

PRODUCCIÓN DE DIACETILO EN LECHE POR CULTIVOS INICIADORES SIMPLES Y MÚLTIPLES

Production of Diacetyl in Milk by Single and Multiple Starter Cultures

Lilibeth Cabrera
Alexis Ferrer
Graciela Ojeda de Rodríguez
Luz Imelda Pérez

Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química
Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela
Teléfono: 061 598062. E-mail: cabrera @solidos.ciens.luz.ve

RESUMEN

Se determinó la producción de diacetilo por parte de once cepas de *Enterococcus faecalis*, siete cepas de *Lactobacillus casei* y cuatro cepas de *Enterobacter aerogenes*, en cultivos simples y múltiples con leche descremada reconstituida al 10% estéril durante 18 h a 35°C. Cada cultivo fue sometido a destilación para recuperar el diacetilo formado. 0,5 ml de o-fenilendiamina y 2 ml de HCL se adicionaron a 10 ml del destilado para obtener valores de absorbancia a 340 nm, en un espectrofotómetro-UV Perkin-Elmer, λ 3 β . Las concentraciones de diacetilo fueron obtenidas de una curva estándar. Los resultados revelaron una mayor producción promedio de diacetilo por todas las cepas en cultivos simples (12,0, 13,2 y 9,4 ppm de *E. faecalis*, *L. casei* y *E. aerogenes*, respectivamente) en comparación con los cultivos múltiples (4,5 ppm). Se observaron diferencias significativas entre cepas de una misma especie ($p < 0,05$). De acuerdo a los resultados, las cepas de *E. faecalis* Ef7 y Ef11, *L. casei* L1, L2 y L3 y *E. aerogenes* Ea1, fueron las que produjeron mayores niveles de diacetilo y podrían ser las cepas más recomendables como constituyentes de cultivos iniciadores simples y múltiples utilizados en la elaboración del queso tipo Palmita con leche pasteurizada.

Palabras clave: Diacetilo, cultivos iniciadores, leche, queso Palmita.

ABSTRACT

Production of diacetyl by eleven strains of *Enterococcus faecalis*, seven strains of *Lactobacillus casei* and four strains of *Enterobacter aerogenes* which are used as starters for the manufacture of Palmita-type cheese, was determined during cultivation for 18 h at 35°C in single and multiple starter cultures on 10% sterile reconstituted skim milk. Each cultured milk was distilled to recover diacetyl and 0.5 ml of o-phenyldiamine and 2 ml of HCl were added to 10 ml of distillate to obtain absorbance values at 340 nm, in a Pelican-Elmer, λ 3 β UV spectrophotometer. Diacetyl concentrations were determined by using a standard curve. Results showed that all the strains produced higher mean concentrations of diacetyl in single cultures (12.0, 13.2 and 9.4 ppm by *E. faecalis*, *L. casei* and *E. aerogenes*, respectively) than with multiple cultures (4.5 ppm). Variations among strains of the same species were noted ($p < 0.05$). According to the results, *E. faecalis* Ef7, Ef10 and Ef11, *L. casei* L1, L2 and L3 and *E. aerogenes* Ea1 were the strains with greatest diacetyl levels and could be the strain most recommended as constituents of single and multiple starter cultures for Palmita -type cheese production with pasteurized milk.

Key word: Diacetyl, starter cultures, milk, Palmita cheese.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años ha aumentado el interés en investigar acerca de compuestos asociados con el sabor producido por cultivos iniciadores lácticos, tales como las dicetonas vecinales [21]. Entre las más importantes tenemos el diacetilo, el cual es producido por numerosas especies lácticas en culti-

vos iniciadores [6, 7, 16, 30, 32], representando un componente esencial del sabor y aroma en muchos productos lácteos fermentados tales como mantequilla, crema agria y ciertos quesos [16, 20, 24, 28, 31]. El diacetilo y sus compuestos derivados (acetoína y 2,3-butanodiol) provienen del metabolismo bacteriano de la glucosa, vía piruvato [19]. En ciertas bacterias ácido-lácticas, el diacetilo además de producirse vía piruvato, hay una fuente adicional como es el citrato [12]. La producción de diacetilo ha sido ampliamente reconocida en especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* [4, 6, 14, 23, 34], *Lactococcus* [29, 33, 37] y *Enterococcus* [15, 22]. En el caso de los enterococos, cultivos iniciadores constituidos por cepas de *E. faecalis* han resultado eficientes para la producción de diacetilo tanto en medios selectivos [14], en leche descremada y en ciertos productos lácteos fermentados [15, 25]. Cepas de *L. casei* también son productoras del diacetilo [6, 14, 32], ocurriendo su máxima producción en su fase logarítmica tardía de crecimiento [6].

Debido a la importancia del conocimiento y control de la cantidad de dicetonas en productos como el queso, se plantea la evaluación de la producción de diacetilo por cepas de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* y *Enterobacter aerogenes*, aisladas de queso tipo Palmita Venezolano, tanto en cultivos simples como múltiples con leche descremada reconstituida, utilizando el método espectrofotométrico-UV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de los cultivos

Once cepas de *E. faecalis* (Ef), siete de *L. casei* (L) y cuatro de *E. aerogenes* (Ea) aisladas de queso tipo Palmita comercial [9, 17], se cultivaron en 12 ml de leche descremada estéril (112°C por 12 min) y reconstituida (LDER, 10% de sólidos totales) e incubadas a 35°C durante 18 h. A partir de estos cultivos "madres" se prepararon los cultivos simples y múltiples por duplicado.

Cultivos iniciadores simples y múltiples

Los cultivos iniciadores simples se prepararon en volúmenes de 100 ml de LDER con 2% v/v de inóculo del cultivo "madre" de cada cepa, e incubados a 35°C durante 18 h. Los cultivos iniciadores múltiples fueron preparados con cepas de *E. faecalis* (Ef7, Ef8, Ef10 y Ef11), *L. casei* (L1, L2 y L3) y *E. aerogenes* (Ea1 y Ea2), seleccionadas en base a una mayor producción de diacetilo en cultivos simples, con la única variante de que las cepas Ef8 y Ef10 fueron incluidas debido a la resistencia frente a antibióticos y a bacteriófagos [8] aun cuando no fueron las mayores productoras de diacetilo. Para estos cultivos se tomaron volúmenes de 100 ml de LDER y se inocularon por duplicado con 2% v/v de *E. faecalis* y *L. casei* e incubados a 35°C durante 90 min. Luego fueron inoculados con cepas de *E. aerogenes* en porcentaje de 0.002% e incubados

a 35°C durante 16 h. Estas condiciones de cultivo corresponden a las utilizadas en la elaboración de queso tipo Palmita con leche pasteurizada [9, 35, 38]. Los cultivos múltiples resultaron constituidos de la siguiente forma:

Cultivos múltiples con *E. faecalis* y *E. aerogenes* (A):

Ef11Ef10Ea1Ea2, Ef11Ef8Ea1Ea2, Ef11Ef7Ea1Ea2, Ef10Ef8Ea1Ea2, Ef10Ef7Ea1Ea2, Ef8Ef7Ea1Ea2.

Cultivos múltiples con *L. casei* y *E. aerogenes* (B):

L1L2Ea1Ea2, L1L3Ea1Ea2, L2L3Ea1Ea2.

Cultivos múltiples con *E. faecalis*, *L. casei* y *E. aerogenes* (C):

Ef11Ef10L1L2Ea1Ea2, Ef11Ef8L1L2Ea1Ea2, Ef11Ef7L1L2Ea1Ea2, Ef10Ef8L1L2Ea1Ea2, Ef10Ef7L1L2Ea1Ea2, Ef8Ef7L1L2Ea1Ea2, Ef11Ef10L1L3Ea1Ea2, Ef11Ef8L1L3Ea1Ea2, Ef11Ef7L1L3Ea1Ea2, Ef10Ef8L1L3Ea1Ea2, Ef10Ef7L1L3Ea1Ea2, Ef8Ef7L1L3Ea1Ea2.

Determinación de diacetilo

Esta prueba se desarrolló siguiendo el método de Alvarez y col. [1], estandarizado para determinar el diacetilo producido por los cultivos en leche. Se hizo una destilación de los cultivos simples y múltiples, colocando 100 ml de los mismos por duplicado, en un balón de destilación de 250 ml, para su posterior destilación, a una temperatura de 90°C por un período de 15 a 20 min, utilizando un baño de glicerol. Cada cultivo fue destilado hasta obtener un volumen de 25 ml en un balón aforado sumergido en hielo. Posteriormente del destilado se pipetearon 10 ml y se colocaron por duplicado en tubos de ensayos mantenidos bajo congelación, con el fin de evitar la evaporación del diacetilo. Luego a cada tubo se le añadió 0.5 ml de una solución de o-fenilendiamina (10 g/L en HCl, 4 mol/L) manteniéndose en oscuridad durante 25 min y adicionándose seguidamente 2 ml de ácido clorhídrico (HCl, 4 M).

Determinación de las concentraciones de diacetilo

A cada muestra tratada con o-fenilendiamina y ácido clorhídrico se le midió su absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, en un espectrofotómetro-UV Perkin Elmer, $\lambda_{3\beta}$, utilizando celdas ópticas de sílica de 10 mm [1]. Las lecturas se hicieron contra un blanco de destilado de LDER sin inocular (con lecturas de 0.021 ppm). La concentración de diacetilo fue obtenida a partir de una curva estándar de diacetilo (Fischer S.C., New Jersey), con patrones de concentraciones desde 1 hasta 16 ppm. La concentración de diacetilo fue calculada multiplicando por un factor de dilución igual a 0.25/1000.

Recuperación de diacetilo

Se llevó a cabo utilizando muestras con o sin un estándar de diacetilo, al que se le aplicaron los procedimientos analíticos ya descritos. El porcentaje de recuperación se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{ppm de diacetilo totales medidos}}{\text{ppm de diacetilo totales calculados}} \times 100,$$

donde los valores de la concentración total de diacetilo medidos se obtiene a través de la siguiente ecuación:

$$\text{ppm de diacetilo totales medidos} = \frac{cd_{it} \times 1000}{Vi_{it}},$$

con el estándar añadido.

Los niveles de diacetilo totales calculados se obtienen sumando los niveles de diacetilo endógeno con los niveles de diacetilo añadido. Los niveles de diacetilo endógeno se calculan utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{ppm de diacetilo endógeno} = \frac{cd_i \times 1000}{Vi_i},$$

determinados con el destilado sin el estándar.

Por último los niveles de diacetilo añadidos se obtienen utilizando la ecuación:

$$\text{ppm de diacetilo añadidos} = \frac{Ce \times 1000}{Vi_i}$$

Las concentraciones promedios obtenidas fueron: cd_i , concentración de diacetilo i en las muestras y cd_{it} , concentración de diacetilo i en muestras con el estándar añadido, ambos en mg de diacetilo en 25 ml del destilado de leche. Vi_i es el volumen de la muestra de leche a destilar (100 ml) y Ce concentración del estándar añadido en mg de diacetilo en 100 ml de leche descremada [18].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los promedios de los valores de diacetilo producidos por los cultivos iniciadores simples y múltiples se le realizó un análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA realizado sobre determinada variable resultó significativo, se les aplicó la prueba de múltiple rango de Duncan, a los promedios de los tratamientos, según el número de los cultivos [40].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de diacetilo en cultivos iniciadores simples

En la FIG. 1 se observa la curva de calibración del diacetilo, la cual muestra un coeficiente de correlación de 0.998. El valor de recuperación en leche descremada fue de 120%, el cual pudo deberse a otros compuestos distintos al diacetilo tales como dicetonas producidas en la biosíntesis de aminoácidos [20] presentes en la leche, que reaccionaron con los reactivos utilizados.

La TABLA I contiene los resultados de las concentraciones de diacetilo producidos por las especies *E. faecalis*, *L. casei* y *E. aerogenes* en cultivos simples. Allí se observa la producción de diacetilo por parte de todas las cepas analizadas. Las cepas Ef7 y Ef11 fueron las que produjeron los mayores

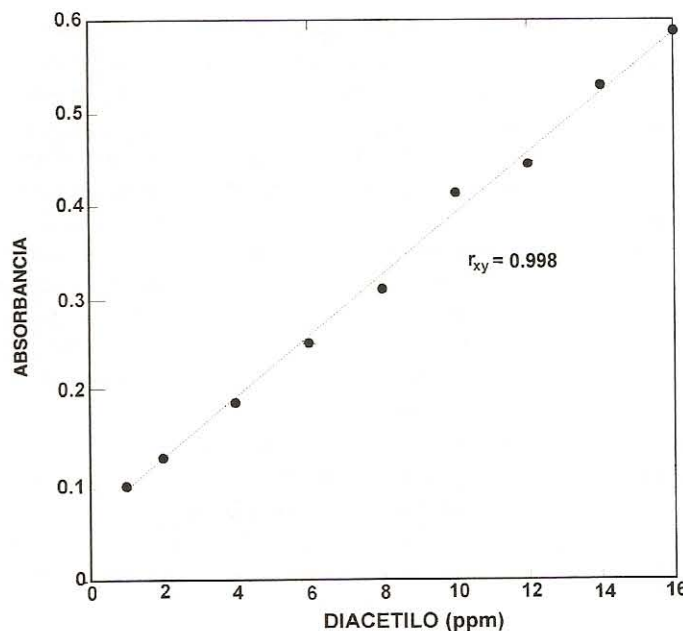


FIGURA 1. VALORES DE ABSORBANCIA (340 nm) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIACETILO EN AGUA DESTILADA.

niveles de diacetilo, 17,5 y 17,2 ppm, respectivamente. Estos resultados son consistentes con estudios que confirman la producción de diacetilo por parte de especies del género *Enterococcus* [14, 24, 26, 27, 36]. El-Gendy y col. [13] y Savoy y col. [39] reportaron la habilidad de *E. faecalis* para producir diacetilo cuando es cultivado en leche descremada. Fayed y col. [16] concluyeron que fermentos constituidos por especies de *E. faecalis*, resultan eficientes en la producción tanto de ácidos como de diacetilo.

Las cepas de *L. casei* también fueron productoras de diacetilo, TABLA I. Hubo una cepa (L3) que produjo 20.5 ppm de diacetilo, valor éste mayor ($p < 0,05$) al encontrado en los cultivos con enterococos. Esta cepa al igual que L1 y L2 fueron las mayores productoras de diacetilo y a la vez fueron las seleccionadas para constituir los cultivos múltiples, no sólo en base a dicha producción de diacetilo, sino a la producción activa de ácidos [9] y a la resistencia a antibióticos como la penicilina y a bacteriófagos [8]. En la literatura se reporta que cepas de *L. casei* muestran diferencias en cuanto a su habilidad para producir diacetilo cuando crecen en leche [2,13, 30], mencionándose valores entre 0,02 y 0,05 ppm [13]. En medios BMG (Extracto de levadura, Oxoid, con 1% de glucosa) y MRS (Man Rogosa y Sharpe, Difco) cepas de *L. casei* han llegado a producir niveles de diacetilo de 8,9 ppm [6] y entre 0,07-4,05 ppm [3], respectivamente. En el presente trabajo las concentraciones obtenidas resultaron más elevadas. Se ha llegado a indicar que la producción de diacetilo por parte de lactobacilos se ve influenciada por condiciones de temperatura y pH. En este sentido, Savoy y col. [39] señalan que cepas de *Lactobacillus* produjeron diacetilo a 30°C y 37°C durante 14 h de incubación. En este trabajo condiciones de 18 h de incubación a 35°C re-

TABLA I
PRODUCCIÓN DE DIACETILO (PPM) POR DIFERENTES CULTIVOS INICIADORES SIMPLES A 35°C
DURANTE 18 HORAS DE INCUBACIÓN

Especie bacteriana	Cepa	Diacetilo (ppm)	DE (\pm)	CV (%)
<i>E. faecalis</i> ssp. <i>faecalis</i>	Ef1	8.7	0.5	5.9
	Ef2	12.6	0.5	3.7
	Ef3	13.2	0.1	1.1
	Ef4	13.5	0.1	1.0
	Ef5	10.8	0.2	2.2
	Ef6	6.3	0.1	1.2
	Ef7	17.5	0.2	1.3
	Ef8	8.6	0.2	2.0
	Ef9	12.8	0.1	1.1
	Ef10	11.1	0.1	0.9
	Ef11	17.2	0.3	2.0
<i>L. casei</i>	L1	15.4	0.3	3.9
	L2	16.5	0.6	2.1
	L3	20.5	0.4	2.0
	L4	9.2	0.2	2.7
	L5	11.1	0.4	3.7
	L6	9.5	0.1	1.4
	L7	10.3	0.2	1.6
<i>E. aerogenes</i>	E1	11.1	0.1	0.9
	E2	9.0	0.6	6.3
	E3	12.9	0.2	1.6
	E4	9.8	0.1	1.2

DE: Desviación Estándar. CV: Coeficiente de Variación.

TABLA II
VALORES PROMEDIOS DE DIACETILO OBTENIDOS EN
CULTIVOS INICIADORES SIMPLES

Cultivos simples	Concentración (ppm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	12.0 ^a
<i>Lactobacillus casei</i>	13.2 ^a
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9.4 ^b

a,b: Coeficientes de Duncan ($\alpha = 0.05$).

sultaron apropiadas para la producción de diacetilo por parte de los lactobacilos.

Los cultivos con *E. aerogenes* resultaron tener promedio de concentraciones de diacetilo más bajas comparado con los enterococos y los lactobacilos, TABLA II. Es poco lo que se reporta acerca de la producción de diacetilo por dichas especies. No obstante, las investigaciones llevadas a cabo por Chuang y Collins [11] y Mellerick y Cogan [34] han destacado la producción de diacetilo por parte del *Enterobacter*. Es de resaltar la importancia del conocimiento de los niveles de diacetilo producidos por las cepas de *E. aerogenes* ya que éstas son las cepas responsables de la presencia de los ojos típicos del queso tipo Palmita venezolano [10].

TABLA III
VALORES PROMEDIOS DE DIACETILO (PPM) OBTENIDOS
EN LOS CULTIVOS INICIADORES MÚLTIPLES

Cultivo	Especies bacterianas	Diacetilo (ppm)
A	<i>E. faecalis</i> y <i>E. aerogenes</i>	4.8 ^{1,a}
B	<i>L. casei</i> y <i>E. aerogenes</i>	3.4 ^{2,b}
C	<i>E. faecalis</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. aerogenes</i>	5.2 ^{3,c}

A: cultivos con las cepas Ef7, Ef8, Ef10, Ef11, E1 y E2. B: cultivos con las cepas L1, L2, L3, E1 y E2. C: cultivos con las cepas Ef7, Ef8, Ef10, Ef11, L1, L2, L3, E1 y E2. 1: Media de 6 cultivos. 2: Media de 3 cultivos. 3: Media de 12 cultivos. a,b,c: Coeficientes de Duncan ($\alpha = 0.05$).

Concentración de diacetilo en cultivos iniciadores múltiples

La TABLA III muestra los niveles de diacetilo encontrados en los cultivos múltiples. Bajas concentraciones de diacetilo fueron obtenidas en estos cultivos en comparación con los cultivos simples, TABLA II, probablemente debido a diferencias en el volumen del inóculo y a las condiciones de incubación entre cultivos simples y múltiples. En el caso de los cultivos tipo A y B con mayores niveles de diacetilo, TABLA I, no mantuvieron esa tendencia, quizás por la presencia de las cepas de *Enterobacter*. El cultivo C, producto de la combinación de las tres especies bacterianas mostró el mismo comporta-

miento de los cultivos A y B. Aun cuando los niveles de diacetilo en cultivos múltiples no fueron elevados, su uso podría representar una mayor seguridad en cuanto al mantenimiento de una actividad metabólica fermentativa deseable, ya que la presencia de cepas de una misma especie combinadas, daría mayor protección contra ciertos agentes inhibidores presentes en la leche tales como antibióticos y bacteriófagos que afectan dicha actividad metabólica por parte de las cepas bacterianas y con esto se podría lograr obtener un queso con las características de sabor y aroma deseables.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados encontrados el diacetilo, como elemento importante en el desarrollo de aroma de diversos tipos de quesos, puede ser producido por enterococos, lactobacilos y las enterobacterias presentes en el queso tipo Palmita. Las cepas de *E. faecalis*, Ef7 y Ef11, de *L. casei*, L1,L2,L3 y de *E. aerogenes*, Ea1, fueron las que produjeron mayores niveles de diacetilo en cultivos simples. Sin embargo, la producción de diacetilo de acuerdo a estos resultados no constituyen un factor determinante en la selección final de las cepas bajo estudio, para la elaboración del queso tipo Palmita.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados de este trabajo, se recomienda evaluar la producción de diacetilo de estas cepas bacterianas en la manufactura del queso tipo Palmita.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES), por el financiamiento que hizo posible la presente investigación, al Laboratorio de Alimentos y al Laboratorio de Espectroscopía del Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, por la contribución con equipos necesarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVAREZ, B.; FERNÁNDEZ, E.; DELGADO, M.; FERRETE, F. Vicinal diketones in beer. Part I: A modified EBC method for the determination of diacetyl and other vicinaldiketones in beer. **J. Inst. Brew.** 95:21-23. 1989.
- [2] BASSETTE, R.; BAWDON, R.; CLAYDON, T. Production of volatile materials in milk by some species of bacteria. **J. Dairy Sci.** 50:167-171. 1967.
- [3] BEDNARSKI, W.; JEDRYCHOWSKI, L.; HAMMOND, E.; NICOLOV, Z. A method for the determination of α -dicarbonyl compounds. **J. Dairy Sci.** 72:2474-4278. 1989.
- [4] BENITO DE C., I.; LEDESMA, O.; PESCE DE RUIZ, A.; OLIVER, G. Effect of lactate on the growth and production of diacetyl and acetoin by lactobacilli. **J. Dairy Sci.** 68:1897-1901. 1985.
- [5] BOTTAZI, V.; DELLAGLIO, F. Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other streptococci. **J. Dairy Sci.** 34:109-113. 1967.
- [6] BRANEN, A.; KEENAN, T. Diacetyl and acetoin production by *Lactobacillus casei*. **Appl. Microbiol.** 22:517-521. 1971.
- [7] BRITO, C. Cultivos lácticos. Su influencia sobre la calidad físico-organoléptica de los quesos. **Aliment.** 15:61-65. 1990.
- [8] CABRERA, L. Producción de acidez, diacetilo y acetaldérido por cultivos iniciadores múltiples en leche. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias. (Tesis de Maestría). Maracaibo, Venezuela. 153 pp. 1994.
- [9] CABRERA, L.; FERRER, A. Contenido de acidez en leche descremada inoculada con cepas de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*. **Rev. Cient. FCV-LUZ.** Vol. VI, Nº 1: 37-43. 1996.
- [10] CABRERA, L.; FERRER, A. Evaluación de cepas de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* como cultivos iniciadores para la elaboración de queso tipo Palmita Venezolano con leche pasteurizada. **Rev. Cient. FCV-LUZ.** Vol IV, Nº 3:73-78. 1994.
- [11] CHUANG, L.; COLLINS, E. Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast. **J. Bacteriol.** 95:2085-2989. 1968.
- [12] DRINAN, D.; SOBIN, S.; COGAN, T. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 31:481-486. 1976.
- [13] EL-GENDY, S.; ABDEL-GALID, H.; SHALIN, Y.; HEGAZI, F. Acetoin and diacetyl production by homo and heterofermentative lactic acid bacteria. **J. Food Prot.** 46:420-425. 1983.
- [14] EL-GENDY, S.; ABDEL-GALID, H.; SHALIN, Y.; HEGAZI, F. Acetoin and diacetyl production by *Lactobacillus casei* subsp *pseudopantarum*. **J. Food Prot.** 46:537-541. 1983.
- [15] EL-SAMRAGY, Y.; FAYED, E.; ALY, A.; HAGRASS, A. Properties of labneh-like product manufactured using *Enterococcus* starter cultures as novel dairy fermentation bacteria. **J. Food Prot.** 51:386-390. 1988.

- [16] FAYED, E.; HAGRASS, A.; ALY, A.; EL-SAMRAGY, Y. Use of enterococci starter culture in the manufacture of a yoghurt-like product. **Cult. Dairy Prod. J.** 24:16-18. 1989.
- [17] FERRER, A.; URDANETA, D.; RINCÓN, Z.; CABRERA, L.; BASANTA, Y. Microflora isolated from Venezuelan "Palmita-type" cheese. **J. Food Prot.** 54:856-860. 1991.
- [18] FERRER, A.; GRANADOS, A. Organic acids of low molecular weight in Palmita-type cheese. **Food Chem.** 45:311-317. 1992.
- [19] GARCÍA, R.; OLEA, M. Determinación espectrofotométrica de diacetilo en vinagre, vino, queso y mantequilla, mediante la formación de diacetilditio-semicarbazona (dDt). **Anal. Brom.** 30:241-246. 1978.
- [20] GARCÍA, R.; GARCÍA, R. Diketonas vecinales en alimentos: Significado, origen y análisis. **Anal. Brom.** 39:291-296. 1987.
- [21] GARG, S.; MITAL, B. Enterococci in milk and milk products. **Crit. Rev. Microbiol.** 18:15-45. 1991.
- [22] GARZA, U.; GONZÁLEZ, E.; CANALES, A.; SIERRA, J. A quality control method for the determination of vecinal diketones and precursors in fermenting wort. **American Soc. Brew. Chem.** 40:15-17. 1982.
- [23] GIBSON, T.; PARKER, S.; WOOD, J. Purification and characterization of diacetyl reductase from chicken liver and *Streptococcus lactis* and enzymic determination of diacetyl and diketones. **Enz. Microbiol. Technol.** 12:171-178. 1991.
- [24] G'OSHEVA, B.; STEFANOVA, M.; BANKOVA, N.; DEDOVA, P. Taste and aroma of white brined cheese. **Khanitelna Promishlenost** 40:15-16. 1991.
- [25] HAGRASS, A.; FAYED, E.; ALY, A.; EL-SAMRAGY, Y. Growth characteristics of enterococci isolated from laban rayeb. **Nahrung** 35:209-213. 1991.
- [26] JAY, J. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 44:525-532. 1982.
- [27] JENSEN, J. Role of enterococci in Cheddar cheese, proteolytic activity and lactic acid development. **J. Milk Food Technol.** 38:3-7. 1975.
- [28] JOENSSON, F.; PETTERSON, H. Aroma formation lactic starter cultures. **Nord. Mejeric.** 4:245-247. 1977.
- [29] JUNI, E. Mechanisms of formation of acetoin. by bacteria. **J. Biol. Chem.** 195:715-726. 1952.
- [30] KANEKO, T.; WATANABE, Y.; SUZUKY, H. Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth. **J. Dairy Sci.** 73:291-298. 1990.
- [31] KOSIKOWSKI, F. Cheese and fermented milk foods In: F. Kosikowski (ed). **Cultures and starters.** Kosikowski & Associate:16-26. New York, U.S.A. 1987.
- [32] LEE, W. Production of diacetyl (2,3-butanedione) by continuous fermentation with simultaneous product separation. **Dessert. Abst. Internat.** 52:3738. 1992.
- [33] LIBUDZISZ, Z.; GALEWSKA, E. Citrate metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetyllactis* strains. **Nahrung** 35:611-618. 1991.
- [34] MELLERICK, D.; COGAN, T. Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lactis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. **J. Dairy Res.** 48:497-502. 1981.
- [35] MONTOYA, C.; FERRER, A. Transformaciones producidas por bacterias durante la manufactura del queso tipo Palmita. **Rev. Tec. Ing. LUZ** 12:69-74. 1989.
- [36] OHHIRA, I.; JUNG, C.; MIYAMOTO, T.; KATAOKA, K. Biochemical properties of lactic acid bacteria from traditional fermented foods in Southeast Asia. **Japanese J. Dairy Food Sci.** 39:115-121. 1990.
- [37] PACK, M.; SANDINE, W.; ELLIKE, P.; DAY, E.; LINDSAY, R. Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed-strain starters. **J. Dairy Sci.** 47:981-986. 1964.
- [38] RAFFE, D. Análisis cromatográfico del perfil de ácidos orgánicos de cadena corta en quesos tipo Palmita elaborados con leche pasteurizada. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias. (Tesis de Grado). Maracaibo, Venezuela. 82 pp. 1994.
- [39] SAVOY, G.; FONT, G.; RUIZ, A.; OLIVER, G. Effect of pH and temperature on diacetyl production by lactic acid bacteria. **Milchwissenschaft** 41:80-81. 1986.
- [40] SNEDECOR, G.; COCHRAN, W. **Statistical methods.** 6 Ed. Iowa State University Press. Iowa, U.S.A. 1974.