

OBSERVACIONES PRELIMINARES PARA UNA PROPUESTA SOBRE LA CARACTERIZACIÓN DE FERMENTOS SEGÚN SU SISTEMA ENZIMÁTICO

Preliminar observations for a model to the characterization of starters according to its enzymatic system

Lourdes Guerrero*
Graciela Muset**

* Universidad de los Andes. Núcleo Universitario Rafael Rangel Trujillo, Venezuela. Fax: 071-62414.

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

RESUMEN

Se presentan los resultados preliminares sobre un esquema de caracterización enzimática de cepas puras y comerciales, basadas en relación a su carácter Prt+ y Prt-, su actividad acidificante, proteolítica y aminopeptidásica. Se estudiaron 5 cepas puras de distinta procedencia y 3 cultivos mixtos comerciales. Los medios de diferenciación fueron: leche y medio sólido selectivo; mientras que la producción de células se realizó en leche bufferizada. Una vez recuperadas y concentradas, las células, se estudiaron sus actividades. Los resultados mostraron diferencias de actividad proteolítica y aminopeptidásica entre la variante Prt- y Prt+. Estas diferencias pudieran ser la base para la selección de cepas deseables para el desarrollo del sabor, textura y calidad sensorial de los quesos. En el caso de las cepas mixtas comerciales no se encontró mucha variación en relación a su actividad proteolítica, aminopeptidásica y acidificante. Las observaciones realizadas sugieren que la proporción entre cepas rápidas y lentas en un cultivo mixto debe ser apropiada para que las cepas rápidas suministren los aminoácidos esenciales para el crecimiento de las lentas.

Palabras claves: Fermentos, enzimas, leche, maduración, queso.

ABSTRACT

This paper shows the preliminary results about a model of enzymatic characterization for pure and commercial dairy

starter based on their Prt- and Prt+ character, proteolytic and aminopeptidase activities. Five different pure strains and three mixed commercial cultures were studied. Milk and selective solid media were used as differentiation media; while cell production was done in bufferized milk. Once recovered and concentrated, their activities were studied. The results show differences on proteolytic and aminopeptidase activities between the Prt- and Prt+ variants. These differences found among the parameters may contribute to developing cheese flavor, texture and sensory quality of the cheeses. The commercial mixed strains did not show variation on that proteolytic, aminopeptidase and acidificant activities. The results suggest that the rate between the fasters and slowers strains in a mixed culture should be the appropriate one such so that the fasters strains can supply the essential aminoacids for the growth of the slowers strains.

Key words: Ferments, enzymes, milk, maturity, cheese.

INTRODUCCIÓN

El papel de las enzimas proteolíticas de las bacterias ácido láctico (BAL) no finaliza con el crecimiento celular. Estas enzimas acompañadas de la renina, agregada como coagulante de las enzimas de la leche y de las enzimas de aquellas bacterias no lácticas, continúan actuando durante la maduración de los quesos. En este período, se producen diferentes componentes que intervienen en el proceso, a menudo variando según el tipo de queso que se desea elaborar [15]. Thomas y Pritchard [15] sugieren que el papel principal de las enzimas de los fermentos pudiera ser la degradación lenta de la β -ca-

seña y de los polipéptidos que resultan de la acción de la renina especialmente sobre la α 1-caseína.

Law y Kolstad [8] encontraron que los péptidos amargos tienden a acumularse en los quesos probablemente porque ellos son degradados muy lentamente por las peptidasas de los fermentos, considerando ellos que la velocidad de degradación está muy ligada a la actividad peptidásica de los fermentos, lo cual depende de la cepa y de la velocidad de liberación de las peptidasas de las células lisadas. Recientemente, Chapot-Chartier y col. [1], encontraron que la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 producen quesos no amargos y que esto va acompañado de la lisis de la bacteria.

Law y Kolstad [8] encontraron que las BAL deficientes en proteinasas de la pared celular Prt- presentan actividad peptidásica similar a la de su parental Prt+. Estas cepas lentas Prt- han sido objeto de considerables investigaciones y se han determinado algunas ventajas en la fabricación de quesos. En efecto, reducen potencialmente el desarrollo del sabor amargo de los quesos y presentan reducida sensibilidad a los fagos y a los antibióticos [9].

Este trabajo muestra algunos resultados preliminares sobre la caracterización de cepas puras y comerciales en relación a su carácter Prt- y Prt+, actividad acidificante, proteolítica y aminopeptidásica, para su posible selección y utilización en la elaboración de quesos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Cepas puras: Obtenidas del CITIL *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1287 y 1288. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 469 y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD-27.

Fermentos comerciales: Cultivo puro *Streptococcus lactis* (CH-1); cultivos mixtos: mesófilo homofermentativo OR-704, mesófilo aromático LD-CHN11 y termófilo (yogurt).

Medio de diferenciación: Leche y medio selectivo de acuerdo a Huggins y col. [5].

Curva de crecimiento

Medio de crecimiento: Thomas y Turner [14] idearon un medio agregándole β -glicerofosfato a la leche para permitir el crecimiento celular a una alta densidad (109 UFC/ml) sin que ocurra coagulación del medio.

Medida de la densidad óptica (D.O.) del cultivo: La turbidez del cultivo a 480nm, técnica de Kanasaki y col. [7] fue utilizada para determinar la correspondiente densidad celular (peso seco de bacteria mg/ml) por el método de Thomas y Turner [14].

Recuperación de células

Preparación de la suspensión celular: Las bacterias, al final de la fase logarítmica, se recolectaron por centrifugación y lavadas con buffer β -glicerofosfato 0.05 M, pH 7, en presencia de 20 mM de CaCl_2 . El precipitado se resuspendió al 0.1% de su volumen final en buffer fosfato de sodio 0.1 M, pH 6 y la suspensión celular se almacenó a -20°C [10].

Recuento del número de células viables como UFC/ml: Se sembraron las diluciones entre 10^{-7} y 10^{-9} en Medio M17 de los cultivos al final de su crecimiento y de la suspensión celular.

Caracterización enzimática de las células

Actividad acidificante: 20 ml de leche descremada estéril (10%) fueron inoculados al 1% de la suspensión celular e incubados a $30-32^\circ\text{C}$. La acidez se determinó por titulación con NaOH 0.1 N a las 0 y 6h y se expresó en $^\circ\text{D}$.

Actividad proteolítica: La medida de la actividad proteolítica se realizó a través del método de Hull [4]. La actividad de la enzima se midió en términos de densidad óptica (DO) entre 0 y 6h. Bajo estas condiciones 1 unidad de actividad se mide como un incremento de 0.01 DO en 6h.

Actividad aminopeptidásica: Se llevó a cabo según el método de Desmazeud y Juge [2]. La actividad de la enzima se estimó en unidades de densidad óptica (DO) entre 0 y 60 min. Bajo estas condiciones 1 unidad de actividad se mide como un incremento de 0.1 DO en 1h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros de crecimiento

La TABLA I expresa los diferentes parámetros de crecimiento de las cepas estudiadas. En este sentido, se determinó el carácter Prt+ ó Prt- de cada una de ellas, encontrándose las cepas 1288 y 469 como Prt-.

Las cepas estudiadas mostraron un tiempo de crecimiento en horas, hasta alcanzar pH 5.0, en un rango que varió de 3.0 hasta 7.30 h, correspondiendo tales valores al yogurt y a la cepa 469 respectivamente. Igualmente, se determinó el incremento de la DO a 480 nm detectando un rango de 0.360 hasta 0.530 perteneciendo tales valores a la cepa 1287 y la cepa FD-27 respectivamente. Además, se determinó el número de UFC/ml para el momento de alcanzar pH 5.0 presentó un rango entre 1.8×10^8 para yogurt y 1.8×10^9 para la cepa OR-704. También se estimó el número de UFC/ml de la suspensión celular, observándose un incremento de un orden exponencial en cada uno de los preparados.

Curvas de crecimiento

El crecimiento celular fue estimado como turbidez medida a 480 nm y la variación de acidez del medio como pH, esto

TABLA I

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE LAS DIFERENTES CEPAS ESTUDIADAS

Cepa	Carácter	Crecimiento Tiempo en horas	DO 480 nm	Ufc/ml Cultivo	Ufc/ml Suspensión celular
1287	Prt +	5.3	0.360	6.8x10 ⁸	3.1x10 ⁹
1288	Prt -	5.3	0.370	7.4x10 ⁸	3.8x10 ⁹
469	Prt -	7.3	0.510	1.1x10 ⁹	1.0x10 ¹⁰
FD-27	Prt +	6.3	0.530	1.1x10 ⁹	-
<i>S. lactis</i>	Prt +	6.0	0.430	1.3x10 ⁹	9.3x10 ⁹
Yogurt	Prt +	3.0	0.515	1.8x10 ⁸	7.8x10 ⁸
OR-704	Prt +	6.0	0.475	1.8x10 ⁹	1.7x10 ¹⁰
LD-CHN11	Prt +	6.0	0.400	7.2x10 ⁸	1.2x10 ⁹

1287: *L. lactis* subsp. *lactis*. 1288: *L. lactis* subsp. *lactis*. 469: *L. lactis* subsp. *lactis*. FD.27: *L. lactis* subsp. *cremoris*. Yogurt: Termófilo. OR-704: Mesófilo homofermentativo. LD-CHN11: Mesófilo aromático

se refleja en las FIGS. 1 y 2 (A,B,C,D), observándose que cada una de las cepas presenta una curva de crecimiento característica.

Actividad enzimática de las cepas puras

Los resultados revelaron claras diferencias entre la variante Prt+ y Prt- de las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* 1287 y 1288, detectándose una escasa actividad proteolítica en la variante Prt- bajo las condiciones experimentales señaladas. La variante Prt+ mostró una considerable actividad, donde los valores obtenidos se indican en la TABLA II. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Otto y col. [12], quienes encontraron una alta actividad proteolítica de la variante Prt+ de *S. cremoris* Wg2, siendo negativa la actividad de la variante Prt-. Igualmente, Muset y col. [11] trabajando con *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 763 encontraron en la variante Prt- deficiencia en la actividad proteolítica asociada a la pared celular, mientras que la actividad proteolítica intracelular fue similar a su parental Prt+. Se sugiere que la pérdida de la actividad proteolítica asociada a la pared celular pudiese estar relacionada a la pérdida de un plásmido durante la transición de Prt+ a Prt-; Lo cual no modifica el sistema proteinásico intracelular [11]. Los mismos autores también sugieren que este sistema está codificado por genes cromosomales o por un plásmido diferente.

En relación a la actividad aminopeptidásica, la cepa Prt+ presentó 88% en relación a la cepa mutante Prt- cuando se utilizó leu-pNA como sustrato. Estos resultados corroboran lo mencionado por Kamaly y Marth [6] quienes obtuvieron 81% de la cepa Prt+ con respecto a la cepa mutante Prt-. Estas diferencias sustanciales de la actividad proteolítica y aminopeptidásica entre las cepas Prt+ y Prt- pudiesen ser la base para la selección de cepas deseables que contribuyan al desarrollo del sabor, textura y calidad sensorial de los quesos.

Actividad enzimática de cepas comerciales

En el estudio de la actividad enzimática del Yogurt se observó una elevada actividad enzimática tanto aminopeptidá-

TABLA II

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *L. lactis* SUBSP. *lactis* 1287 Y 1288, EN UNIDADES DE ACTIVIDAD

Sustrato	Cepa 1287 Prt +	Cepa 1288 Prt -
A. Aminopeptidásica (Leu-N-Nitroanilida) (1 Hora)	5.5	6.2
A. Proteolítica (Caseína-Hammersten) (6 Horas)	41	1.8

TABLA III

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CEPAS COMERCIALES

Sustrato	Yogurt <i>S. lactis</i>	OR-704	LD-CHN11	
A. Aminopeptidásica (Leu-N-Nitroanilida) (1 hora)	14.9	4.25	3.48	3.4
A. Proteolítica (Caseína-Hammersten) (6 horas)	12.2	7.0	6.0	6.5
A. Acidificante	-	34.1	41.2	35.9

sica como proteolítica, TABLA III. Esto fue explicado por Shankar y Davies [13] quienes al analizar la actividad enzimática de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* encontraron que éste último presentaba una alta actividad proteolítica, mientras que en *S. thermophilus* observaron alta actividad aminopeptidásica. Este resultado permite explicar que en un cultivo mixto *L. bulgaricus* comienza la hidrólisis inmediatamente para suplir ciertos péptidos y aminoácidos, los cuales estimulan el crecimiento de *S.*

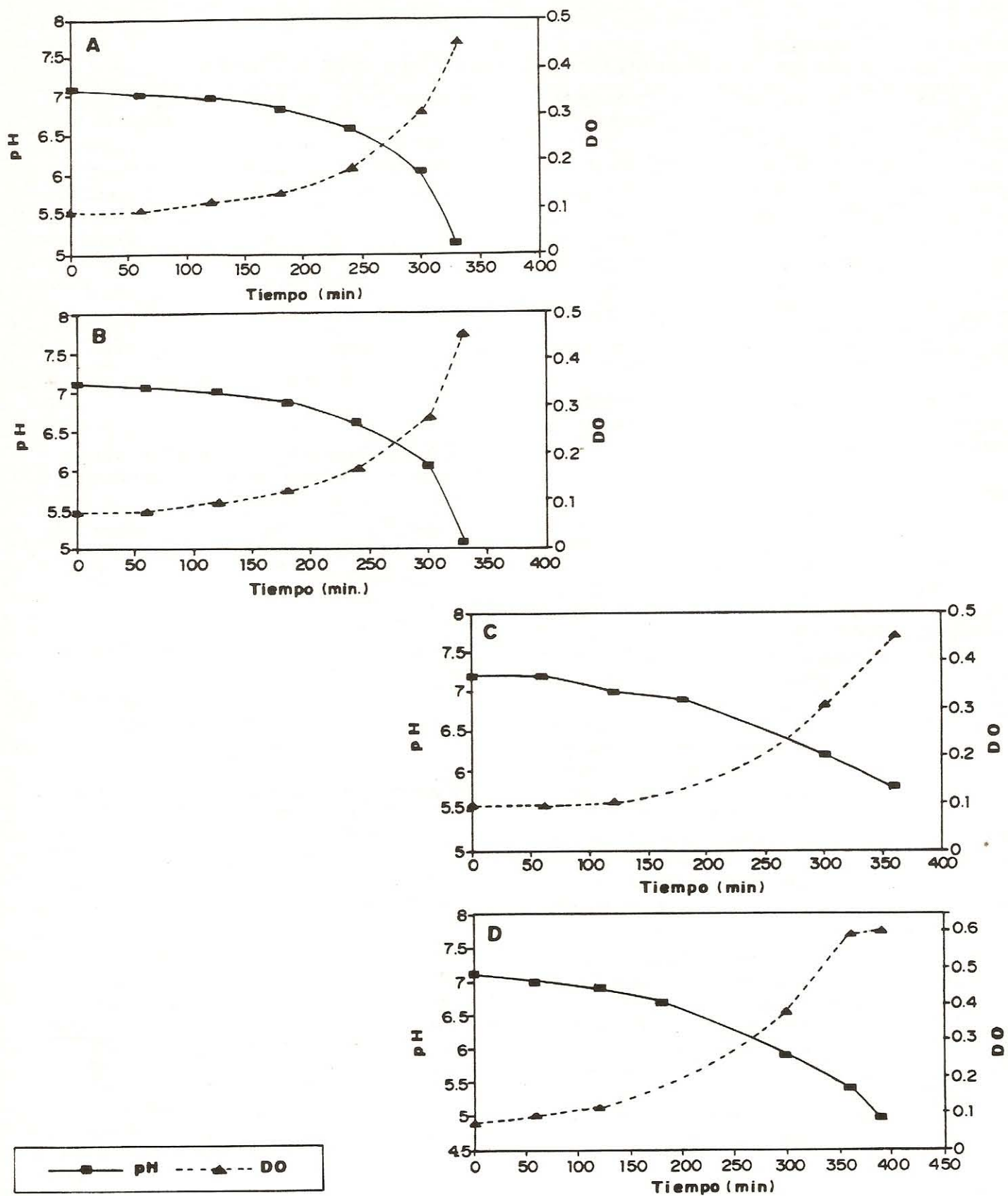


FIGURA 1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PURAS 1287(A), 1288(B), 469(C), FD-27(D).

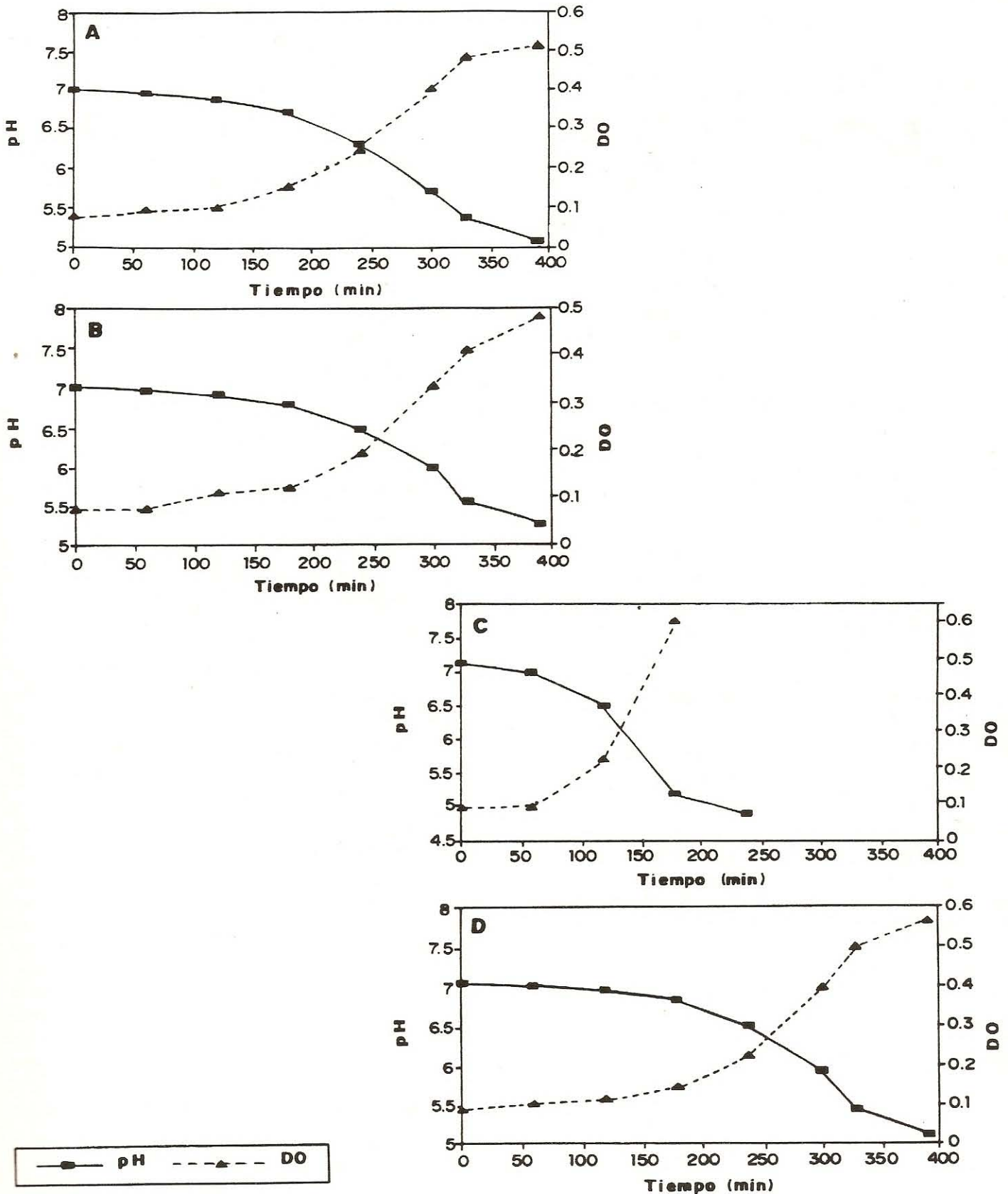


FIGURA 2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS COMERCIALES *S. lactis* (A), LD-CHN11 (B), Yogurt (C), OR-704 (D).

termophilus, siendo ésta especie la responsable de la actividad amiopeptidásica.

En las cepas mixtas OR-704 y LD-CH11 no se encontró mucha variación en relación a sus actividades aminopeptidásicas, proteolíticas y acidificantes. Probablemente esto se deba a que los fermentos mixtos poseen un alto porcentaje de cepas lentas (Prt-). Una confirmación de esto pareciera ser el trabajo de Geis y col. [3] quienes encontraron en cultivos mesófilos entre 20 y 28% de cepas rápidas. Las proporciones entre cepas rápidas y lentas en un cultivo mixto deben ser apropiadas para que las cepas rápidas suministren los aminoácidos esenciales para el crecimiento de las cepas lentas.

Trabajos posteriores nos permitirán conocer la actividad de las enzimas de estas BAL sobre la β -caseína con técnicas de electroforesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Chapot-Chartier, M.P.; Deniel, G.; Rousseau, M.; Vassal, L. and Gripon, J.C. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during Cheese ripening. *Ins. Dairy Journal* 4:251-269. 1994.
- [2] Desmazeud, M.J. and Juge, M. Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidases de *Streptococcus termophilus*. *Le lait* 56:241-260. 1976.
- [3] Geis, A.; Kiefer, B. and Teuber, M. Proteolytic activities of Lactic Acid Streptococci isolated from Dairy Starter Cultures. *Chemi. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 10:93-95. 1986.
- [4] Hull, M.E. Studies of milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hidrolisis of the proteins in milk. *Journal Dairy Science.* 30:881-884. 1947.
- [5] Huggins, A.R. and Sandine, W.E. Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci. In: *Bacterial starter cultures for foods.* Editor Stanley E. Gilliland. C.R.C. Press Inc. Boca Raton. Florida, pp. 16-19. 1979.
- [6] Kamaly, K.M. and Marth, E.H. Proteinase and peptidase activities of cell-free extracts from mutant strains of Lactic Streptococci. *Journal Dairy Science* 71:2349-2357. 1988.
- [7] Kanasaki, M.; Breheny, S.; Hillier, A.J. and Jago, C.R. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria 1. A rapid method for the estimation of bacterial population on milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 30:142-144. 1975.
- [8] LAW, B.A. and Kolstad, J. Proteolysis systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leewenhoeck* 49:225-245. 1983.
- [9] Law, B.A. and Wigmore, A.S. Acelerated ripening of Cheddar cheese with a comercial proteinase and intracelullar enzymes from starter streptococci. *J. Dairy Res.* 50:519-525. 1983.
- [10] Mills, D.E. and Thomas, T.D. Release of cell wall-associated proteinase(s) from lactic streptococci. *New Zeland J. Dairy Sci. Technol.* 13:209-215. 1978.
- [11] Muset, G.; Monnet, V. and Gripon, J.C. Intracellular proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NCDO 763. *Journal of Dairy Research.* 56:765-778. 1989.
- [12] Otto, R.; De Vos, W.M. and Gabrieli, J. Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris* Wg2. Influence of pH on selection in chemostats of a variant lacking of protease plasmid. *Apl. Envirom. Microbiol.* 43:1272-1275.
- [13] Shankar, P.A. and Davies, F.L. Proteinase and peptidase activities of yogurth starter bacteria. XX International Dairy Congress, pp. 467-468. Paris, France. 1978.
- [14] Thomas, T.D. and Turner K.W. Preparation of skim milk to allow harvesting of starter cells from milk culture. *New Zeland J. Dairy Sci. Technol.* 12:15-21. 1977.
- [15] Thomas, T.D. and Pritchard, G.G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FMS. Microbiol. Rev.* 46:245-268. 1987.