

Lipólisis de quesos de oveja del noroeste argentino por *Enterococcus faecium*

Katz M.², Medina R.^{1,2}, Giraud C.³, Rodriguez M.A.³, Gatti P.³, González S.^{1,2}

¹Facultad de Bioquímica, Universidad Nacional de Tucumán ²Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco 145 (4.000) Tucumán. ³INTI-LACTEOS-Bs.As.Argentina

Introducción

La lipólisis es un importante evento bioquímico que ocurre durante el proceso de maduración de los quesos. Ha sido muy estudiada en quesos azules y quesos de pasta dura italianos donde la lipólisis alcanza altos niveles y es el principal camino metabólico que contribuye al "flavor" de estos quesos por liberación de ácidos grasos libres (AGL). Las bacterias lácticas, las cuales representan la flora predominante de muchos quesos, poseen sistemas enzimáticos capaces de hidrolizar los lípidos (Fig.1) La especie más frecuentemente aislada de quesos de leche de oveja artesanales del noroeste argentino fue *E. faecium* (Medina y col 2000). La contribución de enterococos en el desarrollo de un flavor aceptable o no es poco conocido.

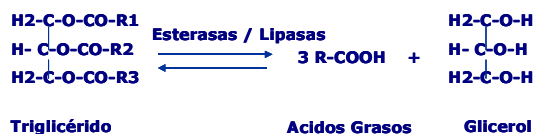


Figura N° 1: Hidrólisis de triglicéridos por Esterasas-Lipasas

El objetivo fue evaluar la contribución de cepas *E. faecium* a la lipólisis de quesos de leche de oveja. Nosotros seguimos la lipólisis durante la maduración de mini-quesos por cuantificación de ácidos grasos libres y análisis de actividades esterasa-lipasas. **Materiales y Métodos**

Microorganismos y Medios de cultivos:

Enterococcus faecium O214 y O227 fueron cultivados en MRS

Determinación de AGL por cromatografía gaseosa

Obtención de extractos libres de célula: Las células fueron cosechadas a las 16 h por centrifugación a 10,000 X g for 10 min at 4°C. Los pellets fueron lavados dos veces con buffer fosfato de sodio 50 mM y resuspendidos al 40% p/v en el mismo buffer. La células fueron rotas en Prensa French. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación (20000 X g por 30 min) a 4°C. Los extractos libres de células fueron utilizados para los ensayos de actividades enzimáticas.

Determinación de actividad esterasa

Detección Post-electroforética empleando a-naftil derivados de ácidos grasos como sustratos(3) La actividad fue identificada por la formación de bandas rojas sobre el gel.(Medina, y col.2004a)

Método cuantitativo empleando a- y b-naftil derivados de ácidos grasos de C2 a C12 (4). 1U Actividad Esterasa: cantidad de enzima que libera 1 µmol de a- o b-naftol por minuto. Actividad específica: unidades/mg de proteínas.(Medina y col., 2004b)

Determinación de Proteínas: Se empleó el método de Bradford.

Fabricación de miniquesos bajo condiciones microbiológicas controladas:

Los quesos fueron preparados con leche de oveja pasteurizada según la metodología de Hynes y col., 2000 . El cuajo empleado es de *Kluyveromyces lactis*. Los quesos fueron fabricados con dos cepas: *E. faecium* O227 (Queso A), *E. faecium* O214

(Queso **B**) y con la asociación de las dos cepas (Queso **C**).

Resultados y Discusión

Al comienzo de la maduración, el queso A presentó 1,40 g / Kg de ácidos grasos libres totales (AGLT), los cuales incrementaron 1,2 veces a los 30 días de maduración. (Fig. N° 2) En el queso B los AGLT incrementaron 1,56 veces y en el queso C 4,41 veces (6,46 g / Kg) al final de la maduración (Fig. N° 2). Durante la maduración la relación de AGL de cadena larga (Fig. N° 3) disminuyeron en el queso A y B a los 30 días de maduración, en el Queso C aumentó de 82,7 a 83,43%. La relación de los AGL de cadena corta incrementó a 6,2%, 9,72 y 7,12 % en los quesos A, B y C, respectivamente.

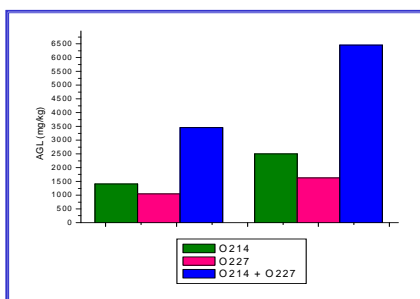


Figura N° 2: Evolución de ácidos grasos libres totales en quesos de oveja durante la maduración a 12°C

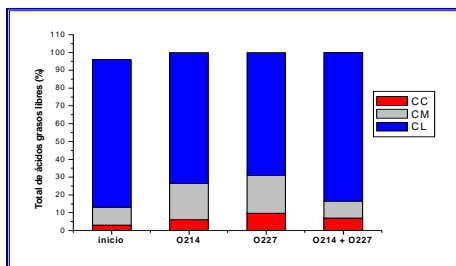


Figura N° 3: Evolución de la relación de ácidos grasos libres de cadena corta (C4-C8: CC), de cadena media (C10-C14: CM) y de cadena larga (C16-C18: CL) en quesos de oveja elaborados con *E. faecium* O214 y O227, durante 30 días de maduración a 12°C

Los AGL de cadena media incrementaron 2 veces en los quesos A y B, y disminuyeron aproximadamente 2 veces en el Queso C. Las actividades específicas de esterasa y lipasas mostraron que *E. faecium* O214 y *E. faecium* O227 presentan 3 esterasas, con diferentes Rf, que liberan AG de cadena corta (Figura 4).

La tabla N° 1 muestra la actividad específica (U/mg) para O214 y O227. Ambas cepas liberaron ácidos grasos de cadena corta, principales responsables del sabor picante de los quesos.

No se observaron actividades con derivados de ácidos grasos de cadena larga.

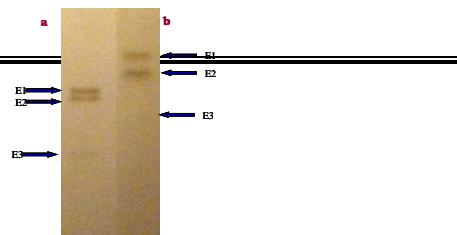


Figura 4: Perfil de esterasas de *E. faecium* O214(a) y *E. faecium* O227 (b) (Sustrato: α -naftil propionato)

Tabla 1: Actividad Específica de esterasa-lipasa en extractos libres de células

Conclusiones

Nuestros resultados mostraron:

CEPAS	α -NAFTIL-DERIVADOS DE ACIDO GRASOS			
	PROPIONATO	BUTIRATO	CAPROATO	CAPRILATO
O214	2,60 \pm 1,44	0,21 \pm 0,02	2,21 \pm 0,26	N.D.
O227	1,31 \pm 0,14	0,75 \pm 0,35	0,77 \pm 0,15	1,12 \pm 0,03

Diferentes perfiles de AGL en los distintos quesos elaborados con las cepas de *E. faecium*

El contenido de AGL depende de la actividad esterasa de las cepas.

La concentración de AGL incremento en presencia de las dos cepas contribuyendo a la lipólisis de los quesos de leche de oveja.

Referencias

- [1]Hynes, E., Ogier, J.C, Delacroix-Buchet, A. Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. International Dairy Journal (2000) 10:733-737.
- [2]Medina, R., Katz, M; González, S; Oliver, G, Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and artisanal cheese from argentine northwest. Journal of Food Protection (2001) Vol. 64 N° 4, 559-563.
- [3]Medina, R. Katz, M., González, S. and Oliver, G. Methods to determine esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria. Methods in Molecular Biology, Vol268: Public Health Microbiology: Methods and Protocols. Capítulo 42, pag. 437- 441. Humana Press. (2004a)
- [4]Medina, R. Katz, M. and González, S. Differentiation of lactic acid bacteria strains by post-electrophoretic detection of esterasas. Methods in Molecular Biology, Vol268: Public Health Microbiology: Methods and Protocols. Capítulo 43, pag. 443- 448. Humana Press. (2004b) Para mayor información contactarse con: M. Alejandra Rodríguez - alerod@inti.gov.ar