,90	71,49 ^a	153,61	134,21 ^a
	45	96,80	73,48 ^a	137,02	121,94 ^a
	60	98,53	89,25 ^a	173,68	137,82 ^a
Hidrófilos	1	46,92	34,81 ^a	78,44	73,50
	15	98,61	81,50 ^a	153,14	154,51
	30	139,60	109,39 ^a	238,26	203,59 ^a
	45	171,18	123,89 ^a	230,20	231,74
	60	195,75	163,98 ^a	307,89	263,85 ^a
Relación	1	0,90	0,91	1,19	1,02 ^a
	15	0,77	0,76	0,79	0,74 ^a
	30	0,63	0,66 ^a	0,65	0,66
	45	0,56	0,59 ^a	0,60	0,53 ^a
	60	0,51	0,55 ^a	0,56	0,52 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Tabla 64. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.

		0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Hidrófobos	1	0,62	0,38 ^a	1,58	1,39 ^a
	15	1,01	0,83 ^a	2,30	2,10 ^a
	30	1,18	0,87 ^a	2,57	2,42 ^a
	45	1,17	0,95 ^a	2,34	1,92 ^a
	60	1,15	1,06 ^a	2,41	1,91 ^a
Hidrófilos	1	4,51	2,61 ^a	5,16	3,98 ^a
	15	5,19	3,73 ^a	7,12	6,45 ^a
	30	6,55	4,49 ^a	11,51	9,13 ^a
	45	8,12	4,90 ^a	11,64	10,13 ^a
	60	7,78	6,91 ^a	14,06	12,28 ^a
Relación	1	0,14	0,15 ^a	0,31	0,35 ^a
	15	0,20	0,22 ^a	0,32	0,31
	30	0,19	0,19	0,23	0,27 ^a
	45	0,14	0,19 ^a	0,20	0,19 ^a
	60	0,15	0,16 ^a	0,17	0,16 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Sin embargo, la relación hidrófobos:hidrófilos fue más alta ($P < 0,001$) en quesos con *L. plantarum* ($P < 0,001$) y descendió ($P < 0,001$) con el aumento del tiempo de maduración. En quesos sin Neutrased, el nivel de péptidos hidrófobos a los 60 d, determinado a 214 y 280 nm, disminuyó un 9,4% y un 7,8% por la inoculación de *L. plantarum* ESI 144.

La adición de Neutrased aumentó ($P < 0,001$) la formación de péptidos hidrófobos e hidrófilos, así como la relación hidrófobos:hidrófilos a las dos longitudes de onda. En quesos con Neutrased, los niveles de péptidos hidrófobos, hidrófilos y la relación hidrófobos:hidrófilos a 214 nm disminuyeron significativamente ($P < 0,001$) por la inoculación de la leche con *L. plantarum*. A 280 nm, sus valores también fueron significativamente ($P < 0,001$) menores en quesos con adición del adjunto. Por el contrario, su relación aumentó ($P < 0,01$) en los quesos con lactobacilos. La adición de *L. plantarum* a la leche disminuyó en los quesos de 60 d el nivel de péptidos hidrófobos un 20,6% y un 20,7%, a 214 y 280 nm respectivamente.

3.4.1.2.1.4. Reología

En quesos sin Neutrased, la adición de lactobacilos produjo un incremento significativo ($P < 0,001$) de los valores de fracturabilidad, firmeza y elasticidad (Tabla 65). La adición de Neutrased dio lugar a quesos más blandos ($P < 0,001$). En los quesos con Neutrased, la inoculación con *L. plantarum* proporcionó quesos con valores más altos ($P < 0,01$) de fracturabilidad y firmeza, aunque a los 60 d de maduración las características reológicas de los quesos elaborados con Neutrased con o sin lactobacilos no diferían significativamente.

3.4.1.2.1.5. Características sensoriales

La adición de lactobacilos en quesos sin Neutrased proporcionó valores de calidad del sabor del queso significativamente ($P < 0,05$) inferiores que cuando no se añadía el adjunto (Tabla 66). Sin embargo, ni la intensidad del sabor ni el sabor amargo resultaron afectados por la adición de *L. plantarum*.

La adición de Neutrased a la leche aumentó significativamente ($P < 0,001$) la intensidad del sabor y el amargor, mientras que la calidad del sabor no resultó afectada.

Tabla 65. Características reológicas¹ del queso de leche pasteurizada elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Fracturabilidad, N	30	18,62	27,26 ^a	14,94	19,26 ^a
	60	21,83	29,56 ^a	16,14	17,55
Firmeza, J	30	0,189	0,251 ^a	0,142	0,193 ^a
	60	0,237	0,300 ^a	0,183	0,197
Elasticidad, N/mm²	30	0,427	0,638 ^a	0,459	0,596
	60	0,572	0,774 ^a	0,546	0,554

¹ Media de determinaciones realizadas por sextuplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

Tabla 66. Características sensoriales¹ del queso de leche pasteurizada elaborado con *L. plantarum* ESI 144 (Lb) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Lb	1% Lb	0% Lb	1% Lb
Calidad	30	5,47	5,15	4,41	4,70
	60	6,38	5,45 ^a	6,05	5,64
Intensidad	30	4,89	5,00	5,65	5,75
	60	5,57	5,52	6,54	5,92
Amargor	30	0,65	0,74	2,37	1,55 ^a
	60	0,15	0,26	1,00	0,62

¹ Media de las puntuaciones otorgadas por un panel de 12 catadores en catas duplicadas de dos fabricaciones, utilizando una escala de 10 puntos.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. plantarum*.

En quesos con Neutrased, la inoculación con *L. plantarum* influyó significativamente ($P < 0,05$) sobre el amargor causado por la proteinasa. A los 30 d, la puntuación de amargor resultó inferior en los quesos con lactobacilos, aunque a los 60 d no se detectaron diferencias significativas.

3.4.1.2.2. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche pasteurizada

3.4.1.2.2.1. Microbiología, pH y extracto seco

La adición de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto al fermento en queso de leche pasteurizada dio lugar a niveles significativamente ($P < 0,001$) superiores de leuconostocs en queso.

A las 24 h se observaron niveles de 7,9-8,2 log ufc/g, que fueron de aproximadamente 8,1 log ufc/g en queso de 60 d de maduración. En los quesos sin leuconostocs añadidos, los valores obtenidos fueron de 6,8-7,7 log ufc/g a las 24 h y algo inferiores, de 6,0-6,2 log ufc/g, al cabo de 2 meses, debido a la presencia de leuconostocs en el fermento comercial empleado en la elaboración del queso.

El pH de los quesos de leche pasteurizada no resultó afectado por la inoculación con leuconostocs (Tabla 67). La presencia de Neutrased en el queso tampoco influyó sobre esta característica.

Se comprobó la existencia de diferencias significativas en el extracto seco de los quesos sin Neutrased (Tabla 67), con un valor más bajo ($P < 0,01$) en los quesos con leuconostocs. La adición de Neutrased a la leche pasteurizada dio lugar a quesos con un extracto seco superior ($P < 0,001$). Los quesos con Neutrased presentaron un extracto seco significativamente ($P < 0,001$) más bajo cuando se añadió el adjunto. Sin embargo, sólo se detectaron estas diferencias durante los primeros 15 d y en las primeras 24 h, respectivamente.

Tabla 67. Valores de pH¹ y extracto² seco en queso de leche pasteurizada elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
pH	1	4,93	4,96	4,91	4,93
	15	4,84	4,82	4,91	4,83
	30	4,82	4,86	4,79	4,78
	45	4,98	4,95	5,00	4,97
	60	4,95	4,98	4,90	4,93
Extracto seco, %	1	50,21	46,67 ^a	49,13	48,92 ^a
	15	54,16	51,59 ^a	55,41	53,64
	30	56,57	56,67	57,59	56,63
	45	59,15	59,23	60,40	59,94
	60	61,46	62,35	63,59	62,71

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

² Media de determinaciones realizadas por triplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

3.4.1.2.2.2. Proteolisis

La presencia de leuconostocs inoculados en la leche produjo un aumento significativo ($P < 0,001$) de la degradación de α_{s1} - y β -caseína (Tabla 68) en los quesos sin Neutrased. La adición de Neutrased también incrementó ($P < 0,001$) la proteolisis en los quesos de leche pasteurizada. Sin embargo, cuando se adicionaron leuconostocs y Neutrased a la leche la degradación de ambas fracciones caseínicas disminuyó significativamente ($P < 0,001$), con niveles más altos de α_{s1} - y β -caseína residual en estos quesos que en los quesos con Neutrased y sin leuconostocs.

La producción de N soluble a pH 4,6 y N soluble en TCA se incrementó significativamente ($P < 0,001$) en los quesos con leuconostocs (Tabla 69), mientras que los niveles de N soluble en PTA fueron más bajos ($P < 0,001$). La adición de Neutrased aumentó ($P < 0,001$) los valores de las tres fracciones nitrogenadas. En los quesos con Neutrased y leuconostocs disminuyó ($P < 0,001$) la formación de N soluble a pH 4,6 y N soluble en TCA, aunque las diferencias se detectaron a partir de los 30 y 45 d de maduración, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en el N soluble en PTA entre quesos con Neutrased y leuconostocs y quesos con Neutrased y sin el adjunto.

3.4.1.2.2.3. Péptidos de la fracción soluble en agua

En las Figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante HPLC en fase reversa de la fracción soluble en agua de los quesos de 60 d elaborados sin y con leuconostocs y detección a 214 y 280 nm, respectivamente.

En los quesos de leche pasteurizada elaborados sin Neutrased y con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, se registraron a 214 nm niveles de péptidos hidrófobos, hidrófilos y de la relación hidrófobos:hidrófilos significativamente ($P < 0,001$) más elevados que en ausencia del cultivo adjunto (Tabla 70). A 280 nm se obtuvieron resultados similares (Tabla 71). La presencia de Neutrased en el queso también incrementó significativamente ($P < 0,001$) los niveles de ambos grupos así como su relación a las dos longitudes de onda estudiadas.

Tabla 68. Caseínas residuales¹ en queso de leche pasteurizada elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
α_{s1} -caseína	1	70,0	61,8 ^a	45,62	46,0
	15	53,6	43,9 ^a	31,13	35,7 ^a
	30	38,8	27,0 ^a	24,92	26,7 ^a
	45	26,5	27,3	19,12	20,8 ^a
	60	24,6	22,8	17,01	17,7
β -caseína	1	64,0	57,4 ^a	26,3	27,7
	15	60,3	55,3 ^a	18,1	28,1 ^a
	30	55,5	43,3 ^a	16,4	23,8 ^a
	45	47,4	42,2 ^a	15,8	20,9 ^a
	60	48,6	39,7 ^a	15,3	17,7 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del contenido en α_{s1} -caseína o β -caseína de la leche.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 69. Fracciones nitrogenadas¹ en queso de leche pasteurizada elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
N sol a pH 4,6	1	10,53	12,46 ^a	15,36	18,67 ^a
	15	14,71	15,42 ^a	19,48	19,28
	30	16,08	16,91 ^a	23,01	20,49 ^a
	45	16,83	17,61 ^a	25,53	22,28 ^a
	60	17,38	21,16 ^a	25,10	23,06 ^a
N sol en TCA	1	3,87	5,68 ^a	6,24	5,94
	15	5,93	6,98 ^a	8,77	8,90
	30	6,89	7,80 ^a	10,48	10,43
	45	7,39	9,51 ^a	13,16	11,31 ^a
	60	8,14	11,58 ^a	14,30	12,06 ^a
N sol en PTA	1	1,99	1,85	2,22	2,92
	15	3,59	2,53 ^a	3,80	3,56
	30	4,10	3,37 ^a	4,58	4,76
	45	4,38	4,26	5,82	5,36
	60	5,43	4,67 ^a	6,63	6,45

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del nitrógeno total del queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

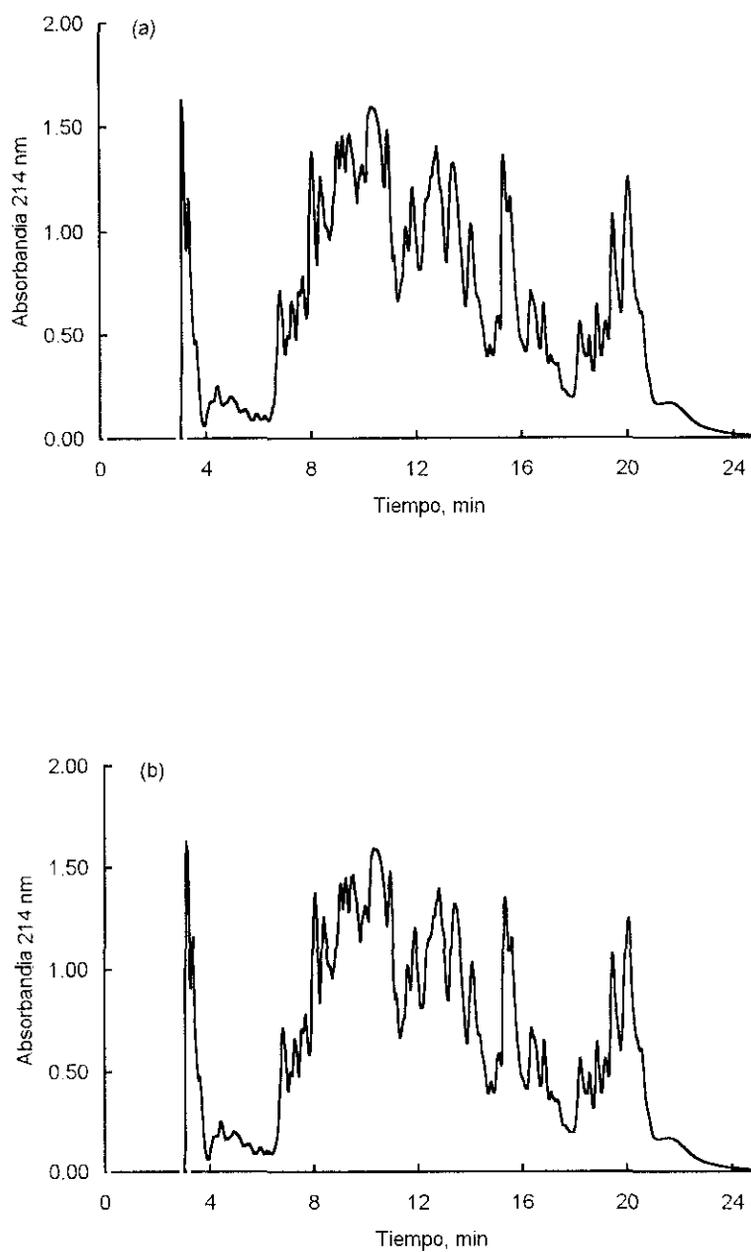


Figura 6. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y *L.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (b) a 214 nm.

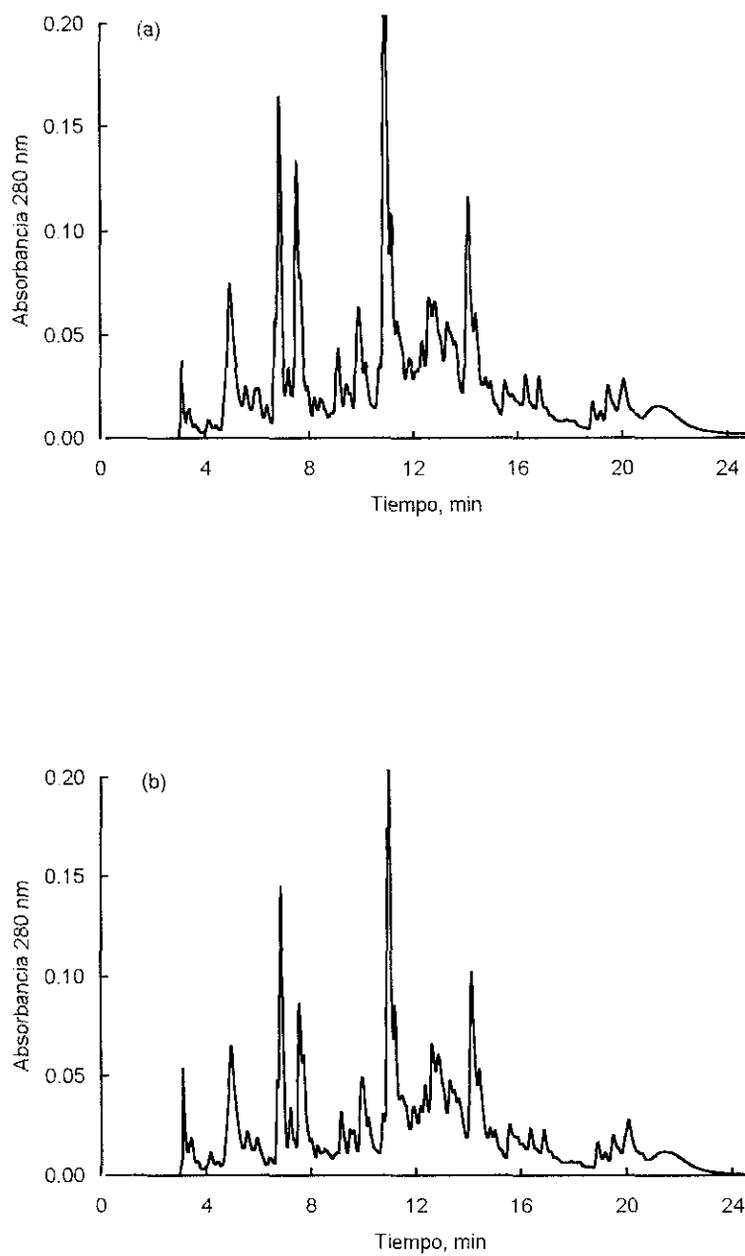


Figura 7. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrase (a) y con Neutrase y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (b) a 280 nm.

Tabla 70. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Hidrófobos	1	32,55	32,72	99,85	65,37 ^a
	15	68,38	73,53 ^a	150,99	117,50 ^a
	30	86,61	106,70 ^a	182,10	154,04 ^a
	45	141,60	154,65 ^a	234,14	186,12 ^a
	60	117,35	121,37 ^a	226,59	190,66 ^a
Hidrófilos	1	33,45	33,96	79,73	54,39 ^a
	15	86,89	86,98	161,79	125,18 ^a
	30	114,01	129,85 ^a	229,35	194,28 ^a
	45	210,07	226,75 ^a	354,09	270,56 ^a
	60	192,94	194,05 ^a	358,29	288,95 ^a
Relación	1	0,98	0,97	1,27	1,21
	15	0,79	0,85 ^a	0,94	0,95
	30	0,75	0,82 ^a	0,79	0,79
	45	0,68	0,68 ^a	0,67	0,69
	60	0,61	0,63 ^a	0,63	0,66

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente (P<0,05) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 71. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasterizada elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrased, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Hidrófobos	1	0,49	0,46	2,27	1,26 ^a
	15	0,97	1,36 ^a	4,08	2,25 ^a
	30	1,19	1,63 ^a	4,34	2,94 ^a
	45	1,87	2,63 ^a	5,70	4,09 ^a
	60	2,33	2,60 ^a	5,00	4,64 ^a
Hidrófilos	1	1,87	2,24 ^a	3,55	2,76 ^a
	15	3,03	3,06	6,57	4,51 ^a
	30	4,55	5,83 ^a	10,93	8,73 ^a
	45	8,13	10,65 ^a	18,74	14,63 ^a
	60	8,59	7,94 ^a	18,54	13,41 ^a
Relación	1	0,30	0,21 ^a	0,64	0,46 ^a
	15	0,33	0,44 ^a	0,62	0,49 ^a
	30	0,26	0,28	0,39	0,33 ^a
	45	0,24	0,24	0,31	0,28 ^a
	60	0,27	0,32 ^a	0,27	0,35 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Cuando se añadió el cultivo de leuconostocs a los quesos con Neutrased se comprobó una menor cantidad ($P < 0,001$) de péptidos hidrófobos e hidrófilos a 214 nm mientras que la relación hidrófobos:hidrófilos no varió. A 280 nm tanto los péptidos hidrófobos como los hidrófilos y su relación alcanzaron valores más altos ($P < 0,001$) en los quesos sin el adjunto de leuconostocs. Se observó una reducción del 15,9% a 214 nm y del 7,2% a 280 nm en el contenido de péptidos hidrófobos de los quesos de 60 d con Neutrased y leuconostocs comparados con los quesos con Neutrased y sin leuconostocs.

3.4.1.2.2.4. Reología

La inoculación de la leche con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 condujo a un reblandecimiento de los quesos, con valores más bajos de fracturabilidad, firmeza y elasticidad en los quesos sin Neutrased (Tabla 72). Cuando se añadió Neutrased a la leche pasteurizada también se observó este fenómeno. Sin embargo, las características reológicas de los quesos con Neutrased y leuconostocs no diferían de los valores encontrados en los quesos con Neutrased y sin el adjunto.

3.4.1.2.2.5. Características sensoriales

La calidad ($P < 0,01$) y la intensidad ($P < 0,05$) del sabor del queso resultaron significativamente afectados por la adición de leuconostocs a la leche pasteurizada, con valores más altos en los quesos sin el adjunto (Tabla 73). Sin embargo, los quesos sin Neutrased y con el adjunto resultaron más amargos ($P < 0,01$).

La presencia de Neutrased disminuyó significativamente ($P < 0,001$) la calidad del sabor e incrementó ($P < 0,001$) la intensidad del sabor, pero produjo amargor en el queso. Cuando se combinó Neutrased y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* no se detectaron diferencias significativas en la calidad del queso con o sin leuconostocs. La intensidad fue superior ($P < 0,01$) sin el adjunto, mientras que los quesos con Neutrased y leuconostocs resultaron significativamente ($P < 0,05$) menos amargos que los quesos que únicamente contenían Neutrased.

Tabla 72. Características reológicas¹ del queso de leche pasteurizada elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Fracturabilidad, N	30	25,86	18,50 ^a	14,12	14,58
	60	36,23	29,47 ^a	23,23	21,44
Firmeza, J	30	0,273	0,200 ^a	0,144	0,154
	60	0,413	0,323 ^a	0,255	0,234
Elasticidad, N/mm ²	30	0,686	0,428 ^a	0,454	0,394
	60	1,108	0,826 ^a	0,794	0,729

¹ Media de determinaciones realizadas por sextuplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente (P<0,05) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabla 73. Características sensoriales¹ del queso de leche pasteurizada elaborado con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 (Leuc) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% Leuc	1% Leuc	0% Leuc	1% Leuc
Calidad	30	5,57	4,48 ^a	4,24	4,15
	60	5,72	5,58	3,80	4,37
Intensidad	30	4,88	4,20 ^a	5,38	4,94 ^a
	60	5,81	5,78	6,42	6,09 ^a
Amargor	30	0,15	0,34	1,74	1,68
	60	0,32	0,70 ^a	2,61	1,57 ^a

¹ Media de las puntuaciones otorgadas por un panel de 12 catadores en catas duplicadas de dos fabricaciones, utilizando una escala de 10 puntos.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

3.4.1.2.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjuntos al fermento en quesos de leche pasterizada

3.4.1.2.3.1. Microbiología, pH y extracto seco

Los niveles de microorganismos termófilos a los 15 d de maduración fueron de 9,3 log ufc/g en queso sin Neutrased y de 8,3 log ufc/g en queso con Neutrased. A partir de los 30 d se observaron recuentos superiores en los quesos con Neutrased. Al final del periodo de maduración se registraron valores de 6,4 log ufc/g y de 8,1 log ufc/g, respectivamente.

Se comprobó que el pH de los quesos elaborados con estreptococos termófilos alcanzó valores más altos ($P < 0,001$) que el de los quesos sin adjunto (Tabla 74). La adición de Neutrased no afectó al pH del queso. También en queso con Neutrased y estreptococos termófilos el pH fue superior al del queso con Neutrased sin adjunto.

Los quesos con estreptococos termófilos presentaron un menor ($P < 0,001$) extracto seco que los quesos sin el adjunto excepto en el día 1 (Tabla 74). El extracto seco de los quesos con Neutrased fue significativamente ($P < 0,001$) mayor que el de los quesos sin Neutrased. Cuando se añadió el adjunto, se observó un extracto seco más alto ($P < 0,001$) que en ausencia del cultivo termófilo.

3.4.1.2.3.2. Proteolisis

Se comprobó una mayor ($P < 0,001$) degradación de las caseínas α_{s1} y β en los quesos con el adjunto termófilo (Tabla 75). En quesos sin Neutrased, los valores de caseína α_{s1} residual fueron más bajos en presencia del adjunto, mientras que la caseína β no resultó afectada. La adición de Neutrased a la leche pasterizada aceleró ($P < 0,001$) la hidrólisis de ambas fracciones caseínicas

En los quesos con Neutrased y cultivo termófilo se registraron niveles inferiores ($P < 0,001$) de α_{s1} y β caseína residuales que en los quesos con Neutrased sin el adjunto termófilo.

Tabla 74. Valores de pH¹ y extracto² seco en queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
pH	1	4,97	5,04 ^a	4,92	5,04 ^a
	15	5,02	5,08 ^a	4,95	5,08 ^a
	30	4,98	5,06 ^a	4,91	5,11 ^a
	45	5,05	5,10 ^a	5,01	5,05 ^a
	60	5,00	5,11 ^a	4,99	5,08 ^a
Extracto seco, %	1	51,28	50,59	50,35	52,15 ^a
	15	55,42	52,39 ^a	53,89	56,25 ^a
	30	57,22	54,41 ^a	58,81	59,81
	45	59,19	56,31 ^a	61,81	63,00 ^a
	60	61,35	58,33 ^a	65,82	65,56

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones.

² Media de determinaciones realizadas por triplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Tabla 75. Caseínas residuales¹ en queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
α_{s1} -caseína	1	67,5	56,7 ^a	41,8	55,0 ^a
	15	41,4	43,1	35,0	32,7 ^a
	30	30,7	30,7	26,2	21,3 ^a
	45	25,8	18,7 ^a	19,8	14,1 ^a
	60	24,2	15,4 ^a	14,7	10,0 ^a
β -caseína	1	58,9	65,7	29,9	42,1 ^a
	15	56,9	62,7	28,7	18,7 ^a
	30	53,5	59,0	27,4	18,1 ^a
	45	46,6	41,0	21,5	8,4 ^a
	60	43,8	39,3	19,3	6,8 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del contenido en α_{s1} -caseína o β -caseína de la leche.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

El N soluble a pH 4,6 hasta los 30 d y el N soluble en TCA durante los 60 d de maduración registraron concentraciones más bajas ($P < 0,001$) en los quesos con el adjunto (Tabla 76), mientras que la adición de estos microorganismos no influyó sobre el N soluble en PTA. La presencia de Neutrasedio lugar a niveles más elevados ($P < 0,001$) de las tres fracciones nitrogenadas estudiadas. En los quesos con Neutrasedy termófilos se observaron valores superiores de N soluble a pH 4,6 ($P < 0,001$), N soluble en TCA ($P < 0,01$) y N soluble en PTA ($P < 0,001$) que en los quesos sin el adjunto.

3.4.1.2.3.3. Péptidos de la fracción soluble en agua

En las Figuras 8 y 9 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante HPLC en fase reversa de la fracción soluble en agua de queso de 60 d elaborado sin y con estreptococos termófilos y detección a 214 y 280 nm, respectivamente.

En queso de leche pasteurizada con un 1% de estreptococos termófilos se observó una disminución significativa ($P < 0,001$) de los niveles de péptidos hidrófobos, hidrófilos y de la relación hidrófobos:hidrófilos a 214 nm (Tabla 77). A 280 nm también se obtuvieron niveles más bajos de péptidos hidrófobos e hidrófilos, y una relación hidrófobos:hidrófilos significativamente ($P < 0,001$) mayor (Tabla 78).

La adición de Neutrasedió el nivel de péptidos hidrófobos e hidrófilos, así como la relación hidrófobos:hidrófilos, tanto a 214 como a 280 nm. En los quesos de leche pasteurizada con Neutrasedy adjunto se registraron niveles más altos ($P < 0,001$) de péptidos hidrófobos e hidrófilos a 214 y 280 nm. La relación hidrófobos:hidrófilos a 214 nm no resultó afectada por la adición del adjunto, mientras que a 280 nm fue superior ($P < 0,001$) en los quesos con estreptococos termófilos.

3.4.1.2.3.4. Reología

En quesos sin Neutrased, los valores de los tres parámetros reológicos evaluados disminuyeron ($P < 0,001$) significativamente (Tabla 79) cuando se inoculó el adjunto termófilo. La adición de la proteínasatambién causó un reblandecimiento del queso. Sin embargo, los quesos de leche pasteurizada con Neutrasedy estreptococos termófilos

Tabla 76. Fracciones nitrogenadas¹ en queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrased.

	Días	0 UA Neutrased/l		0,01 UA Neutrased/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
N sol pH 4,6	1	12,89	11,87 ^a	16,15	21,72 ^a
	15	14,58	12,43 ^a	20,83	22,52 ^a
	30	15,96	14,37 ^a	23,84	23,30 ^a
	45	19,76	21,84 ^a	24,43	24,67
	60	21,31	22,88 ^a	25,05	27,58 ^a
N sol TCA	1	4,71	5,21 ^a	6,61	5,58 ^a
	15	7,30	6,14 ^a	9,02	10,72 ^a
	30	8,08	7,11 ^a	10,33	11,46 ^a
	45	10,83	10,02 ^a	12,96	12,43 ^a
	60	11,92	10,95 ^a	13,58	13,04 ^a
N sol PTA	1	2,21	2,19	2,51	1,57 ^a
	15	3,05	2,41	3,49	4,18 ^a
	30	3,18	2,92	4,53	5,90 ^a
	45	5,48	4,85	5,46	8,98 ^a
	60	5,77	6,72	6,58	10,64 ^a

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como porcentaje del nitrógeno total del queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

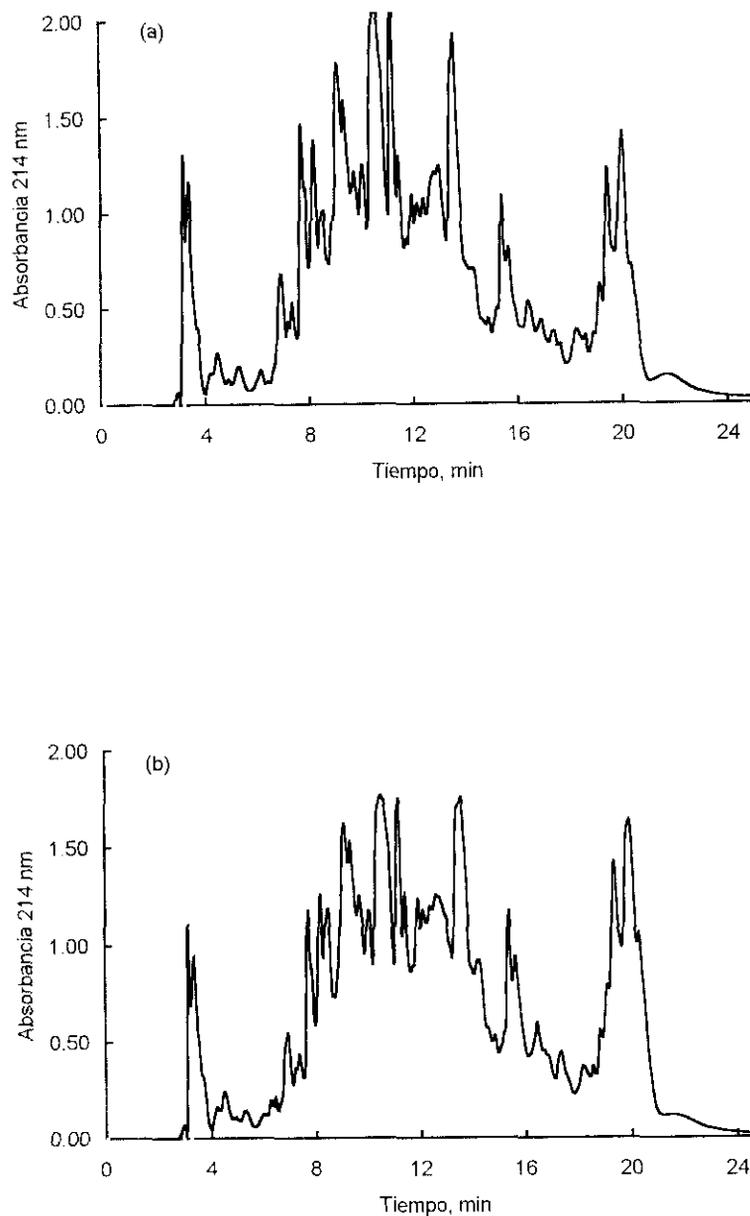


Figura 8. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y estreptococos termófilos (TA 558) a 214 nm.

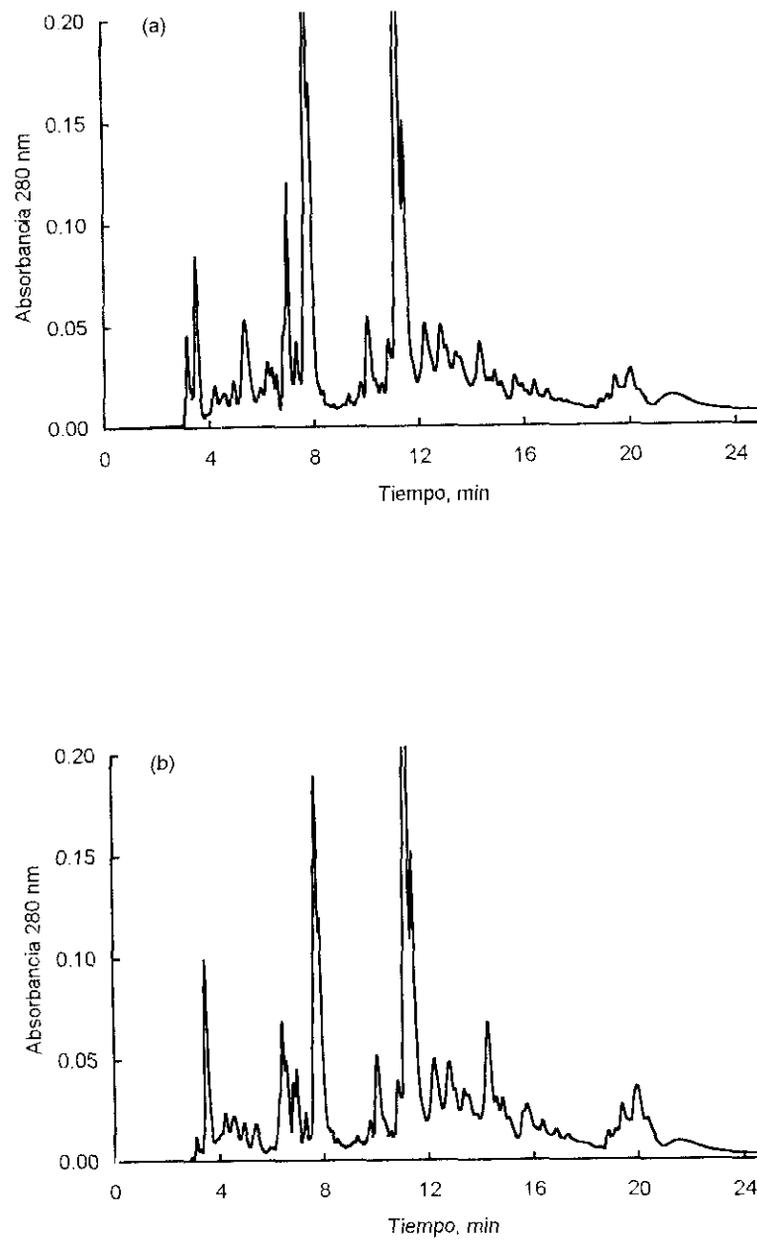


Figura 9. Cromatograma de la fracción soluble en agua de queso semiduro de vaca de 60 d elaborado con Neutrased (a) y con Neutrased y estreptococos termófilos (TA 558) a 280 nm.

Tabla 77. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 214 nm.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Hidrófobos	1	39,39	30,03 ^a	69,80	70,98
	15	72,29	63,77 ^a	106,78	136,55 ^a
	30	89,87	96,67 ^a	138,77	180,38 ^a
	45	122,16	112,44 ^a	155,47	176,00 ^a
	60	76,29	69,27 ^a	113,55	148,12 ^a
Hidrófilos	1	38,65	34,01 ^a	56,25	62,76
	15	112,92	93,78 ^a	131,69	175,19 ^a
	30	140,85	159,82 ^a	205,74	277,73 ^a
	45	202,76	193,53 ^a	273,31	311,37 ^a
	60	154,25	146,88 ^a	275,35	269,28
Relación	1	1,00	0,87 ^a	1,21	1,14
	15	0,64	0,68 ^a	0,82	0,78
	30	0,65	0,61 ^a	0,68	0,65
	45	0,60	0,58	0,56	0,56
	60	0,49	0,46 ^a	0,45	0,55

¹ Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Tabla 78. Péptidos¹ hidrófobos, hidrófilos y relación hidrófobos:hidrófilos en la fracción soluble en agua de queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase, determinados por HPLC en fase reversa a 280 nm.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Hidrófobos	1	0,76	0,41 ^a	1,85	2,01 ^a
	15	1,22	1,03 ^a	1,81	2,68 ^a
	30	1,17	1,40 ^a	2,37	2,91 ^a
	45	2,23	1,70 ^a	3,04	3,05
	60	0,78	1,00 ^a	1,80	2,73 ^a
Hidrófilos	1	2,80	2,36 ^a	3,19	3,35
	15	4,98	2,89 ^a	6,05	7,39 ^a
	30	6,48	4,52 ^a	9,41	10,63 ^a
	45	9,66	7,32 ^a	14,16	15,78 ^a
	60	6,48	4,68 ^a	10,67	12,19 ^a
Relación	1	0,26	0,17 ^a	0,58	0,60 ^a
	15	0,23	0,37 ^a	0,32	0,37 ^a
	30	0,18	0,31 ^a	0,26	0,27 ^a
	45	0,22	0,24 ^a	0,21	0,19 ^a
	60	0,12	0,21 ^a	0,18	0,23 ^a

¹Media de determinaciones realizadas por duplicado en dos fabricaciones, expresadas como unidades de área del cromatograma por mg de extracto seco de queso.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

Tabla 79. Características reológicas¹ del queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Fracturabilidad, N	30	20,60	10,85 ^a	18,74	12,67
	60	28,53	14,83 ^a	15,85	17,39
Firmeza, J	30	0,223	0,127 ^a	0,204	0,150
	60	0,326	0,146 ^a	0,185	0,196
Elasticidad, N/mm ²	30	0,503	0,296 ^a	0,525	0,329
	60	0,841	0,319 ^a	0,439	0,549

¹ Media de determinaciones realizadas por sextuplicado en dos fabricaciones.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

presentaron las mismas características reológicas que los quesos elaborados sin el adjunto termófilo.

3.4.1.2.3.5. Características sensoriales

La calidad del sabor de los quesos con el adjunto termófilo mejoró significativamente ($P < 0,05$), mientras que no se detectaron diferencias en la intensidad del sabor ni en el amargor de los quesos (Tabla 80). Con Neutrased los quesos recibieron una puntuación menor ($P < 0,01$) de calidad e incrementaron su intensidad ($P < 0,001$) y su amargor ($P < 0,001$). Los quesos con Neutrased y adjunto termófilo presentaron una calidad superior ($P < 0,01$), una intensidad similar y un menor amargor ($P < 0,01$) que los quesos fabricados sin el cultivo termófilo.

Tabla 80. Características sensoriales¹ del queso de leche pasteurizada elaborado con estreptococos termófilos (TA 558) y Neutrase.

	Días	0 UA Neutrase/l		0,01 UA Neutrase/l	
		0% TA 558	1% TA 558	0% TA 558	1% TA 558
Calidad	30	5,88	6,25	5,22	5,87 ^a
	60	6,63	6,78	5,99	6,54
Intensidad	30	5,40	5,57	5,64	6,03
	60	6,69	6,57	7,21	7,03
Amargor	30	0,10	0,26	0,76	0,43 ^a
	60	0,01	0,02	0,55	0,21 ^a

¹ Media de las puntuaciones otorgadas por un panel de 12 catadores en catas duplicadas de dos fabricaciones, utilizando una escala de 10 puntos.

^a Significativamente ($P < 0,05$) diferente del valor respectivo en queso sin estreptococos termófilos.

3.4.2. Discusión

Los quesos de leche cruda muestran un sabor más intenso y característico que los quesos de leche pasteurizada, de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos en los que se compara la calidad organoléptica de ambos tipos de quesos (Gaya *et al.*, 1990; Lau *et al.*, 1991).

En quesos de leche cruda y de leche pasteurizada elaborados con y sin Neutrase, Gómez *et al.* (1996) comprobaron que el sabor amargo del queso fue más pronunciado en los quesos de leche pasteurizada y en los quesos con Neutrase añadida para acelerar la maduración. Estos autores también detectaron un efecto adverso de la pasteurización y de la adición de Neutrase sobre la calidad del sabor del queso. La intensidad del sabor también disminuyó con la pasteurización, aunque se incrementó con la adición de Neutrase.

Según Lau *et al.* (1991), la diferencia en la proporción de péptidos hidrófobos e hidrófilos de la fracción soluble en agua de queso Cheddar de leche cruda y de leche pasteurizada, determinados por HPLC, puede dar lugar a diferencias en el sabor.

Gómez *et al.* (1996) comprobaron en queso de leche pasteurizada una correlación significativa ($r^2=0,791$) entre el nivel de péptidos hidrófobos determinados a 280 nm y las puntuaciones de amargor otorgadas al queso por un panel de 12 catadores. Sin embargo, los niveles de péptidos hidrófobos y la puntuación de amargor de los quesos de leche cruda no mostraron correlación. Este hecho podría atribuirse a la presencia de una mayor cantidad de componentes del sabor en el queso de leche cruda, que elevaría el nivel umbral de detección de amargor enmascarando la posible presencia de este defecto.

Harwalkar y Elliot (1971) comprobaron que la extracción con cloroformo-metanol de un liofilizado de queso Cheddar amargo eliminaba el amargor, y que la separación del extracto en tres fases proporcionaba una fracción acuosa muy amarga. Por otra parte, Horwood y Hull (resultados no publicados) separaron la fracción soluble en agua de queso Cheddar en una fracción amarga y otra no amarga con un sabor intenso a

queso. Al mezclar ambas fracciones desaparecía el amargor intensificándose el sabor a queso.

Los cultivos que dieron lugar a los niveles más bajos de péptidos hidrófobos en quesos modelo se emplearon en fabricaciones de queso de leche cruda y de leche pasteurizada de vaca con el fin de evaluar su posible actividad desamargante durante la maduración.

En nuestro trabajo, los quesos de leche cruda recibieron una puntuación de amargor significativamente más baja que los quesos de leche pasteurizada en las fabricaciones realizadas con los adjuntos de lactobacilos y leuconostocs. Excepcionalmente, en las fabricaciones con estreptococos termófilos como adjunto, los catadores encontraron un mayor amargor en los quesos de leche cruda. En estas elaboraciones, posiblemente debido a la diferente tecnología empleada para permitir el crecimiento del cultivo termófilo durante las primeras horas de la fabricación, el desarrollo de sabor amargo fue menor, como indican las puntuaciones de los catadores. En las fabricaciones con adjunto termófilo, la puntuación media de amargor fue de 0,49 para los quesos de leche cruda y de 0,29 para los quesos de leche pasteurizada, inferiores a los valores respectivos de 0,68 y 0,92 obtenidos en las fabricaciones con lactobacilos y de 0,34 y 1,14 obtenidos en las fabricaciones con leuconostocs.

Los trabajos publicados con bacterias lácticas o extractos de cultivos de bacterias lácticas añadidos como adjuntos se han realizado en quesos de leche pasteurizada. Por ello, no podemos comparar nuestros datos en leche cruda con los resultados de otros autores.

3.4.2.1. Quesos de leche cruda

3.4.2.1.1. *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda

Debido a la actividad acidificante de *L. plantarum* ESI 144, los quesos sin Neutrase y con el adjunto presentaron un pH más bajo durante toda la maduración. La degradación de las caseínas no resultó afectada por la adición de lactobacilos y se

detectaron niveles más bajos de las tres fracciones nitrogenadas estudiadas. No se observaron diferencias en los niveles de péptidos hidrófobos a 214 nm, aunque a 280 nm el contenido en estos péptidos fue menor en los quesos con lactobacilos. La textura de los quesos con el adjunto fue más firme. La adición de lactobacilos empeoró la calidad del sabor del queso, la intensidad del sabor fue menor y no se detectaron diferencias en el amargor.

En los quesos con Neutrased, la adición de lactobacilos retrasó la hidrólisis de la caseína α_{s1} durante toda la maduración y de la caseína β durante el primer mes. También disminuyó el contenido en N soluble a pH 4,6, en TCA y en PTA. Los niveles de péptidos hidrófobos fueron inferiores en el queso con el adjunto, aunque a los 60 d la diferencia fue pequeña a 214 nm y no se detectó a 280 nm. Como consecuencia de su mayor extracto seco y de una proteólisis menos acusada, los quesos con Neutrased y lactobacilos resultaron de textura más firme. La adición de lactobacilos a los quesos con Neutrased no mejoró la calidad ni afectó a la intensidad del sabor. Aunque a los 30 d estos quesos fueron menos amargos, a los 60 d no se observaron diferencias en el amargor.

3.4.2.1.2. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche cruda

El empleo de leuconostocs como adjunto en los quesos de leche cruda no influyó sobre el pH del queso en ausencia o presencia de Neutrased. En quesos sin Neutrased la hidrólisis de caseínas no resultó afectada por la adición de leuconostocs, aunque se obtuvieron niveles más altos de N soluble en TCA. El nivel de péptidos hidrófobos se incrementó en los quesos sin Neutrased con leuconostocs. Debido a su menor extracto seco se observó una textura menos firme de estos quesos a los 60 d. La adición de leuconostocs no alteró la calidad ni la intensidad del sabor del queso, ni afectó al amargor.

Cuando se añadió Neutrased, los quesos con leuconostocs presentaron un menor extracto seco. Se observó una formación de N soluble a pH 4,6 y en TCA mayor en los quesos con el adjunto y una disminución de los niveles de péptidos hidrófobos determinados a las dos longitudes de onda. Los quesos con Neutrased y leuconostocs

también resultaron de textura menos firme. El empleo del adjunto en quesos con Neutrase afectó a la calidad del sabor, que fue inferior en queso de 30 d, sin influir en la intensidad ni en el amargor. Pese a la degradación de péptidos hidrófobos observada en los quesos con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598, al ser el sabor amargo un defecto poco constatable en los quesos de leche cruda, su intervención como desamargante no afecta a la mejora de la calidad general del queso.

3.4.2.1.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjuntos al fermento en quesos de leche cruda

En los quesos de leche cruda elaborados con el adjunto termófilo se aceleró la hidrólisis de las caseínas α_{s1} y β . También el contenido en N soluble a pH 4,6 y en TCA fue superior a partir de los 30 d. Los niveles de péptidos hidrófobos fueron más altos en los quesos con estreptococos termófilos. Debido a su menor extracto seco y a una proteólisis aparentemente más acentuada a partir del primer mes de maduración se apreció un reblandecimiento en estos quesos. La adición del adjunto termófilo no afectó a las características organolépticas a los 30 y 60 d de maduración.

Cuando se elaboró el queso de leche cruda con Neutrase no se apreció incremento en la hidrólisis de caseínas atribuible al adjunto termófilo, aunque los niveles de N soluble en TCA fueron más elevados. El contenido en péptidos hidrófobos fue menor en los quesos con estreptococos termófilos hasta los 45 d de maduración. La textura de estos quesos resultó menos consistente. La adición del adjunto termófilo no produjo ningún efecto sobre la calidad ni la intensidad del sabor. Tampoco se detectaron diferencias en el amargor de los quesos con Neutrase debidas a la presencia de estreptococos termófilos en el queso.

3.4.2.2. Quesos de leche pasterizada

3.4.2.2.1. *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento en quesos de leche pasterizada

La adición de *L. plantarum* ESI 144 a la leche dio como resultado quesos con un pH más bajo que los elaborados sin el adjunto, indicando la metabolización de la lactosa por estos microorganismos y la producción de ácido láctico. Los niveles de lactobacilos en quesos con el adjunto se mantuvieron durante la maduración 1-2 unidades logarítmicas por encima de los niveles en queso sin adjunto.

L. casei subsp. *casei* CVA1 y MIL2B no afectaron al desarrollo de la acidificación en queso Cheddar (Broome *et al.*, 1990). Sin embargo, la adición de *L. casei* subsp. *casei* L2A produjo un efecto similar al de nuestra cepa de *L. plantarum*, con valores más bajos de pH en el queso de 30 d (Trépanier *et al.*, 1991). También en queso con Neutrased, *L. casei* subsp. *casei* L2A añadido como cultivo vivo o termizado hizo descender el pH del queso durante la maduración (Trepanier *et al.*, 1992).

El retraso en la degradación de las caseínas observado en los quesos con *L. plantarum*, sobre todo durante las primeras 24 h, puede atribuirse al efecto del pH sobre la actividad de la plasmina y de la Neutrased en los quesos elaborados con esta proteinasa. Según Picón *et al.* (1995), valores de pH de 5,0-5,1 son desfavorables para la actividad de la Neutrased en queso Manchego, ya que el pH óptimo de esta enzima está próximo a la neutralidad. En quesos con *L. helveticus* CNRZ 303 termizado (Ardö y Pettersson, 1988) o con lactobacilos mesófilos como adjuntos (McSweeney *et al.*, 1994) no se detectó este retraso. Sin embargo, *L. plantarum* 99 inhibió la actividad del cuajo en queso Cheddar elaborado con este microorganismo (Lemieux *et al.*, 1989). Bouton *et al.* (1994) tampoco encontraron diferencias en la degradación de caseínas del queso Comté fabricado con distintas cepas de *L. helveticus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

De acuerdo con la menor hidrólisis de caseínas, la formación de N soluble a pH 4,6, N soluble en TCA y N soluble en PTA disminuyó en los quesos con lactobacilos, aunque los valores más bajos se detectaron a partir de los días 30, 45 y 15,

respectivamente. La adición de Neutrase aceleró la formación de las tres fracciones nitrogenadas, y la adición de lactobacilos retrasó la formación de N soluble a pH 4,6 desde los 30 días y de N soluble en PTA, debido posiblemente a la influencia adversa del pH bajo en la actividad peptidolítica presente en el queso y también a la metabolización de péptidos pequeños y aminoácidos por los lactobacilos. Sin embargo, los niveles de N soluble en TCA más altos de los quesos con lactobacilos pueden atribuirse a una cierta actividad proteolítica de estos microorganismos.

En general, los resultados de otros autores empleando lactobacilos añadidos a la leche indican un incremento de los niveles de aminoácidos en queso maduro, como en el caso de la adición de *L. plantarum* 99 (Puchades *et al.*, 1989), *L. helveticus* CNRZ 303 (Ardö y Pettersson, 1988; Ardö *et al.*, 1989) o *L. casei* subsp. *casei* L2A (Lemieux *et al.*, 1989; Puchades *et al.*, 1989). También McSweeney *et al.* (1994) detectaron una mayor concentración de aminoácidos en Cheddar con lactobacilos mesófilos como adjuntos al fermento. Por el contrario, Ardö *et al.* (1989) comprobaron que células vivas de *L. helveticus* en quesos bajos en grasa no afectaban al N soluble a pH 4,6 ni al N soluble en PTA durante las 13 semanas de maduración del queso.

En nuestros quesos con *L. plantarum* ESI 144 como adjunto, los valores de pH pudieran ser responsables de una menor hidrólisis de los péptidos presentes, ya que se ha observado la disminución de la actividad aminopeptidásica en condiciones ácidas (Frey *et al.*, 1986b; Cholette y McKellar, 1990). Además, los niveles de células viables que se añaden a la leche podrían incorporar péptidos pequeños y aminoácidos durante su crecimiento (Frey *et al.*, 1986b), con el descenso consiguiente en la concentración de N soluble en PTA que se detecta.

Los quesos con lactobacilos presentaron unos valores de fracturabilidad, firmeza y elasticidad más elevados que los quesos sin el adjunto, probablemente por el retraso observado en la hidrólisis de las caseínas en estos quesos. Según Creamer y Olson (1982) la caseína α_{s1} residual juega un papel fundamental en la estabilidad de la matriz proteica del queso. Al presentar una menor degradación de caseínas los quesos con lactobacilos, su textura resultó más firme. La adición de Neutrase produjo un reblandecimiento del queso. En los quesos con Neutrase, la inoculación con lactobacilos

alteró en menor grado la textura de los quesos, que a los 60 d no se diferenciaban en sus propiedades reológicas.

Como se ha indicado en el apartado 3.3.2. de la presente tesis, el nivel de péptidos hidrófobos en el queso se considera relacionado con el defecto del sabor amargo. En los quesos sin Neutrased, la cantidad de péptidos hidrófobos descendió con la adición de lactobacilos. A los 60 d de maduración el nivel de péptidos hidrófobos determinados a 214 y 280 nm, disminuyó un 9,4% y un 7,8%, respectivamente, en los quesos con el adjunto. Sin embargo, en queso sin Neutrased, el empleo de *L. plantarum* afectó negativamente a la calidad del sabor, mientras que no influyó en la intensidad del sabor ni el amargor.

En los quesos con Neutrased, en los que se incrementó significativamente la formación de péptidos hidrófobos, también se observó una reducción de sus niveles en los quesos con el adjunto. A los 60 d se comprobó que el nivel de péptidos hidrófobos determinados a 214 y 280 nm, disminuyó un 20,6% y un 20,7% debido a la inoculación de la leche con el adjunto de lactobacilos. Los quesos con Neutrased resultaron más amargos y con un sabor más intenso que los quesos sin Neutrased. *L. plantarum* redujo significativamente el amargor de los quesos con Neutrased. Este hecho lo atribuimos al nivel más bajo de péptidos hidrófobos en la fracción soluble en agua del queso con Neutrased y lactobacilos.

Bartels *et al.* (1987a) comprobaron por separación mediante cromatografía de permeación en gel, que la reducción del amargor del queso estaba relacionada con una concentración menor de péptidos amargos. Cliffe y Law (1990) asociaron la eliminación del sabor amargo de papillas de cuajada de Cheddar con el descenso de los péptidos hidrófobos determinados por HPLC en fase reversa. Sin embargo, Prost y Chamba (1994) detectaron que la reducción del amargor en queso Emmental atribuida a la actividad aminopeptidásica de *L. helveticus* L1 no estaba relacionada con la degradación de las caseínas o con diferencias en la cantidad de péptidos pequeños y aminoácidos.

En nuestro trabajo, la lisis de los lactobacilos pudo ser un factor limitante de la velocidad de peptidólisis observada en las condiciones de elaboración y maduración del

queso. Quizá un período de maduración de 60 d sea demasiado corto para que tenga lugar la lisis de estos microorganismos. Ardö *et al.* (1989) comprobaron que el tratamiento térmico estimulaba la liberación de enzimas por los lactobacilos, asegurando una aminopeptidolisis deseable al principio de la maduración. Se ha asociado el aumento de la lisis de las bacterias lácticas con una concentración superior de aminoácidos en queso Cheddar (Crow *et al.*, 1995), siendo la liberación de peptidasas un hecho esencial para la hidrólisis de los péptidos.

De acuerdo con nuestros resultados, la acción combinada de Neutrased y de lactobacilos seleccionados puede acelerar la maduración, disminuyendo el defecto del amargor en el queso. Se podría reducir la capacidad acidificante de *L. plantarum* ESI 144 mediante la atenuación del cultivo, manteniendo su efecto favorable sobre atributos del sabor como la calidad y la intensidad.

3.4.2.2.2. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 como adjunto al fermento en quesos de leche pasteurizada

Según nuestra revisión bibliográfica, únicamente se ha publicado un trabajo (El-Shafei, 1994) en el que se utilizan como adjunto células de *Leuconostoc* atenuadas por calentamiento o congelación, o un extracto de éstas, en queso Ras. Por otra parte, las peptidasas de *Leuconostoc* han sido escasamente estudiadas a pesar de que estos microorganismos se utilizan como integrantes del fermento en muchas variedades de queso.

El empleo de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 528 como adjunto en la fabricación de quesos de leche pasteurizada de vaca no afectó al pH del queso durante la elaboración y maduración. En los quesos con leuconostocs añadidos se alcanzaron valores de aproximadamente 8 log ufc/g a los 60 d, siendo estos niveles de aproximadamente 6 log ufc/g en los quesos sin el adjunto. El extracto seco fue menor en los quesos con leuconostocs, tanto sin Neutrased como con esta proteinasa. Según El-Shafei (1994), la adición de cultivos atenuados de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y de *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* o de extractos de estos cultivos no alteró el pH ni el extracto seco del queso al compararlo con un control sin inocular.

L. mesenteroides subsp. *mesenteroides* ESI 528 produjo una aceleración de la maduración cuando se utilizó como adjunto en los quesos sin Neutrased, incrementando la degradación de las caseínas α_{s1} y β . Sin embargo, en los quesos con Neutrased se retrasó la hidrólisis de ambas fracciones en presencia del adjunto.

La degradación de caseínas más intensa en los quesos con leuconostocs proporcionó niveles más elevados de N soluble a pH 4,6 y N soluble en TCA. La concentración más baja de N soluble en PTA de estos quesos podría atribuirse a la metabolización de péptidos pequeños y aminoácidos por los leuconostocs añadidos a la leche. Las diferencias en los quesos con Neutrased y leuconostocs relativas al menor nivel de N soluble a pH 4,6 y N soluble en TCA se detectaron únicamente en el segundo mes de maduración. En los quesos con Neutrased, los leuconostocs no afectaron a la concentración de N soluble en PTA. En queso Ras, El-Shafei (1994) comprobó que únicamente la adición del cultivo atenuado por congelación incrementaba ligeramente los niveles de N soluble a pH 4,6, que en general se mantuvieron más altos en el queso control.

La mayor hidrólisis de caseínas observada en los quesos con leuconostocs unido a su menor extracto seco dio lugar a quesos con valores más bajos de los tres parámetros reológicos determinados. También se considera en este sentido que, debido a la producción de gas por los leuconostocs, los quesos con el adjunto presentaron una textura menos firme que los quesos control, aunque también los leuconostocs forman parte del fermento comercial empleado. Los quesos con Neutrased resultaron más blandos que los quesos sin Neutrased. Sin embargo, la adición del adjunto no alteró las propiedades físicas del queso, cuyos valores de extracto seco y caseínas residuales a los 60 d no diferían de las presentadas por el queso sin *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 528.

En los quesos sin Neutrased, los niveles de péptidos hidrófobos e hidrófilos medidos a 214 y 280 nm, fueron superiores cuando se añadió el cultivo adjunto de leuconostocs. La adición de estos microorganismos afectó negativamente a la calidad e intensidad del sabor. Los quesos con adjunto resultaron más amargos que los quesos control, aunque las puntuaciones de amargor de los quesos sin Neutrased son muy inferiores a las recibidas por los quesos con Neutrased.

control, aunque las puntuaciones de amargor de los quesos sin Neutrased son muy inferiores a las recibidas por los quesos con Neutrased.

En queso Ras, El-Shafei (1994) comprobó un incremento de la calidad a los 3 meses en los quesos con el cultivo de *Leuconostoc* atenuado por calor y detectó amargor únicamente en el queso control, atribuyendo estas observaciones a un sistema proteolítico capaz de hidrolizar péptidos amargos en los *Leuconostoc* utilizados como adjunto.

En los quesos con Neutrased, la inoculación con *Leuconostoc* disminuyó el contenido en péptidos hidrófobos del queso. La calidad del sabor no resultó afectada por el empleo del adjunto, aunque la intensidad del sabor fue menor. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 disminuyó significativamente el amargor de los quesos con Neutrased.

3.4.2.2.3. Estreptococos termófilos (TA 558) como adjuntos al fermento en quesos de leche pasteurizada

Los quesos de leche pasteurizada de vaca elaborados con un cultivo de estreptococos termófilos como adjunto al fermento comercial presentaron un pH más alto que el de los quesos control. Esta diferencia de pH se atribuye a la mayor acidificación durante las primeras horas de elaboración del queso en presencia del cultivo termófilo, que favorece el desuerado de la cuajada. Los valores de extracto seco del queso con Neutrased y adjunto de estreptococos termófilos resultaron superiores durante toda la maduración, confirmando el desuerado más intenso de la cuajada. Sin embargo, en los quesos sin Neutrased y con estreptococos termófilos el extracto seco fue menor, excepto a las 24 h, momento en el que no se apreciaron diferencias.

Bartels *et al.* (1987a) añadieron un 1% de un cultivo de *S. thermophilus* 110 tratado a 70°C durante 18 s como adjunto en la fabricación de queso Gouda, sin observar diferencias en el pH del queso durante el periodo de elaboración. Tampoco Vafopoulou *et al.* (1989) encontraron variaciones del pH en queso Feta con un 2% de *S. thermophilus* atenuado por calor.

En los quesos sin Neutrased y con el adjunto termófilo se aceleró la hidrólisis de α_{s1} -caseína, principalmente a partir de los 30 d. Cuando se añadió Neutrased se incrementó la hidrólisis de las caseínas α_{s1} y β en los quesos con el cultivo adjunto. Coincidiendo con estos resultados, en los quesos sin Neutrased y con el adjunto termófilo se detectó más N soluble a pH 4,6 a partir de los 45 d, aunque el N soluble en TCA permaneció con niveles más bajos durante la maduración. Con Neutrased y estreptococos termófilos, y de acuerdo con la proteólisis más acentuada, también aumentó la producción de N soluble a pH 4,6, N soluble en TCA y en PTA debidas a la actividad proteolítica fuerte del adjunto añadido. Estos resultados coinciden con el mayor nivel de estreptococos termófilos detectado a partir de los 30 d de maduración en los quesos con Neutrased.

La adición de un cultivo atenuado de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* aceleró la maduración del queso Feta durante las fases iniciales (Vafopoulou *et al.*, 1989). Sin embargo, *S. thermophilus* 110 no produjo ningún incremento en la concentración de N soluble en TCA del queso Gouda durante 6 meses de maduración, ni tampoco aumentó los niveles de N soluble en PTA (Bartels *et al.*, 1987a).

Debido a su menor extracto seco, los quesos elaborados con el adjunto termófilo resultaron menos firmes que los quesos sin estreptococos termófilos. Posiblemente, los niveles más bajos de α_{s1} -caseína residual observados a los 45 y 60 d de maduración contribuyeron también a esta característica. En los quesos con Neutrased no se apreciaron diferencias en las propiedades físicas debidas a la adición del adjunto termófilo. Aunque el extracto seco fue mayor a los 30 d, posiblemente los índices de proteólisis más altos que presentaron los quesos con estreptococos termófilos favorecieron su reblandecimiento.

Los niveles de péptidos hidrófobos detectados a las dos longitudes de onda disminuyeron en los quesos sin Neutrased con la adición del cultivo termófilo. La adición del adjunto en estos quesos no afectó a la calidad ni a la intensidad del sabor del queso, y tampoco se detectaron diferencias en el amargor, que obtuvo puntuaciones muy bajas en todos los casos.

como menos amargos que los elaborados con Neutrased y sin adjunto termófilo, pese a su contenido superior en péptidos hidrófobos.

La cantidad de péptidos hidrófobos en los quesos con Neutrased sin y con estreptococos termófilos y la puntuación de amargor que recibieron fueron inferiores a las observadas en las fabricaciones efectuadas con el resto de adjuntos estudiados. Posiblemente la tecnología utilizada en la elaboración de estos quesos dé lugar a un sabor amargo menos acusado o eleve el nivel umbral de detección de este defecto por los catadores. Además, el elevado contenido en N soluble en PTA indicativo de una mayor concentración de péptidos pequeños y aminoácidos en los quesos con Neutrased y adjunto termófilo podría enmascarar la aparición del defecto de amargor debido a la presencia de componentes indeseables del sabor.

Bouton *et al.* (1993) comprobaron la existencia de una correlación negativa en queso Comté entre el amargor y la relación N soluble en PTA / N soluble en agua, observando que el amargor evoluciona en el mismo sentido que el N soluble en agua y opuesto al N soluble en PTA.

El empleo de Neutrased o de la combinación de esta proteinasa con extractos intracelulares de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para acelerar la maduración del queso Ras incrementó la intensidad del sabor, aunque las diferencias en el nivel de N soluble fueron muy pequeñas. Sin embargo, en los quesos con el extracto de lactobacilos se observó la aparición de amargor a los 60 d de maduración del queso (Ezzat, 1990).

4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes conclusiones:

1. La actividad acidificante de 733 nuevos aislamientos de bacterias lácticas procedentes de quesos de leche cruda resultó en general baja. Los aislamientos de lactococos y enterococos presentaron la mayor actividad acidificante en leche. La actividad acidificante de los aislamientos de lactobacilos y leuconostocs fue escasa.
2. La actividad proteolítica en leche de 673 aislamientos fue superior en los aislamientos de lactococos, seguidos de los aislamientos de enterococos. Los aislamientos de lactobacilos y leuconostocs presentaron una actividad proteolítica muy baja.
3. Se comprobó la existencia de una correlación significativa entre la producción de ácido por los aislamientos de lactococos y enterococos y su actividad proteolítica en leche.
4. Las proteinasas de lactococos y enterococos hidrolizaron preferentemente la β -caseína. La α_{s1} -caseína fue degradada por una proporción muy baja de aislamientos.
5. Las actividades peptidásicas de los aislamientos de bacterias lácticas fueron en general reducidas. La actividad aminopeptidásica más elevada se registró con Lys-pNA y Leu-pNA como sustratos. La actividad dipeptidil aminopeptidásica fue mayor entre los lactococos que entre los lactobacilos y leuconostocs. La actividad endopeptidásica fue baja frente a todos los sustratos ensayados. La actividad tripeptidásica fue superior a la dipeptidásica y la carboxipeptidásica resultó muy baja o nula.

6. El empleo de un nuevo fermento compuesto por una mezcla de cuatro aislamientos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dio lugar a quesos con unas características generales comparables a las obtenidas con un fermento comercial, una buena calidad organoléptica y un menor nivel de amargor.
7. La adición a la leche de *Lactobacillus plantarum* ESI 144 y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598, seleccionados por su mayor actividad peptidásica, y el fermento termófilo comercial TA 558 disminuyó el contenido en péptidos hidrófobos de quesos modelo con Neutrase.
8. El desarrollo de amargor en queso semiduro de leche pasteurizada de vaca fue más acusado que en el queso elaborado a partir de leche cruda, y en el queso elaborado con adición de Neutrase más acusado que en el queso elaborado sin adición de Neutrase.
9. En queso semiduro de leche cruda de vaca con adición de Neutrase, el empleo como adjuntos al fermento comercial de *L. plantarum* ESI 144, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 o el fermento termófilo comercial TA 558 dio lugar a un descenso de los niveles de péptidos hidrófobos, aunque no se detectó ningún efecto sobre el nivel de amargor del queso.
10. La adición de *L. plantarum* ESI 144 como adjunto al fermento en la elaboración de queso semiduro de leche pasteurizada de vaca con adición de Neutrase disminuyó el contenido de péptidos hidrófobos y el nivel de amargor del queso.
11. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ESI 598 utilizado como adjunto al fermento en la elaboración de queso semiduro de leche pasteurizada de vaca con adición de Neutrase disminuyó el contenido de péptidos hidrófobos y el nivel de amargor del queso.

12. El fermento termófilo TA 558 empleado como adjunto en la elaboración de queso semiduro de leche pasteurizada de vaca con adición de Neutrased incrementó el nivel de péptidos hidrófobos, aunque disminuyó el sabor amargo del queso. El desarrollo de amargor en los quesos fue inferior al aplicar temperaturas más altas en las primeras horas de fabricación para favorecer el desarrollo de los *estreptococos termófilos*. La mayor formación de N soluble en PTA de los quesos elaborados con adición de Neutrased y el adjunto termófilo podría originar un cierto enmascaramiento del amargor asociado a niveles elevados de péptidos hidrófobos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abo-Einaga I.G. y Plapp R. (1987). Peptidases of *Lactobacillus casei* and *L. plantarum*. *Journal of Basic Microbiology* **27**, 123-130.

Abu-Tarbush H.M., Marshall R.T. y Heymann H. (1989). Peptides produced by selected lactose-positive and lactose-negative lactococci in a model cheese ripened system. *Journal of Dairy Science* **72**, 3143-3148.

Adler-Nissen J. (1976). Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**, 1090-1093.

Adler-Nissen J. (1986a). Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. En "Protein tailoring for food and medical uses". Ed Feeney R.E. y Whitaker J.R., Marcel Dekker Inc., Nueva York.

Adler-Nissen J. (1986b). A review of food protein hydrolysis - specific areas. En "Enzymic hydrolysis of Food proteins". Elsevier Appl. Sci. Publ., Nueva York.

Andresen A., Geis A., Krusch U. y Teuber M. (1984). Plasmidmuster milchwirtschaftlich genutzter starterkulturen. *Milchwissenschaft* **39**, 140-143.

Andrews A.T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research* **50**, 45-55.

Arai S., Noguchi M., Kurosawa S., Kato H. y Fujimaki M. (1970a). Applying proteolytic enzymes on soybean. 6. Deodorization effect of aspergillopeptidase A and debittering effect of *Aspergillus* acid carboxypeptidase. *Journal of Food Science* **35**, 392-395.

Arai S., Yamashita M., Kato H. y Fujimaki M. (1970b). Applying proteolytic enzymes on soybean. Part V. A nondialyzable bitter peptide in peptic hydrolyzate of soybean protein and its bitterness in relation to the chemical structure. *Agricultural and Biological Chemistry* **34**, 729-738.

Ardö Y., Larsson P.O., Lindmark M. H. y Hedenberg A. (1989). Studies of peptidolysis during early maturation and its influence on low-fat cheese quality. *Milchwissenschaft* **44**, 485-490.

Ardö Y. y Pettersson H.E. (1988). Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *Journal of Dairy Research* **55**, 239-245.

Argylle P.J., Mathison G.E. y Chandran R.C. (1979). Production of cell-bound proteinase by *Lactobacillus bulgaricus* and its location in the bacterial cell. *Journal of Applied Bacteriology* **41**, 175-186.

Arora A.G. y Lee B.H. (1990). Comparative studies on peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. *Journal of Dairy Science* **73**, 274-279

Association of Official Analytical Chemists (1990). Moisture in cheese. Method I. Final action. Official methods of analysis, 15ª edición, Ed. K. Helrich. Association of Official Chemists, Inc., Arlington, Virginia, pp 841.

Aston J.W. y Creamer L.K. (1986). Contribution of the components of water-soluble fraction to the flavour of Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **21**, 229-248.

Atlan N.D., Laloï P. y Portalier R. (1990). X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2174-2179.

Baankreis R. (1992). The role of lactococcal peptidases in cheese ripening. Tesis Doctoral, Universidad de Amsterdam, Holanda.

Baankreis R. y Exterkate F.A. (1991). Characterization of a peptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP that hydrolyses di- and tri-peptides containing proline or hydrophobic residues as the aminoterminal amino acid. *Systematic and Applied Microbiology* **14**, 317-323.

Barbosa M., Valles E., Vassal L. y Mocquot G. (1976). L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte molle et a pâte cuite. *Lait* **56**, 1-17.

Bartels H.J., Johnson M.E. y Olson N.F. (1987a). Accelerated ripening of Gouda cheese. I. Effect of heat-shocked thermophilic lactobacilli and streptococci on proteolysis and flavour development. *Milchwissenschaft* **42**, 83-88.

Bartels H.J., Johnson M.E. y Olson N.F. (1987b). Accelerated ripening of Gouda cheese. II. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavor development. *Milchwissenschaft* **42**, 139-144.

Bassette R., Fung D.Y.C. y Mantha V.R. (1986). Off-flavors in milk. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition* **24**, 1-52.

Belitz H.D., Chen W., Jugel H., Stempfl H., Treleano R. y Wieser H. (1983). Quantitative structure activity relationship (QSAR) in taste and olfaction of bitter tasting compounds. *Citado por Lemieux L. y Simard R.E. (1992).*

Belitz H.D., Chen W., Jugel H., Treleano R., Wieser H., Gasteiger J. y Marsili M. (1979). Sweet and bitter compounds: structure and taste relationship. En "Food taste chemistry". Ed. Boudreau J.C., Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 115, Washington.

Belitz H.D. y Wieser H. (1985). Bitter compounds occurrence and structure-activity relationships. *Food Reviews International* **1**, 271-354.

Biede S.L. y Hammond E.G. (1979). Swiss cheese flavor. II. Organoleptic analysis. *Journal of Dairy Science* **62**, 238-248.

Bockelmann W., Fobker M. y Teuber M. (1991). Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal* **1**, 51-66.

- Bockelmann W., Monnet V., Geis A., Teuber M. y Gripon J.C. (1989). Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC1 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. I. Purification and action of the enzymes on caseins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 278-282.
- Booth M., Fhaolain I.N., Jennings P.V. y O'Cuinn G. (1990a). Purification and characterization of a post-proline dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus cremoris* AM2. *Journal of Dairy Research* **57**, 89-99.
- Booth M., Jennings P.V., Fhaolain I.N. y O'Cuinn G. (1990b). Prolidase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2: partial purification and characterization. *Journal of Dairy Research* **57**, 245-254
- Bouton Y., Guyot P., Dasen A. y Grapin R. (1993). Activité protéolytique de souches de lactobacilles termophiles isolées de levains et de Comté. I. Validation sur minifromages de techniques de laboratoire. *Lait* **73**, 265-279.
- Bouton Y., Guyot P., Dasen A. y Grapin R. (1994). Activité protéolytique de souches de lactobacilles termophiles isolées de levains et de Comté. II. Applications en sites industriels. *Lait* **74**, 33-46.
- Bracquart P. y Lorient D. (1979). Effect des amides aminés et peptides sur le croissance de *Streptococcus thermophilus*. 3. Peptides comportant Glu, His et Met. *Milchwissenschaft* **34**, 676-679.
- Broome M.C., Krause D.A. y Hickey M.W. (1990). The use of non-starter lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology* **45**, 67-73
- Casey M.G. y Meyer J. (1985). Presence of X-prolyl-dipeptidyl-peptidase in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **68**, 3212-3215.
- Castberg H.B. y Morris H.A. (1976). Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese making. A review. *Milchwissenschaft* **31**, 85-90.
- Centeno J.A., Cepeda A. y Rodríguez Otero J.L. (1996). Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cow's milk cheese. *International Dairy Journal* **6**, 65-78.
- Champion H.M. y Stanley D.W. (1982). HPLC separation of bitter peptides from Cheddar cheese. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **15**, 283-288.
- Chapman H.R., Sharpe M.E. y Law B.A. (1976). Some effects on low temperature storage of milk on cheese production and Cheddar cheese flavour. *Dairy Industries International* **41**, 42-45.
- Chapot-Chartier M.P., Nardi M., Chopin M.C., Chopin A. y Gripon J.C. (1993). Cloning and sequencing of Pep C, a cysteine aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 330-333.
- Chen A.H., Larkin J.W., Clarck C.J. e Irwin W.E. (1979). Textural analysis of cheese. *Journal of Dairy Science* **62**, 901-907.

- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.-C., Lamberet G., Lenoir J. y Tourneur C. (1984). Les phénomènes microbiologique et enzymatiques et la biochimie de l'affinage. En "Le fromage". Ed. Eck A., Technique et Documentation, Diffusion Lavoisier, Paris.
- Choisy C., Lenoir J., Tourneur C., Guéguen M., Juras M. y Rivault D. (1978). Essai de caractérisation des streptocoques lactiques au regard de l'amertume des fromages. En "XX International Dairy Congress" (brief communications) E, 498-499.
- Cholette H. y McKellar R.C. (1990). Influence of pH on the properties of *Lactobacillus helveticus* aminopeptidase. *Journal of Dairy Science* **73**, 2278-2286.
- Christensen T.M.I.E., Kristiansen K. R. y Madsen J.S. (1989). Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research* **56**, 823-828.
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. y Catignani G.L. (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* **66**, 1219-1227.
- Citti J.E., Sandine W.E. y Elliker P.R. (1965). Comparison of slow and fast acid-producing *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* **48**, 14-18.
- Clegg K.M., Lim C.L. y Manson W. (1974). The structure of a bitter peptide derived from casein by digestion with papain. *Journal of Dairy Research* **41**, 283-287.
- Cliffe A.J. y Law B.A. (1979). An electrophoretical study of peptidases in starter streptococci and in Cheddar cheese. *Journal of Applied Bacteriology* **47**, 65-73.
- Cliffe A.J. y Law B.A. (1990). Peptide composition of enzyme treated Cheddar cheese slurries, determined by reverse phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **36**, 73-80.
- Cliffe A.J., Revell D. y Law B.A. (1989). A method for the reverse phase high performance liquid chromatography of peptides from Cheddar cheese. *Food Chemistry* **34**, 147-160.
- Crawford R.J.M. (1977). Introduction to discussion on bitterness in cheese. *International Dairy Federation Annual Bulletin* **97**, 1-10.
- Creamer L.K. (1979). Chemical aspects of food quality. En "Developments in Food Science: 2. Proceedings of the Fifth International Congress of Food Science and Technology". Eds. Chiva H., Fujimaki M., Iwai K., Mitsuda H. y Morita Y., Kyoto, Japón.
- Creamer L.K., Lawrence R.C. y Gilles J. (1985). Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **20**, 185-203.
- Creamer L.K., Lawrence R.C., Gilles J. y Humphries M.A. (1970). Bitterness in cheese: role of starter demonstrated by computed statistics. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **5**, 35.

- Creamer L.K. y Olson N.F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science* **47**, 631-636, 646.
- Crow V.L. y Thomas T.D. (1982). D-tagatose 1,6-diphosphate aldolase from lactic streptococci: purification properties, and use in measuring intracellular tagatose 1,6-diphosphate. *Journal of Bacteriology* **151**, 600-608.
- Crow V.L., Martley F.J., Coolbear T. y Roundhill S.J. (1995). The influence of phage-assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML8 on Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* **5**, 451-472.
- Czulak J. (1959). Bitter flavour in cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* **14**, 177-179.
- Czulak J. y Shimmin P.D. (1961). Further notes on bitter flavour in cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* **16**, 96-98.
- David S. (1992). Genetics of mesophilic citrate fermenting lactic acid bacteria. Tesis Doctoral, Universidad de Wageningen, Holanda.
- Davies F.L. y Gasson M.J. (1981). Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research* **48**, 363-376.
- De Vos W.M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiology Reviews* **46**, 281-295.
- De Vos W.M., Boeritger Y., Vos P. y Siezen R.J. (1991). Production, processing and engineering of the *Lactococcus lactis* SK11 proteinase. En "Genetics and molecular biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci". G.M. Dunny, P.P. Cleary y L.L. McKay. Ed. Am. Soc. Microbiol., Washington, pp 115.
- De Vos W., Vos P., Simons G. y David S. (1989). Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **72**, 3398-3405.
- Deane D.D. (1951). Preliminary studies of the effect of acido-proteolytic organisms and temperatures of curing on the ripening of Cheddar cheese made from pasteurized milk. *Journal of Dairy Science* **34**, 776-783.
- Deane D.D. y Dolan E.T. (1973). Curing of cheese with reduced fat content. *Journal of Dairy Science* **56**, 631-633.
- Delforno G. y Parpani G. (1986). Bitter flavours in cheese. *Mondo del Latte* **40**, 565-567.
- Desmazeaud M.J. y Gripon J.C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft* **32**, 731-734.
- Desmazeaud M.J. y Zevaco C. (1976). General properties and substrate specificity of an intracellular neutral protease from *Streptococcus diacetylactis*. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. **16**, 851-868.

- Desmazeaud M.J. y Zevaco C. (1977). General properties and substrate specificity of an intracellular amino peptidase from *Streptococcus diacetylactis*. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique* **17**, 723-736.
- Desmazeaud M.J y Zevaco, C. (1979). Isolation and general properties of two intracellular aminopeptidases of *Streptococcus diacetylactis*. *Milchwissenschaft* **34**, 606-610.
- Dills S.S., Appersen A., Schmidt M.R. y Saiir C. (1980). Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiology Reviews* **44**, 385-418.
- Doi E., Shibata D. y Matoba T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry* **118**, 173-184.
- Dousset X., Demaimay M., Ravaud C., Levesque A., Pinet X. y Kergo Y. (1988). Influence de la température de réfrigération de lait sur la protéolyse et l'amertume du lait UHT au cours de son stockage. *Lait* **68**, 143-156.
- Dunn H.C. y Lindsay R.C. (1985). Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **68**, 2859-2874.
- Edwards J. y Kosikowski F.V. (1983). Bitter compounds from Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **66**, 727-734.
- Efstathiou J.D. y McKay L.L. (1976). Plasmids in *Streptococcus lactis*: evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Applied and Environmental Microbiology* **32**, 38-44
- Eggimann B. y Bachmann H. (1980). Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **40**, 876-882.
- Eigel W.N. (1977). Effect of bovine plasmin on α_{s1} , β and κ -A caseins. *Journal of Dairy Science* **60**, 1399-1404.
- El Abboudi M., Pandian S., Trépanier G., Simard R.E. y Lee B.H. (1991a). Heat-shocked lactobacilli for acceleration of Cheddar cheese ripening. *Journal of Food Science* **56**, 948-949, 953.
- El Abboudi M., El Soda M., Pandian S., Barreau M., Trépanier G. y Simard R.E. (1991b). Peptidase activities in debittering and non debittering strains of lactobacilli. *International Dairy Journal* **1**, 55-64.
- El Shafei H. (1994). Accelerated ripening of Ras cheese using cell free extract, freeze- and heat-shocked *Leuconostoc* spp. cultures. *Die Nahrung* **38**, 599-605.
- El Soda M., Begère J.L. y Desmazeaud M.J. (1978a). Detection and localization of peptide hydrolases in *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Research* **45**, 519-524.

- El Soda M. y Desmazeaud M.J. (1981). General properties of a new aryl-peptidyl amidase in *Lactobacillus casei*. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 1693-1700.
- El Soda M. y Desmazeaud M.J. (1982). Les peptidases-hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Canadian Journal of Microbiology* **82**, 1181-1188.
- El Soda M., Desmazeaud M.J., Aboudonia S. y Badran A. (1982). Acceleration of cheese ripening by the addition of extracts from *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* to the cheese curd. *Milchwissenschaft* **37**, 325-327.
- El Soda M., Desmazeaud M.J., Aboudonia S. y Kamal N. (1981). Acceleration of cheese ripening by the addition of whole cells or cell free extracts from *Lactobacillus casei* to the cheese curd. *Milchwissenschaft* **36**, 140-142.
- El Soda M., Desmazeaud M.J. y Bergère J.L. (1978b). Peptide hydrolases of *Lactobacillus casei*: isolation and general properties of various peptidase activities. *Journal of Dairy Research* **45**, 445-455.
- El Soda M., Desmazeaud M.J., Le Bars D. y Zevaco Z. (1986). Cell-wall-associated proteinases in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Protection* **44**, 361-365.
- Emmons D.B., McGugan W.A. y Elliot J.A. (1960a). Effect of strain starter culture and manufacturing procedure on bitterness in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **43**, 861-862.
- Emmons D.B., McGugan W.A. y Elliot J.A. (1960b). Nitrogen distribution in Cheddar cheese as related to bitterness and strain of starter culture. *Journal of Dairy Science* **43**, 862.
- Emmons D.B., McGugan W.A., Elliot J.A. y Morse P.M. (1961). Effect of combining single strain cultures as cheese starter on bitter flavor in Cheddar cheese at 6 months of age. *Journal of Dairy Science* **44**, 1157.
- Emmons D.B., McGugan W.A., Elliot J.A. y Morse P.M. (1962a). Effect of strain starter culture and manufacturing procedure on bitterness and protein breakdown in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **45**, 332-342.
- Emmons D.B., McGugan W.A., Elliot J.A. y Morse P.M. (1962b). Effect of combining single strain cultures as cheese starter on bitterness in Cheddar cheese at six months of age. *Journal of Dairy Science* **45**, 595-600.
- Exterkate F.A. (1976). Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **30**, 95-105.
- Exterkate F.A. (1977). Pyrrolidone carboxyl peptidase in *Streptococcus cremoris*: dependance on an interaction with membrane components. *Journal of Bacteriology* **129**, 1281-1288.

Exterkate F.A. (1983). The proteolytic system of starter streptococci: The crucial point in cheesemaking. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37**, 94-96.

Exterkate F.A. (1984). Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 177-183.

Exterkate F.A. (1987). On the possibility of accelerating the ripening of Gouda cheese: a comment. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **41**, 189-194.

Exterkate F.A., Alting A.C. y Slangen K.J. (1991). Specificity of two genetically related cell-envelope-proteinases of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* towards α_{s1} -casein-(1-23)-fragment. *Biochemical Journal* **273**, 135-139.

Exterkate F.A. y de Veer G.J.C.M. (1987a). Purification and some properties of a membrane-bound aminopeptidase A from *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 577-583.

Exterkate F.A. y de Veer G.J.C.M. (1987b). Complexity of the native cell wall proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP and purification of the enzyme. *Systematic and Applied Microbiology* **9**, 183-191.

Exterkate F.A. y de Veer G.J.C.M. (1989). Characterization of the cell wall proteinase P_{III} of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM1 and its relationship with the catalytically different cell wall proteinase P_I / P_{II} of strain HP. *Systematic and Applied Microbiology* **11**, 108-115.

Exterkate F.A. y Stadhouders J. (1971). Pyrrolidone carboxyl peptidase activity in bitter and non-bitter strains of *Streptococcus cremoris*. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **25**, 240-245.

Ezzat N. (1990). Accelerated ripening of Ras cheese with commercial proteinase and intracellular enzymes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Propionibacterium freudenreichii* and *Brevibacterium linens*. *Lait* **70**, 459-466.

Ezzat N., El Soda M., Boullanne C., Zevaco C. y Blanchard P. (1985). Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*. *Milchwissenschaft* **40**, 140-143.

Ezzat N., Zevaco C., El Soda M. y Gripon J.-C. (1987). Partial purification and characterization of a cell wall associated proteinase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft* **42**, 95-97.

Federación Internacional de Lechería (1987). Norma FIL N° 100A. Bruselas.

Fedrick I.A., Aston J.W., Nottingham S.M. y Dulley J.R. (1986). The effect of a neutral fungal protease on Cheddar cheese ripening. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **21**, 9-19.

Fernández del Pozo B. (1991). El queso de La Serena: microbiología, química y reología. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

- Fernández del Pozo B., Gaya P., Medina M., Rodríguez-Marín M.A. y Núñez M. (1988). Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research* **55**, 457-464.
- Foissy H. (1974). Examination of *Brevibacterium linens* by electrophoretic zymogram technique. *Journal of General Microbiology* **80**, 197-207.
- Foissy H. (1978). Aminopeptidase from *Brevibacterium linens*: production and purification. *Milchwissenschaft* **33**, 221-223.
- Foucaud C. y Poolman B. (1992). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 22087-22094.
- Fox P.F. (1988). Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **10**, 522-535.
- Frey J.P., Johnson M.E. y Marth E.H. (1986a). Peptidases and proteases in barley extract: a potential source of enzymes for use in cheese ripening. *Milchwissenschaft* **41**, 488-489.
- Frey J.P., Marth E.H., Johnson M.E. y Olson N.F. (1986b). Heat- and freeze-shocking cause changes in peptidase and protease activity of *Lactobacillus helveticus*. *Milchwissenschaft* **41**, 681-685.
- Fujimaki M., Yamashita M., Okazawa Y. y Arai S. (1968). Diffusible bitter peptides in peptic hydrolyzate of soybean protein. *Agricultural and Biological Chemistry* **32**, 794-795.
- Gardner R.J. (1978). Lipophilicity and bitter taste. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **30**, 531-532.
- Garvie E.I. y Mabbitt L.A. (1956). Acid production in milk by stater cultures. *Journal of Dairy Research* **23**, 305-314.
- Gasson M.J. y Anderson P.H. (1985). High copy number plasmid vectors for use in lactic streptococci. *FEMS Microbiology Letters* **30**, 193-196.
- Gasson M.J. y Davies F.L. (1984). The genetics of dairy lactic acid bacteria. En "Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk". Ed. Davies F.L. y Law B.A., Elsevier Applied Science Publishers, Londres, pp 99-126.
- Gatfield I.L. (1981). Isolation and properties of bitter-sensitive proteins via affinity chromatography. En "Flavour'81. Proc. 3rd Int. Weurman Symp.". Ed. Schreier P. Walter de Gruyter, Berlin.
- Gaya P., Medina M., Rodríguez-Marín M.A. y Núñez M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science* **73**, 26-32.
- Gebre-Egziabher A., Humbert E.S. y Blankenagel G. (1980). Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. *Journal of Food Protection* **43**, 709-712.

- Geis A., Bockelmann W. y Teuber M. (1985). Simultaneous extraction and purification of a cell wall associated peptidase and β -casein specific protease from *Streptococcus cremoris* AC1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**, 79-84.
- Gómez M.J., Garde S., Gaya P., Medina M. y Núñez M. (1996). Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*. (En prensa).
- Gordon D.F. y Speck M.L. (1965a). Bitterness in milk cultures of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* **48**, 499-500.
- Gordon D.F. y Speck M.L. (1965b). Bitter peptide isolated from milk cultures of *Streptococcus cremoris*. *Applied Microbiology* **13**, 537-542.
- Green M.L. y Foster P.M.D. (1974). Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheese made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *Journal of Dairy Research* **41**, 269-282.
- Grieve P.A. y Dulley J.R. (1983). Use of *Streptococcus lactis* lac⁻ mutants for accelerating Cheddar cheese ripening. 2. Their effect on the rate of proteolysis and flavour development. *Australian Journal of Dairy Technology* **38**, 49-54.
- Gripon J.-C. (1987). Mould-ripened cheeses. En "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology". Vol.2, Ed. P.F. Fox, Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Londres, pp 121-149.
- Gripon J.-C. y Debest B. (1976). Electrophoretic studies of the exocellular proteolytic system of *Penicillium roqueforti*. *Lait* **56**, 423-438.
- Gripon J.-C., Desmazeaud M.J., Le Bars D. y Bergère J.L. (1975). Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Lait* **55**, 502-516.
- Grufferty M.B. y Fox P.F. (1983). The effect of plasmin on α_{s1} casein. En "Research in Food Science and Nutrition". Vol 2. J.V. Mc Loughlin y B.M. McKenna, Ed. Bool Press, Dublin, pp 24.
- Grufferty M.B. y Fox P.F. (1988). Factors affecting the release of alkaline milk proteinase from casein micelles. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **23**, 153-159.
- Guigoz Y. y Solms J. (1974). Isolation of a bitter tasting peptide from "Alpkäse", a Swiss Mountain-cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **7**, 356-357.
- Guigoz Y. y Solms J. (1976). Bitter peptides, occurrence and structure. *Chemical Senses and Flavor* **2**, 71-84.
- Haandrikman A.J. (1990). Maturation of the cell-envelope associated proteinase of *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral, Universidad de Groningen, Holanda.

Hamilton J.S., Hill R.D. y van Leeuwen H. (1974). A bitter peptide from Cheddar cheese. *Agricultural and Biological Chemistry* **38**, 375-379.

Hansen H.C., Bendixen H.A. y Theophilus D.R. (1933). Influence of different starters on the quality of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **16**, 121-127.

Harriman L.A. y Hammer B.W. (1931). Variation in coagulation and proteolysis of milk by *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* **14**, 40-49.

Harwalkar V.R. (1967). Comparative study of bitter flavor fraction obtained from nonbitter and bitter Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **50**, 956.

Harwalkar V.R. y Elliot J.A. (1965). Isolation and partial purification of bitter components from Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **48**, 784.

Harwalkar V.R. y Elliot J.A. (1971). Isolation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **54**, 8-11.

Harwalkar V.R. y Seitz E.W. (1971). Production of bitter flavor components by lactic cultures. *Journal of Dairy Science* **54**, 12-14.

Hickey M.W., Hillier A.J. y Jago G.R. (1983). Peptidase activities in lactobacilli. *Australian Journal of Dairy Technology* **38**, 118-123.

Hicks C.L., Onuorah C., O'Leary J. y Langlois B.E. (1986). Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield- a summation. *Journal of Dairy Science* **69**, 649-657.

Hill S.H.A. y Gasson M.J. (1986). A qualitative screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Research* **53**, 625-629.

Hillier A.J., Kanasaki M. y Jago G.R. (1975). Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. 3. The influence of added growth supplement. *Australian Journal of Dairy Technology* **30**, 149-152.

Huber L. y Klostermeyer H. (1974). Isolation of a bitter peptide from the cheese "Butterkäse" and its identification. *Milchwissenschaft* **29**, 449-455.

Hutkins R.W. y Ponne C. (1991). Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for a galactose-lactose antiporter. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 941-944.

Hwang I.K., Kaminogawa S. y Yamauchi K. (1981). Purification and properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 159-165.

Hwang I.K., Kaminogawa S. y Yamauchi K. (1982). Kinetic properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. *Agricultural and Biological Chemistry* **46**, 3049-3053.

- Ichishima E., Kawai Y., Takeuchi M. y Ahiko K. (1986). Initial cleavage site of the oxidized insulin B-chain by a ribosomal proteinase from *Streptococcus lactis*, a food microorganism. *Current Microbiology* **13**, 47-49.
- Ishibashi N., Arita Y., Kanehisa H., Kouge K., Okai H. y Fukui S. (1987a). Bitterness of leucine-containing peptides (studies on flavored peptides. Part I). *Agricultural and Biological Chemistry* **51**, 2389-2394.
- Ishibashi N., Kubo T., Chino M., Fukui H., Shinoda Y., Kikuchi E., Okai H. y Fukui S. (1988b). Taste of proline-containing peptides (studies on flavored peptides. Part IV). *Agricultural and Biological Chemistry* **52**, 95-98.
- Ishibashi N., Ono Y., Kato K., Shigenaga T., Shinoda Y., Okai H. y Fukui S. (1988a). Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**, 91-94.
- Ishibashi N., Sodomori K., Yamamoto O., Kanehisa H., Kouge K., Kikuchi E., Okai H. y Fukui S. (1987b). Bitterness of phenylalanine- and tyrosine-containing peptides (studies on flavored peptides. Part II). *Agricultural and Biological Chemistry* **51**, 3309-3313.
- Jago G.R. (1962.) Proteolysis of milk proteins in relation to bitter flavour in cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* **17**, 83-85.
- Jago G.R. (1974). Control of the bitter flavour defect in cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* **29**, 94-96.
- Kalogridou-Vassiliadou D. y Alichanidis E. (1984). Effect of refrigerated storage of milk on the manufacture and quality of Teleme cheese. *Journal of Dairy Research* **51**, 629-636.
- Kamaly K.M. y Marth E.H. (1988). Proteinase and peptidase activities of cell-free extracts from mutant strains of lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science* **71**, 2349-2357.
- Kaminogawa S., Azuma N., Hwang I.K., Susuki Y. y Yamauchi K. (1984a). Isolation and characterization of a prolidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Agricultural and Biological Chemistry* **48**, 3035-3040.
- Kaminogawa S., Ninomiya T. y Yamauchi K. (1984b). Aminopeptidase profiles of lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science* **67**, 2483-2492.
- Kaminogawa S., Yamauchi K., Miyazawa S. y Koya Y. (1980). Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *Journal of Dairy Science* **63**, 701-704.
- Kaminogawa S., Yan T.-R., Azuma N. y Yamauchi K. (1986). Identification of low molecular weight peptides in Gouda cheese and evidence for the formation of these peptides from 23 N-terminal residues of α_{s1} casein by proteinases of *Streptococcus cremoris* H61. *Journal of Food Science* **51**, 1253-1256.
- Kandler O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.

- Kanehisa H., Miyake Y., Okai H., Aoyagi H. e Izumiya N. (1984). Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. X. Synthesis and bitter taste of H-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val-OH corresponding to C-terminal portion of β -casein. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **57**, 819-822.
- Kaneko S. y Yoneda Y. (1974). Studies on the cause of bitterness of yeast ripened cheese. En "XIX International Dairy Congress" (brief communications) 1E, 776.
- Keller B., Olson N.F., y Richardson T. (1974). Mineral retention and rheological properties of Mozzarella cheese made by direct acidification. *Journal of Dairy Science* **57**, 174-180.
- Kempler G.M. y McKay L.L. (1979). Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Applied and Environmental Microbiology* **37**, 316-323.
- Khalid N.M., El Soda M. y Marth, E.H. (1991). Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science* **74**, 29-45.
- Khalid N.M. y Marth E.H. (1990). Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science* **73**, 3068-3076.
- Kiefer-Partsch B., Bockelmann W., Geis A. y Teuber M. (1989). Purification of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from the cell wall proteolytic system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 75-78.
- Kirimura J., Shimizu A., Kimizuka A., Ninomiya T. y Katsuya N. (1969). The contribution of peptides and amino acids to the taste of food-stuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **17**, 689-695.
- Kiwaki M., Ikemura H., Shimizu-Kadota M. y Hirashima A. (1989). Molecular characterization of a cell wall associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO 763. *Molecular Microbiology* **3**, 359-369.
- Kleter G. (1976). The ripening of Gouda Cheese made under strict aseptic conditions. 1. Cheese with no other bacterial enzymes than those from a starter *Streptococcus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **30**, 254-270.
- Klimowski Y., Zvyagintsev V., Gudkov A. y Medvedeva Z. (1970). Detection of "bitter" strains of lactic acid streptococci. En "XVIII International Dairy Congress" 1E, 119.
- Kok J. (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **87**, 15-42.
- Kok J., Leenhouts K., Haandrikman A.J., Ledebøer A.M. y Venema G. (1988). Nucleotide sequence of the gene for cell wall proteinase of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 231-238.

- Kok J., van Vossen J.M.B.M. y Venema G. (1984). Construction of plasmid cloning vectors for lactic Streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 726-731.
- Kok J. y Venema G. (1988). Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. *Biochemie* **70**, 475-488.
- Kolstad J. y Law B.A. (1985). Comparative specificity of cell wall, membrane and intracellular peptidases of group N streptococci. *Journal of Applied Bacteriology* **58**, 449-456.
- Kondo J.F. y McKay L.L. (1984). Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 252-259.
- Kubota T. y Kubo Y. (1969). Bitterness and chemical structure. *Nature* **223**, 97-99.
- Kuchroo C.N. y Fox P.F. (1983). Fractionation of the water soluble nitrogen from Cheddar cheese: chromatographic methods. *Milchwissenschaft* **38**, 76-79.
- Kuhl S.A., Larsen L.D. y McKay L.L. (1979). Plasmid profiles of lactose negative and proteinase deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, M13 and M18. *Applied and Environmental Microbiology* **37**, 1193-1195.
- Laan H. (1991). The extracellular proteinase of *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral, Universidad de Groningen, Holanda.
- Laan H. y Konings W.N. (1989). Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 3101-3106.
- Laan H. y Konings W.N. (1991). Autoproteolysis of the extracellular serine proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2586-2590.
- Lalasis G. (1978). Four new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with high content of essential amino acids. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* **32**, 709-723.
- Langsrud T., Reinhold G.W. y Hammond E.G. (1977). Proline production by *Propionibacterium shermanii*. *Journal of Dairy Science* **60**, 16-23.
- Langsrud T., Reinhold G.W. y Hammond E.G. (1978). Free proline production by propionibacteria. *Journal of Dairy Science* **61**, 303-308.
- Lau K.Y., Barbano D.M. y Rasmussen R.R. (1990). Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and Cheddar cheese yield. *Journal of Dairy Science* **73**, 561-570.
- Lau K.Y., Barbano D.M. y Rasmussen R.R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science* **74**, 727-740.

Law B.A. (1977). Dipeptide utilization by starter streptococci. *Journal of Dairy Research* **44**, 309-317.

Law B.A. (1979). Extracellular peptidases in group N streptococci used as cheese starter. *Journal of Applied Bacteriology* **46**, 455-463.

Law B.A. (1982). Cheeses. En "Economic Microbiology Vol 7. Fermented Foods". A.H. Rose, Ed. Academic Press, Londres, pp147.

Law B.A. (1987). Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En "Cheese: chemistry, physics and microbiology, Vol 1: General Aspects". Ed. P.F. Fox, Elsevier Appl. Sci. Publ, Londres.

Law J., Fitzgerald G.F., Daly C., Fox P.F. y Farkye N.Y. (1992a). Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made with the single strains *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 or *Lactococcus* subsp. *cremoris* HP. *Journal of Dairy Science* **75**, 1173-1185.

Law B.A. y Kolstad J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 225-245.

Law B.A., Sezgin E. y Sharpe M.E. (1976a). Amino acid nutrition of some commercial cheese starters in relation to their growth in peptone supplemented whey media. *Journal of Dairy Research* **43**, 291-300.

Law B.A., Sharpe M.E. y Chapman (1976b). The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Research* **43**, 459-468.

Law J., Vos P., Hayes F., Daly C., de Vos W.M. y Fitzgerald G.F. (1992b). Cloning and partial sequencing of the proteinase gene complex from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317. *Journal of General Microbiology* **138**, 709-718.

Law B.A. y Wigmore A.S. (1982a). Microbial proteinases as agents for accelerated cheese ripening. *Journal of the Society of Dairy Technology* **35**, 75-76.

Law B.A. y Wigmore A.S. (1982b). Accelerated cheese ripening with food grade proteinases. *Journal of Dairy Research* **49**, 137-146.

Lawrence R.C., Creamer L.K., Gilles J. y Martley F.G. (1972). Cheddar cheese flavour. 1. The role of starters and rennets. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **7**, 32-37.

Lawrence R.C. y Gilles J. (1969). The formation of bitterness in cheese: a critical evaluation. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **4**, 189-196.

Lawrence R.C., Gilles J. y Creamer L.K. (1983). The relationship between cheese texture and flavour. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **18**, 175-190.

Lawrence R.C., Heap H.A. y Gilles J. (1984). A controlled approach to cheese technology. *Journal of Dairy Science* **67**, 1632-1645.

- Lawrence R.C. y Pearce L.E. (1968). The case against the use of unpaired single starter strains. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **3**, 137-139.
- Lawrence R.C., Thomas T.D. y Terzaghi B.E. (1976). Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *Journal of Dairy Research* **43**, 141-193.
- Ledford R.A., O'Sullivan A.C. y Nath K.R. (1966). Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science* **49**, 1098-1101.
- Lee B.H., Laleye L.C., Simard R.E., Holley R.A., Emmons D.B. y Giroux R.N. (1990a). Influence of homofermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Food Science* **55**, 386-390.
- Lee B.H., Laleye L.C., Simard R.E., Munsch M.H. y Holley R.A. (1990b). Influence of homofermentative lactobacilli on the microflora and soluble nitrogen components in Cheddar cheese. *Journal of Food Science* **55**, 391-397.
- Lemieux L., Puchades R. y Simard R.E. (1989). Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerated ripening. *Journal of Food Science* **54**, 1234-1237.
- Lemieux L. y Simard R.E. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait* **72**, 335-382.
- Lowrie R.J. (1977). Influence of lactic streptococci on bitter flavor development in cheese. *Journal of Dairy Science* **60**, 810-814.
- Lowrie R.J. y Lawrence R.C. (1972). Cheddar cheese flavour. IV. A new hypothesis to account for the development of bitterness. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **7**, 51-53.
- Lowrie R.J., Lawrence R.C., Pearce L.E. y Richards E.L. (1972). Cheddar cheese flavour. III. The growth of lactic streptococci during cheese-making and the effect on bitterness development. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **7**, 44-50.
- Lowrie R.J., Lawrence R.C. y Peberdy F. (1974). Cheddar cheese flavour. V. Influence of bacteriophage and cooking temperature on cheese made under controlled bacteriological conditions. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **9**, 116-121.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Lewis-Farr A. y Randall R.J. (1951). Proteins measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Mälkki Y., Karila P., Antila V. y Witting Ö. (1978). The use of peptidases in ripening of cheese. In "Second Franco-Finish Symposium on Biotechnology-Bioconversion in Food Technology" (Proceedings), Helsinki, 91-95.

- Martley F.G. (1975). Comportment et rôle des streptocoques lactiques du levain en fabrication de Camembert. *Lait* **55**, 310-323.
- Martley F.G. y Lawrence R.C. (1972). Cheddar cheese flavour. II. Characteristics of single strain starters associated with good or poor flavour development. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **7**, 38-44.
- Matoba T. y Hata T. (1972). Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agricultural and Biological Chemistry* **36**, 1423-1431.
- Mayo B., Hardisson C. y Fernández-Braña A. (1990). Characterization of wild strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Cabrales cheese. *Journal of Dairy Research* **57**, 125-134.
- Mayo B., Kok J., Venema K., Bockelmann W., Teuber M., Reinke H. y Venema G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 38-44.
- McGugan W.A., Emmons D.B. y Larmond E. (1979). Influence of volatile and non-volatile fractions on intensity of Cheddar flavour. *Journal of Dairy Science* **62**, 398-403.
- McKay L.L. (1983). Functional properties of plasmin in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 259-274.
- McSweeney P.L.H., Fox P.F., Lucey J.A., Jordan K.N. y Cogan T.M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* **3**, 613-634.
- McSweeney P.L.H., Walsh E.M., Fox P.F., Cogan T.M., Drinan F.D. y Castelo González M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agriculture and Food Research* **33**, 183-192.
- Meyer J. y Jordi J. (1987). Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus lactis* and from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science* **70**, 738-745.
- Millière J.B., Mathot A.-G., Schmitt P. y Divies C. (1989). Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal Applied Bacteriology* **67**, 529-542.
- Mills O.E. y Thomas T.D. (1980). Bitterness development in Cheddar cheese : effect of the level of starter proteinase. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **15**, 131-141.
- Mills O.E. y Thomas T.D. (1982). Starter proteinase and bitterness development in Cheddar cheese. En "XXI International Dairy Congress" 1 (1) 511-512.

- Minagawa E., Kaminogawa S., Matsuzawa H., Hota T. y Yamauchi, K. (1988). Isolation and characterization of a thermostable aminopeptidase (aminopeptidase T) from *Thermus aquaticus* YT-1, an extremely thermophilic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**, 1755-1763.
- Minagawa E., Kaminogawa S., Tsukasaki F. y Yamauchi K. (1989). Debittering mechanism in bitter peptides of hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *Journal of Food Science* **54**, 1225-1229.
- Minamiura N., Matsumura Y., Fukumoto J. y Yamamoto T. (1972). Bitter peptides in cow milk casein digests with bacterial proteinase. Part 1. Isolation and determination of amino acid sequence of a bitter peptide. *Agricultural and Biological Chemistry* **36**, 588-595.
- Monnet V., Bockelmann W., Gripon J.C. y Teuber M. (1989). Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC1 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. II. Specificity towards bovine β -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 112-118.
- Monnet V., Le Bars D. y Gripon J.C. (1986) Specificity of a cell wall proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO 763 towards bovine β -casein. *FEMS Microbiology Letters* **36**, 127-131.
- Monnet V., Le Bars D. y Gripon J.C. (1987a). Purification and characterization of a cell envelope proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO763. *Journal of Dairy Research* **54**, 247-255.
- Monnet V., Le Bars D., Neviani E. y Gripon J.C. (1987b). Partial characterization and comparison of cell wall proteinases from 5 strains of *Streptococcus lactis*. *Lait* **67**, 51-61.
- Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T. y Yura T. (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology* **148**, 64-71.
- Mou L., Sullivan J.J. y Jago J.R. (1975). Peptidase activities of group N streptococci. *Journal of Dairy Research* **42**, 147-155.
- Muset G., Monnet V. y Gripon J.-C. (1989). Intracellular proteinase of *Lactococcus lactis* NCDO 763. *Journal of Dairy Research* **56**, 765-778.
- Napper D.H. (1983). Polymeric stabilization of colloidal dispersions. Academic Press, Londres.
- Nardi M., Chopin M.C., Chopin A., Cals M.D. y Gripon J.C. (1991). Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 45-50.
- Nelson J.H. (1974). The riddle of bitter flavor in cheese. *Italian Cheese Journal* **3**, 1-4, 6.
- Neviani E., Boquien C.Y., Monnet V., Phan T.L. y Gripon J.-C. (1989). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2308-2314.

- Ney K.H. (1971). Prediction of bitterness of peptides from their amino acid composition. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **147**, 64-68.
- Ney K.H. (1979). Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. En "Food taste chemistry". Ed Boudreau J.C., Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 115, Washington, pp 149-174.
- Ney K.H. (1981). Recent advances in cheese flavor research. En "The quality of foods and beverages. Chemistry and Technology" Vol 1, Ed. Charalambous G., Inglett G., Academic Press Inc., Nueva York.
- Nickels C. y Leesment H. (1964). KCA medium for lactococci and leuconostocs. *Milchwissenschaft* **19**, 374-378.
- Niven G.W. (1991). Purification and characterization of aminopeptidase A from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 712. *Journal of General Microbiology* **137**, 1207-1212.
- Núñez M., García Aser C., Rodríguez-Marín M.A., Medina M. y Gaya P. (1986). The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis of Manchego cheese. *Food Chemistry* **21**, 115-123.
- Núñez M., Guillén A.M., Rodríguez-Marín M.A., Marcilla A.M., Gaya P. y Medina M. (1991). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases. *Journal of Dairy Science* **74**, 4108-4118.
- Núñez M. y Medina M. (1979). La flore lactique du fromage bleu de Cabrales. *Lait* **59**, 497-513.
- Núñez M., Núñez J.A. y Medina A.L. (1982). Freeze-dried concentrated starters for direct inoculation of vat milk in Manchego cheese manufacture. *Milchwissenschaft* **37**, 328-330.
- Ohmiya K. y Sato Y. (1975). Purification and properties of intracellular proteinase from *Streptococcus cremoris*. *Applied Microbiology* **30**, 738-745.
- Okai H. (1976). Relationship between bitterness and chemical structure in synthetic peptides. En "Peptide chemistry, 14th Symposium of Peptide Chemistry (proceedings)", Hiroshima, 139-142.
- O'Keeffe R.B., Fox P.F. y Daly C. (1975). Proteolysis in Cheddar cheese: influence of the rate of acid production during manufacture. *Journal of Dairy Research* **42**, 111-122.
- O'Keeffe R.B., Fox P.F. y Daly C. (1976). Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* **43**, 97-107.
- O'Keeffe R.B., Fox P.F. y Daly C. (1978). Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. *Journal of Dairy Research* **45**, 465-477.

- Otagiri K., Noshō Y., Shinoda Y., Fukui H. y Okai H. (1985). Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. I. Bitter taste of di- and tri-peptides, and bitterness increase of the model peptides by extension of the peptide chain. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 1019-1026.
- Park S.Y., Gibbs B.F. y Lee B.H. (1995). Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water soluble peptides of enzyme-modified cheese. *Food Research International* **28**, 43-49.
- Pélissier J.P. (1984). Proteolysis of caseins. *Sciences des Aliments* **4**, 1-35.
- Pélissier J.P. y Manchon P. (1976). Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *Journal of Food Science* **41**, 231-233.
- Pélissier J.P., Mercier J.C. y Ribadeau-Dumas B. (1974). Problème de l'amertume dans les fromages - résultats d'une enquête. *Revue Laitière Française* **325**, 817, 820-821.
- Pélissier J.P. y Ribadeau-Dumas B. (1976). Pourquoi les fromages ont-ils parfois un goût amer? Peut-on y remédier? *Revue Laitière Française* **341**, 217, 219, 221, 223.
- Perry K.D. y McGillivray W.A. (1964). The manufacture of "normal" and "starter-free" Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions. *Journal of Dairy Research* **31**, 155-165.
- Perry K.D. y Sharpe M.E. (1960). Lactobacilli in raw milk and in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* **27**, 267-275.
- Petritschek A., Lynen F. y Belitz H.D. (1972). Investigations on bitter peptides. II. Appearance of bitter taste in enzymatic hydrolysates of different proteins. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **5**, 77-81.
- Pham A.M. y Nakai S. (1984). Application of stepwise discriminant analysis to high pressure liquid chromatography profiles of water extract for judging ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **67**, 1390-1396.
- Phelan J.A., Guiney J. y Fox P.F. (1973). Proteolysis of β -casein in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* **40**, 105-112.
- Picón A., Gaya P., Medina M. y Núñez M. (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* **78**, 1238-1247.
- Poolman B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 125-148.
- Poolman B., Kunji E.R.S., Hagting A., Juillard V. y Konings W.N. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology (Symposium Supplement)* **79**, 65S-75S.

- Poolman B., Molenaar D., Smid E.J., Ubbink T., Abee T., Renault P.P. y Konings W.N. (1991). Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *Journal of Bacteriology* **173**, 6030-6037.
- Postma P.W., Lengeler J.W. y Jacobsen G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews* **57**, 543-594.
- Price W.N. y Call A.O. (1969). Cheddar cheese: comparison of effects of raw and heated milk on quality and ripening. *Journal of Milk and Food Technology* **32**, 304-311.
- Pritchard G.G., Freebairn A.D. y Coolbear T. (1994). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11. *Microbiology* **140**, 923-930.
- Prost F. y Chamba J.F. (1994). Effect of aminopeptidase activity of thermophilic *Lactobacilli* on Emmental cheese characteristics. *Journal of Dairy Science* **77**, 24-33.
- Puchades R., Lemieux L. y Simard R.E. (1989). Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *Journal of Food Science* **54**, 885-888.
- Raadsveld C.W. (1953). Bitter compounds from cheese. En "XIIIth International Dairy Congress" (Proc II, Sec II), 676-680.
- Rabier D. y Desmazeaud M.J. (1973). Inventaire des différentes activités peptidasiques intracellulaires des *Streptococcus thermophilus*. Purification et propriétés d'une dipeptide-hydrolase et d'une aminopeptidase. *Biochimie* **55**, 389-404.
- Reid J.R., Huatng K., Moore C.H., Coolbear T. y Pritchard G.G. (1991a). Comparison of bovine β -casein hydrolysis by P_I and P_{III}-type proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 344-351.
- Reid J.R., Moore C.H., Midwinter G.G. y Pritchard G.G. (1991b). Action of a cell wall proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 on bovine α_{s1} -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**, 222-227.
- Reiter B., Fryer T.F., Pickering A., Chapman H.R., Lawrence R.C. y Sharpe M.E. (1967). The effect of the microbial flora on the flavour and free fatty acid composition of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* **34**, 257-272.
- Reiter B. y Oram J.D. (1962). Nutritional studies on cheese starter. 1. Vitamin and amino acid requirements of single strains starters. *Journal of Dairy Research* **29**, 63-77.
- Requena T. (1991). Caracterización de bacterias lácticas en dirección a su utilización como cultivo iniciador de queso semiduro de cabra. Estudio del sistema proteolítico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Richardson B.C. y Creamer L.K. (1970). Proteolytic degradation of caseins in Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **5**, 166-167.

Richardson B.C. y Creamer L.K. (1973). Casein proteolysis and bitter peptides in Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **8**, 46-51.

Richardson B.C. y Elston P.D. (1984). Plasmin activity in commercial casein and caseinates. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **19**, 63-67.

Richardson B.C., Ernstrom C.A., Kim J.M. y Daly C. (1983). Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. *Journal of Dairy Science* **66**, 2278-2286.

Richardson B.C. y Newstead D.F. (1979). Effect of heat stable proteases on the storage life of UHT milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **14**, 273-279.

Riddet W., Valentine G.M. y Whitehead H.R. (1932). A starter producing bitterness in cheese. *New Zealand Journal of Agriculture* **44**, 32-34.

Sasaki M., Bosman B.W. y Tan P.S.T. (1995). Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *Journal of Dairy Research* **62**, 601-610.

Schalinatus E. y Behnke U. (1975a). Studies on bitter peptides from casein and cheese. Part II. Formation and isolation of bitter peptides. *Nahrung* **19**, 433-445.

Schalinatus E. y Behnke U. (1975b). Studies on bitter peptides from casein and cheese. Part III. Characterization of bitter peptides and studies on the elimination of bitter taste. *Nahrung* **19**, 447-459.

Scott R. (1972). Cheesemaking-enzimology or bacteriology?. *Process Biochemistry* **3**, 33-36.

Shinoda I., Fushimi A., Kato H., Okai H. y Fukui S. (1985b). Bitter taste of synthetic C-terminal tetradecapeptide of bovine β -casein. H-Pro¹⁹⁶-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val²⁰⁹-OH, and its related peptides. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 2587-2596.

Shinoda I. y Okai H. (1985). Sweetness and bitterness contributions of structural units of aspartam and some analogues. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry* **33**, 792-795.

Shinoda I., Okai H. y Fukui S. (1986b). Bitter taste of H-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-OH corresponding to the partial sequence (positions 82-88) of bovine β -casein, and related peptides. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 1255-1260.

Shinoda I., Tada M., Okai H. y Fukui S. (1986a). Bitter taste of H-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-OH corresponding to the partial sequence (positions 61-67) of bovine β -casein, and related peptides. (Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. Part XII). *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 1247-1254.

Shinoda I., Tada M., Otagiri K. y Okai H. (1985a). Bitter taste of Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro corresponding to the partial sequence (positions 61-67) of bovine β -casein. En "Peptide chemistry 1985: 23rd Symp. Peptide Chemistry" (Proc), Kyoto, 287-290.

- Shipe W.F., Bassette R., Deane D.D., Dunkley W.L., Hammond E.G., Harper W.J., Klein D.H., Morgan M.E., Nelson J.H. y Scanlan R.A. (1978). Off flavors of milk: nomenclature, standards and bibliography. *Journal of Dairy Science* **61**, 855-869.
- Simon D., Rouault A. y Chopin M.-C. (1986). High efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 394-395.
- Smid E.J., Poolman B. y Konings W.N. (1991). Casein utilization by lactococci. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2447-2452.
- Snoeren H.M. y van Riel J.A.M. (1979). Milk proteinase, its isolation and action on α_{s2} - and β -casein. *Milchwissenschaft* **34**, 528-531.
- Sood V.K. y Kosikowski F.V. (1979). Ripening changes and flavor development in microbial enzyme treated Cheddar cheese slurries. *Journal of Food Science* **44**, 1690-1694.
- Sorhaug T. (1981). Comparison of peptide hydrolases from six strains of *Brevibacterium linens*. *Milchwissenschaft* **36**, 137-139.
- Sorhaug T. y Solberg P. (1973). Fractionation of dipeptidase activities of *Streptococcus lactis* and dipeptidase specificity of some lactic acid bacteria. *Applied Microbiology* **25**, 338-395. °
- Stadhouders J. (1962). The proteolytic activity of rennet and starter bacteria in cheese with reference to bitter flavour. En "XVI International Dairy Congress" B (section IV), 353-361.
- Stadhouders J. (1974). Dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* **29**, 329-337.
- Stadhouders J. y Hup G. (1975). Factors affecting bitter flavour in Gouda cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **29**, 335-353.
- Stadhouders J., Hup G., Exterkate F.A. y Visser S. (1983). Bitter flavour in cheese. 1. Mechanism of the formation of the bitter flavour defect in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37**, 157-167.
- Stadhouders J. y Leenders G.J.M. (1984). Spontaneously developed mixed-strain cheese starters. Their behaviour towards phages and their use in the Dutch cheese industry. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **38**, 157-181.
- Steel R.G.D. y Torrie J.H. (1980). Comparisons involving two sample means. En "Principles and procedures of statistics. A biometrical approach". 2ª Edición. MacGraw-Hill Book Co., Inc., Nueva York, pp 86-121.
- Stroman P. (1992). Sequence of a gene (*lep*) encoding a 95.3 kDa aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Gene* **113**, 107-112.
- Sullivan J.J. y Jago G.R. (1970a). A model of bitter peptide formation and degradation in cultured dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* **25**, 111.

- Sullivan J.J. y Jago G.R. (1970b). Pyrrolidone carboxyl peptidase activity in *Streptococcus cremoris* ML1. *Australian Journal of Dairy Technology* **25**, 141.
- Sullivan J.J. y Jago G.R. (1972). The structure of bitter peptides and their formation from casein. *Australian Journal of Dairy Technology* **27**, 98-104.
- Sullivan J.J., Mou L., Rood J.I. y Jago G.R. (1973). The enzymic degradation of bitter peptides by starter streptococci. *Australian Journal of Dairy Technology* **28**, 20-26.
- Tamura M., Mori N., Miyoshi T., Koyama S., Kohri H. y Okai H. (1990). Practical debittering using model peptides and related compounds. *Agricultural and Biological Chemistry* **54**, 41-51.
- Tan P.S.T. y Konings W.N. (1990). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 526-532.
- Tan P.S.T., Pos K.M. y Konings W.N. (1991). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3593-3599.
- Thomas T.D. y Mills O.E. (1981). Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **35**, 255-273.
- Thomas T.D. y Pritchard G.G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Reviews* **46**, 245-268.
- Tittsler R.P., Sanders G.P., Lochry H.R. y Sager O.S. (1948). The influence of various lactobacilli and certain streptococci on the chemical changes, flavor development and quality of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **31**, 716.
- Torgensen H. y Sorhaug T. (1978). Peptide hydrolases of *Brevibacterium linens*. *FEMS Microbiology Letters* **4**, 151-153.
- Torrie J.P., Cholette H., Froehlich D.A. y McKellar R.C. (1983). Growth of an extracellular proteinase-deficient strain of *Pseudomonas fluorescens* on milk and milk proteins. *Journal of Dairy Research* **50**, 365-374.
- Trépanier G., El Abboudi M., Lee B.H. y Simard R.E. (1992). Accelerated maturation of Cheddar cheese: Influence of added lactobacilli and commercial protease on composition and texture. *Journal of Food Science* **57**, 898-902.
- Trépanier G., Simard R.E. y Lee B.H. (1991). Effect of added lactobacilli on composition and texture of Cheddar cheese during accelerated maturation. *Journal of Food Science* **56**, 696-700.
- Umemoto I., Sato I y Kito J. (1978). Direct observation of fine structures of bacteria in ripened Cheddar cheese by electron microscopy. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry* **42**, 227-232.

Umetsu H. e Ichishima E. (1988). Mechanism of digestion of bitter peptides from soybean protein by wheat carboxypeptidase. *Nippon Shokkukhin Kogyo Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.)* **35**, 440-447.

Umetsu H., Matsuoka H. e Ichishima E. (1983). Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry* **31**, 50-53.

Vafopoulou A., Alichanidis E. y Zerfiridis G. (1989). Accelerated ripening of Feta cheese with heat-shocked cultures or microbial proteinases. *Journal of Dairy Research* **56**, 285-292.

Vakaleris D.G. y Price W.V. (1959). A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Dairy Science* **42**, 264-276.

Van Alan-Boerrigter I.J., Baankreis R. y de Vos W.N. (1991). Characterization and overexpression of the *Lactococcus lactis* pep N gene and location of its product, aminopeptidase N. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2555-2561.

Van Boven A., Tan P.S.T. y Konings W.N. (1988). Purification and characterization of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 43-49.

Van der Vossen J.M.B.M., Van der Lelie D. y Venema G. (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2 specific promoters. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2452-2457.

Vassal L. y Gripon J.-C. (1984). L'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert: rôle de la présure et de *Penicillium caseicolum*, moyens de la contrôler. *Lait* **64**, 397-417.

Visser F.M.W. (1977a). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 1. Description of cheese and aseptic cheesemaking techniques. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **31**, 120-133.

Visser F.M.W. (1977b). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 2. Development of bitterness and cheese flavour. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **31**, 188-209.

Visser F.M.W. (1977c). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of soluble nitrogen and amino acid nitrogen fractions. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **31**, 210-239.

Visser F.M.W. (1977d). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 5. Some observations on bitter extracts from aseptically made cheeses. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **31**, 265-276.

- Visser F.M.W. y Groot-Mostert A.E.A. (1977) Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **31**, 247-264.
- Visser S. (1981). Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **35**, 65-88.
- Visser S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. *Journal of Dairy Science* **76**, 329-350.
- Visser S., Exterkate F.A., Slangen K.J. y de Veer G.J.C.M. (1986). Comparative study of the action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} -, β - and κ -casein. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 1162-1166.
- Visser S., Hup G., Exterkate F.A. y Stadhouders J. (1983a). Bitter flavour in cheese. 2. Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37**, 169-180.
- Visser S., Robben A.J.P.M. y Slangen C.J. (1991). Specificity of a cell-envelope-located proteinase (P_{III}-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 in its action on bovine β -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**, 477-483.
- Visser S. y Slangen K.J. (1977). On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine β casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **31**, 16-30.
- Visser S., Slangen K.J., Exterkate F.A. y de Veer G.J.C.M. (1988). Action of a cell wall proteinase (P_I) from *Streptococcus cremoris* strain HP on bovine β -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 61-66.
- Visser S., Slangen K.J. y Hup G. (1975). Some bitter peptides from rennet-treated casein. A method for their purification, utilizing chromatographic separation on silica gel. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **29**, 319-334.
- Visser S., Slangen K.J., Hup G., Exterkate F.A. y Stadhouders J. (1983c). The bitter flavour defect in cheese; some chemical and microbiological aspects. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37**, 250-251.
- Visser S., Slangen K.J., Hup G. y Stadhouders J. (1983b). Bitter flavour in cheese. 3. Comparative gel-chromatographic analysis of hydrophobic peptide fractions from twelve Gouda-type cheeses and identification of bitter peptides isolated from cheese made with *Streptococcus cremoris* strain HP. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37**, 181-192.
- Vos P., Simons G., Siezen R.J. y de Vos W.N. (1989). Primary structure and organization of the gene for a prokaryotic, cell-envelope-located serine proteinase. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 13579-13585.
- Wake R.G. (1959). Studies of casein. V. The action of rennin on casein. *Australian Journal of Biological Sciences* **12**, 479-489.

- Walstra P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science* **73**, 1965-1979.
- Waugh D.F. y Von Hippel P.H. (1956). κ -casein and the stabilization of casein micelles. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 4576-4582.
- Weinstein M. J. y Doolittle R.F. (1972). Differential specificities of thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* **258**, 577-590.
- Westhoff D.C., Cowman R.A. y Speck M.L. (1971). Isolation and partial characterization of a particulate proteinase from a slow acid producing mutant of *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* **54**, 1253-1258.
- White C.H., Gilleis W.T., Simmler D.L., Galal M.K., Walsh J.R. y Adams J.T. (1978). Evaluation of raw milk quality tests. *Journal of Food Protection* **41**, 356-360.
- White C.H. y Marshall R.T. (1973). Reduction of shelf-life of dairy products by a heat stable protease from *Pseudomonas fluorescens* P26. *Journal of Dairy Science* **56**, 849-853.
- Wieser H. y Belitz H.D. (1975). Bitter peptides isolated from corn protein zein by hydrolysis with pepsin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **159**, 329-336.
- Wieser H. y Belitz H.D. (1976). Relations between structure and bitter taste of amino acids and peptides. II. Peptides and their derivatives. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **160**, 383-392.
- Winland H. y Kosikowski F.V. (1956). The influence of milk-coagulating enzymes of nonanimal origin upon the flavor and constituents of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **39**, 917-918
- Wright A., Taimisto A.-M. y Sivela S. (1985). Effect of Ca^{2+} ions on plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1100-1102.
- Yamashita M., Arai S. y Fujimaki M. (1969). Applying proteolytic enzymes on soybean. Part IV. A ninhydrin-negative bitter peptide in peptic hydrolyzate of soybean protein. *Agricultural and Biological Chemistry* **33**, 321-330.
- Yan T.-R., Azuma N., Kaminogawa S. y Yamauchi K. (1987a). Purification and characterization of a novel metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *European Journal of Biochemistry* **163**, 259-265.
- Yan T.-R., Azuma N., Kaminogawa S. y Yamauchi K. (1987b). Purification and characterization of a substrate-size-recognizing metallopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2296-2302.

Yates A.R., Irvine O.R. y Cunningham J.D. (1955). Chromatographic studies on proteolytic bacteria in their relationship to flavour development in Cheddar cheese. *Canadian Journal of Agricultural Science* **35**, 337-343.

Yu P.L., Appleby R.D., Pritchard G.G. y Limmsowtin G.K.Y. (1989). Restriction mapping and localization of the lactose metabolising genes of *Streptococcus cremoris* pGI-21. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**, 71-74.

Zevaco C. y Gripon J.-C. (1988). Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Lait* **68**, 393-408.

Zevaco C., Monnet V. y Gripon J.-C. (1990). Intracellular X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: purification and properties. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 357-366.