

***Lactobacillus helveticus* CNRZ 32: ATENUACIÓN Y PROPIEDADES ENZIMÁTICAS PARA USAR EN QUESOS COMO CULTIVO ADJUNTO**

Carmen Brito C., Sandra Bock S., Renate Schöbitz T., Mariela Horzella R. y Luz Haydeé Molina C.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Casilla 47. Valdivia. Chile. cbrito@uach.cl.

ABSTRACT

***Lactobacillus helveticus* CNRZ 32: Attenuation and enzymatic properties for use as a secondary culture to produce cheese.**

Key words: *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, attenuation, enzymatic properties.

The viability and enzymatic behaviour (proteolytic, lipolytic and glycolytic) of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 treated at high and low temperatures were studied. The treatments were carried out with the aim of reducing its glycolytic capacity while maintaining its proteolytic and lipolytic enzyme characteristics. These characteristics are necessary for it to be potentially used as a secondary culture to accelerate cheese ripening. The culture was attenuated at 68°C for 18 s (A) or at -18°C x 24 h (B), and the culture viability and remaining enzymatic capacity for proteolysis, lipolysis and glycolysis in milk were compared with those of the untreated culture.

The high heat treatment of the culture achieved the best relationship between reducing the strain glycolytic capacity while maintaining the proteolytic and glycolytic capacities. The culture *L. helveticus* CNRZ 32 following treatment appears to be a good potential secondary culture to accelerate the cheese ripening process.

RESUMEN

Palabras claves: *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, atenuación, propiedades enzimáticas.

Se estudió el comportamiento en viabilidad y capacidades enzimáticas (proteolíticas, lipolíticas y glicolíticas) de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, sometido a tratamientos de alta y baja temperatura. Ambos tratamientos se realizaron para reducir su capacidad glicolítica con el fin de conocer su potencial uso, como cultivo adjunto, que agregue complejos enzimáticos requeridos para acelerar la maduración de quesos. El cultivo fue atenuado a 68°C x 18 s (A) y a -18°C x 24 h (B), luego de lo cual se midió: viabilidad del cultivo y actividad enzimáticas remanentes a) proteásica, b) lipásica y c) glicolítica en leche, lo que se comparó con la cepa sin atenuar (SA). El tratamiento térmico alto de atenuación logró el mejor balance entre disminuir la capacidad glicolítica de la cepa y mantener las capacidades enzimáticas proteolíticas y lipolíticas, teniendo como resultado un interesante potencial de uso del *L. helveticus* CNRZ 32, atenuado (como cultivo adjunto) en aceleración de maduración de quesos.

INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia económica de la maduración del queso, actualmente se está intensificando la búsqueda de implementación de metodologías destinadas a la aceleración de dicho proceso.

El empleo de microorganismos adicionales para acelerar la maduración, permite añadir al queso un sistema enzimático completo y equilibrado, que por encontrarse en el interior de las células quedará retenido en la matriz del producto, tras la lisis celular. Sin embargo, la adición de cultivos adjuntos específicos, que aumentan las concentraciones de células viables a niveles superiores a las normales, puede conducir a una fermentación anormalmente rápida durante el proceso. Consecuentemente es necesario lograr que las células añadidas en forma adicional al cultivo tradicional (estárter), no presenten alta actividad glicolítica hasta que la lactosa haya sido consumida en forma regular por el cultivo estárter de la variedad (McSweeney, 2004; McSweeney & Fox; 2004, Upadhyay, *et al.*, 2004).

Diversos autores, han experimentado agregando cepas de cultivos atenuados específicos (adjuntos), en diferentes variedades de quesos, particularmente en la elaboración de tipos de reducida grasa y los elaborados a partir de leche ultrafiltrada, con el objetivo de realzar el sabor o para reducir el amargor que suele presentarse en éstos (Johnson, 2003, Collins, *et al.*, 2004; Castañeda, *et al.*, 1990; Callagan & Roos, 2004).

La literatura señala que los cultivos lácticos y su balance de enzimas pueden ser modificados mediante tratamientos de atenuación, producto de lo cual las propiedades de degradación proteolítica requeridas para acelerar la maduración, no se ven afectadas en forma importante, disminuyendo en cambio su capacidad de formar ácido, lo que permite evitar interferencias en el proceso normal de producción de quesos. Entre las metodologías de atenuación que se han intentado para la modificación de la actividad bioquímica de los cultivos lácticos, se encuentran: tratamiento térmico alto, tratamiento térmico bajo, uso de

solventes orgánicos, entre otros (Cogan, 2003; El Soda, 2003, Fox, 2003, Rattray, 2003; Chamba, 2004, Parente & Cogan, 2004).

El objetivo general de este estudio fue conocer el comportamiento de la cepa *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, en cuanto a su viabilidad y capacidad enzimática en leche, posterior a ser sometida a procesos de atenuación alto y bajo, con el fin de visualizar su potencial uso en aceleración de maduración de quesos chilenos.

MATERIAL Y MÉTODO

Cepa y métodos de atenuación.

La cepa láctica termófila *L. helveticus* CNRZ 32, procedente del Centre Nationale de Recherche Zootechnique, (Jouy - en - Josas, Francia), fue activada desde su estado liofilizado, en tubos con 5 mL de leche en polvo descremada (reconstituída al 10% de sólidos totales) y esterilizada por tinalización en frascos estériles, a 85°C por 30 min y mantenido a 37°C x 24 h en estufa de incubación termorregulada. Luego se propagó dos veces al 2% en 10 mL de LPD, y se incubó a 37°C x 12 h, posteriormente se procedió a refrigerarla por un máximo de dos semanas, para finalmente someterla a los tratamientos de atenuación alto y bajo, como medio de incubación se utilizó leche en polvo descremada.

Tratamiento térmico Alto (A): El tubo con 10 mL de LPD conteniendo la cepa se sometió a temperaturas de 68°C x 18 s, elevando rápidamente la temperatura (1,2 a 1,8 min) por inmersión del tubo en agua hirviendo. Al alcanzar 68°C, se transfirieron a un baño regulado a 68°C y se mantuvieron por 18 s, luego el tubo se sumergió en un baño de agua con hielo bajando rápidamente la temperatura (30 a 36 s), (Frey *et al.*, 1986).

Tratamiento térmico bajo (B): El tubo con 10 mL de LPD conteniendo la cepa, se depositó en la cámara congeladora de un refrigerador (-18°C), se mantuvo a -18°C por 24 h y se descongeló sumergiéndolo en un baño termorregulado a 40°C (Aly, 1990).

El estudio de atenuación de la cepa de *L. helveticus* CNRZ 32 se realizó en dos etapas.

Primera etapa del estudio: su objetivo fue controlar los efectos de la atenuación sobre la viabilidad de la cepa y las actividades enzimáticas glicolítica, lipolítica y proteásica, en leche.

Los parámetros de control de la cepa recién atenuada y las metodologías aplicadas en esta etapa del estudio, fueron las siguientes:

* **Actividad proteásica:** Método de LINDEN *et al.*, modificado por Romero y Olano, 1993.

* **Actividad lipásica:** Metodología de Sigma lipase substrate.

* **Porcentaje de atenuación:** Recuento de *L. helveticus*. FIL-IDF 149: 1991.

* **Actividad de enzimas glicolíticas:** Método de El Abboudi *et al.*, (1991), determinación de pH al cabo de 8 h de incubación a 37°C a partir de leche a pH 6,4.

* **Determinación de pH** según NCh 1671. Of 79. (Chile, 1979).

Segunda etapa: su finalidad fue comparar las características de funcionalidad enzimática durante un período de tiempo en diferentes condiciones de manejo (pH y temperatura) de la cepa previamente atenuada por los tratamientos térmicos alto y bajo, frente a un control sin atenuar. Para ello la cepa atenuada fue inoculada en leche en polvo entera e incubada bajo diferentes condiciones de temperatura y pH. Se realizaron determinaciones enzimáticas a las 8 h de incubación que permitieron conocer su capacidad proteolítica, lipolítica y glicolítica en leche, tanto en las condiciones óptimas de acción del microorganismo como en otras más drásticas, semejantes a las condiciones de maduración de quesos, donde se pretende aplicarlos posteriormente.

Para el estudio de atenuación el cultivo se incubó por 14,5 h a 37°C, donde alcanzó un crecimiento entre 8×10^8 y 1×10^9 UFC/mL, luego de lo cual se agregó a tres tubos de 10mL cada uno, para someterlos a los tratamientos alto, bajo y un testigo de la cepa sin atenuar denominadas A, B y SA respectivamente.

La evolución de las propiedades enzimáticas se estudió al cumplirse 8 h bajo diferentes condiciones constantes de incubación: temperaturas de 35 y 25 °C y pH de 5,2; 5,4 y 6,4.

Condiciones de evaluación del comportamiento de los cultivos atenuados en la segunda etapa.

Temperatura: T₁ fue cercana a la óptima de desarrollo de *L. helveticus*, que corresponde a 35°C y a las condiciones del procesamiento del queso y, T₂, fue de 25°C, que, aunque no siendo óptima en relación a la temperatura de desarrollo de la bacteria, permite estudiar su comportamiento a condiciones un poco más cercanas a etapas posteriores a la elaboración de quesos: postpresado, enfriamiento y maduración (Oliviera & Brito, 2006).

pH: Se usó, pH₁: 5,2, similar al pH normal del queso a su entrada a maduración; pH₂: 5,4; correspondiente al pH normal al término de maduración de quesos semiduros como el Chanco (NCh 2090 Of1999) y pH₃: 6,4; pH normal de la leche, a modo de tratamiento testigo. Dichos valores se encuentran en rangos de pH cercanos al desarrollo de esta cepa aunque su óptimo es de pH 5,85 (Castañeda *et al.*, 1990).

Metodología aplicada en la segunda etapa:

* **Proteólisis:** Método TNBS, método de Fields, modificado por Spadaro, descrito por McKellar (1981).

* **Lipólisis:** Método de Frankel y Tarassuk modificado en el procedimiento de extracción por Pillay *et al.* (1980).

* **pH:** Método potenciométrico NCh 1671. Of 1979. (Chile, 1999)

En ambas etapas, se hicieron tres repeticiones de cada tratamiento y las muestras fueron analizadas en duplicado.

Análisis estadístico.

Primera etapa: se realizó un análisis de varianza simple. En el caso de existir diferencias significativas ($P \leq 0,05$) se procedió a aplicar el Test de Rango múltiple de Tukey HSD al 95% de confianza para observar diferencias entre tratamientos.

El diseño experimental de la primera etapa corresponde a un diseño en bloques de una variable estudiada en tres niveles.

Segunda etapa, el diseño experimental corresponde a un diseño en bloques de tres variables estudiadas, que corresponden a:

tratamiento alto, tratamiento bajo de atenuación y testigo (cepa sin atenuar).

Los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Varianza Multifactorial de tres vías y Análisis de Regresión Lineal sobre cada una de las respuestas estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera Etapa del estudio: Viabilidad y actividad enzimática relativa del *L. helveticus* CNRZ32 atenuado por tratamientos alto y bajo, respecto al cultivo sin atenuar.

En Figura 1, se observa que la viabilidad bacteriana en los tratamientos Alto (A) y Bajo (B) es menor al control sin atenuar (SA), cuyo análisis de varianza presenta diferencias significativas ($p=0,0004$).

De acuerdo al Test de Tukey, los tratamientos con atenuación obtuvieron un 73,4% de mortalidad para el tratamiento A y un 82,5% para el tratamiento B, siendo estadísticamente similares entre ellos. Frey *et al.*, (1986), obtuvieron resultados semejantes con respecto al tratamiento alto de atenuación (69°C/15 s), con una reducción de viabilidad del 65%, además, fue similar a lo obtenido por Johnson, *et al.*,

(1995), quienes reportaron una reducción de un 85% en la viabilidad de células tratadas por secado spray a 80°C.

A pesar que no se presentaron diferencias significativas respecto a la viabilidad entre los tratamientos Alto y Bajo, en la actividad proteásica se observó una reducción de sólo un 27.2% en el tratamiento Alto frente al testigo (SA), la que resulta significativamente menor al tratamiento de atenuación bajo, que alcanzó pérdidas en su actividad proteásica de un 55.1%. Las diferencias entre tratamientos concuerdan también con los resultados obtenidos por Frey *et al.*, (1986), respecto a la actividad dipeptidásica de *L. helveticus* sometido a un tratamiento de 69°C/15 s, y a congelación a -20°C por una semana, cuyos resultados en actividad dipeptidásica fue significativamente menor en este último respecto a la obtenida por la cepa atenuada a altas temperaturas, la que resultó similar al control.

Con respecto a la actividad lipásica de los cultivos, se observa que existen diferencias entre tratamientos ($p=0,0002$). Así, el cultivo sometido a -18°C/24 h presenta una reducción menor en la actividad lipásica, correspondiente a un 39.8%, mientras que el tratamiento térmico alto la redujo en un 75,6%.

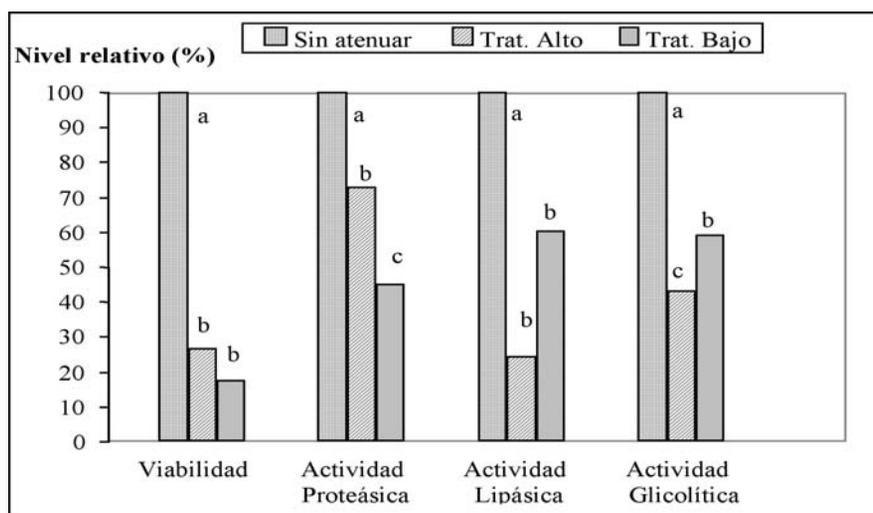


Figura 1. Viabilidad, actividad proteásica, lipásica y glicolítica en leche, del *L. helveticus* CNRZ 32 atenuado por tratamiento térmico Alto, Bajo y sin atenuar.

Figure 1. Viability, proteolytic, lipolytic and glycolytic activity in milk of *L. helveticus* CNRZ 32 under high and low attenuated heat treatment and untreated culture.

En la actividad glicolítica de la cepa, se observan diferencias significativas entre los tres tratamientos, con un valor $p=0,0000$. De acuerdo a los resultados del Test de Tukey, los tratamientos produjeron una disminución significativa de la actividad glicolítica frente al control, con una reducción de un 57% para la cepa sometida a tratamiento Alto, frente al tratamiento térmico Bajo que sólo tuvo un 40,9% de reducción.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo estudiado por Frey *et al.*, (1986), sobre la actividad β -galactosidásica de *L. helveticus* CNRZ 32, quienes señalan que el calentamiento redujo considerablemente la actividad, mientras que el enfriamiento a -20°C no causó pérdidas importantes de ésta.

Segunda Etapa del Estudio: Capacidad proteolítica, lipolítica y glicolítica del *Lb. helveticus* CNRZ32 atenuado y sin atenuar, incubados bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, cercanas a las condiciones normales de procesamiento de quesos.

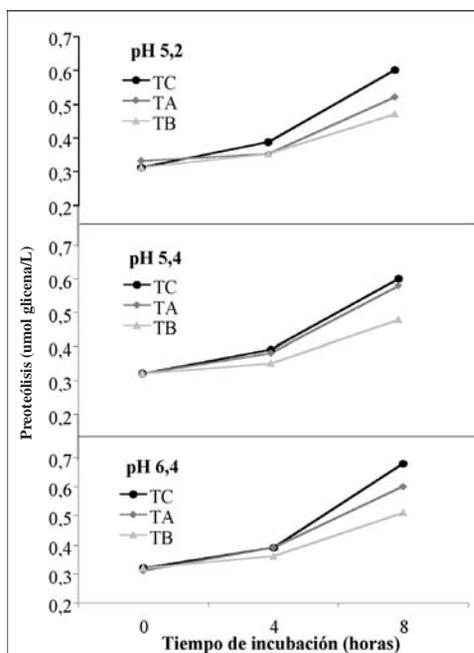


Figura 2. Actividad glicolítica, lipolítica y proteolítica de *L. helveticus* CNRZ 32 atenuado y sin atenuar, en leche a 25 y 35°C .

Figure 2. Proteolytic, lipolytic and glycolytic activity of attenuated *L. helveticus* CNRZ 32 and untreated culture in milk at 25 and 35°C

Evolución de la proteólisis. En la Figura 2, se observa el grado de proteólisis de los tres tratamientos (8 h de incubación), donde existen diferencias significativas con un valor de $p=0,0160$ en la interacción ABC, siendo significativo el efecto combinado de pH inicial, temperatura de incubación y tratamiento de atenuación sobre la proteólisis desarrollada.

Los resultados obtenidos en esta etapa coinciden con los de la etapa I, en que el mayor grado de proteólisis es desarrollado por el tratamiento control seguido del tratamiento A (Alto) y por último el tratamiento B (Bajo), todos significativamente diferentes entre sí, como se dio en el gráfico de interacción.

De acuerdo al Análisis de Regresión Múltiple, existe un efecto significativo del P.D. inicial sobre el grado de proteólisis desarrollado después de la incubación, siendo este mayor a medida que el pH de ajuste del medio de incubación se acerca al valor neutro. Sin embargo es muy significativo el efecto de la temperatura de incubación siendo notablemente mayor el grado de proteólisis cuando se incuba a 35°C que a 25°C , (Fig. 3) esto se debe a que esta temperatura es más cercana

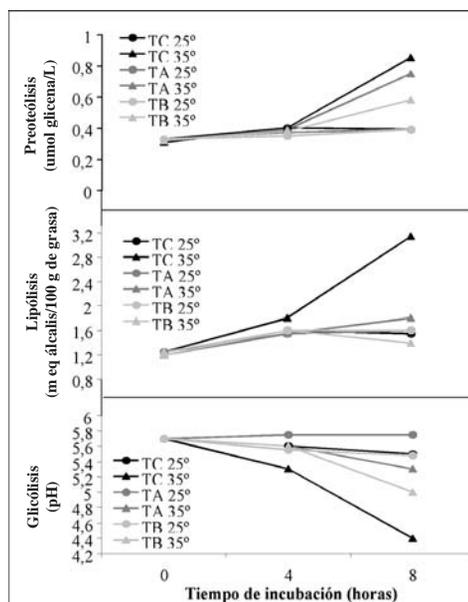


Figura 3. Proteólisis producida por *L. helveticus* CNRZ 32 atenuado por tratamiento térmico alto y bajo y cepa sin atenuar, en leche a pH de 5.2, 5.4 y 6.4 en un período de 8 hrs.

Figure 3. Proteolysis produced by *L. helveticus* CNRZ 32 attenuated with high and low heat treatment and the culture without treatment in milk at pH 5.2, 5.4 and 6.4 during 8 hrs.

a la óptima de crecimiento de *L. helveticus* y de la producción de enzimas proteolíticas por la propia cepa. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Ezzat *et al.*, (1982), quienes determinaron que el máximo de actividad enzimática fue desarrollado a un pH 6.0 de incubación. En general, estudios realizados con enzimas proteolíticas de *L. helveticus* han determinado que presentan su máxima acción en valores de pH cercanos al neutro y a temperaturas elevadas, las que se aproximan a las óptimas de su desarrollo.

Se observa que existe una tendencia al incremento de la lipólisis a lo largo de la incubación, que es progresiva en el tiempo para los tres niveles de atenuación. De acuerdo al Análisis de Regresión, la acción conjunta de los factores tiempo - temperatura de incubación, explican el desarrollo de la lipólisis en un 61,7% para el tratamiento control, en 61,8% para el tratamiento A y en 58,1% para B ($r^2= 0,617, 0,618$ y $0,581$, respectivamente) los restantes

porcentajes se deberían a otros factores, como por ejemplo nivel de organismos viables.

Si bien la proteólisis desarrollada a 35°C es considerablemente mayor, esta también evoluciona bien a la temperatura menor estudiada (25°C), en consecuencia se visualizan buenas perspectivas de obtener los efectos buscados en la maduración de quesos al aplicar estas cepas en su producción. Además, durante la elaboración se alcanzaron temperaturas cercanas a la óptima de desarrollo de esta cepa desde la etapa de premaduración de leche y durante todo el tratamiento en tina en el procesamiento de quesos duros y semiduros tales como los quesos chilenos Chanco y Gauda (Oliveira & Brito, 2006).

La intensificación y profundización de los cambios bioquímicos degradativos, como la lipólisis, obtenidos al adicionar cultivos atenuados, permite lograr una maduración más rápida y realzar propiedades organolépticas en quesos, tales como sabores, textura, etc. En consecuencia algunos autores han probado distintas cepas, previamente atenuadas por congelación, en el procesamiento de diversas variedades de quesos (Spangler *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 1994), también se han estudiado cepas atenuadas por calor, (Castañeda, *et al.*, 1990; Skeie *et al.*, 1995; Drake *et al.*, 1996; 1997; Fox, 2003; Callagan & Roos, 2004) reportando generalmente resultados promisorios por ambos tratamientos.

En este estudio, realizado en leche, se obtuvo un elevado contenido de nitrógeno aminoacídico al agregar la cepa de *L. helveticus* CNRZ32 junto al cultivo iniciador, similar situación fue reportada por Drake *et al.* (1996), así mismo, se observó, tanto en éste como en otros estudios, que hay problemas derivados de la alta actividad glicolítica al agregarlo sin atenuar (Callagan & Roos, 2004).

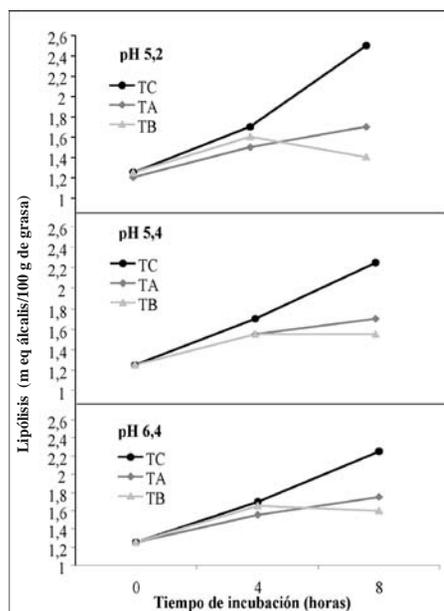


Figura 4. Lipólisis producida por *L. helveticus* CNRZ 32 atenuado por tratamiento térmico alto y bajo y cepa sin atenuar, en leche a pH de 5.2, 5.4 y 6.4 en un período de 8 hrs.

Figure 4. Lipolysis produced by *L. helveticus* CNRZ 32 attenuated with high and low heat treatment and the culture without treatment in milk at pH 5.2, 5.4 and 6.4 during 8 hrs.

Evolución de la lipólisis. De acuerdo al análisis de varianza multifactorial, dentro del tiempo de incubación (8 h) de *L. helveticus* CNRZ 32 bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y atenuado por dos métodos distintos, se obtuvieron diferencias significativas en el grado de lipólisis debido a la interacción de los tres efectos ($p=0,0000$).

La Figura 4 muestra la evolución del grado de lipólisis a los diferentes tiempos de incubación

estudiados, según los tratamientos de atenuación y los diferentes valores de pH a los que fueron ajustados y mantenidos los medios.

De acuerdo al gráfico de Interacciones e Intervalos Tukey, se observó que, luego de las 8 h de incubación, el mayor grado de lipólisis lo alcanzó el cultivo control a los tres niveles de pH. El análisis de regresión lineal señala que el pH inicial no tuvo efectos significativos sobre la lipólisis en el período de incubación estudiado. Además, a las 8 h de incubación a 35°C, el nivel de lipólisis desarrollado por el control es notablemente superior, luego bastante más bajo se encuentra el tratamiento alto, también ligeramente superior al tratamiento bajo.

El Análisis de Regresión para el tiempo de incubación (8 h) muestra que el efecto de la temperatura es altamente significativo para el control ($p=0,0000$ y $R^2=93,4\%$), siendo la lipólisis desarrollada a 35°C notablemente superior a la desarrollada a temperaturas más bajas. Semejante comportamiento obtuvo El Soda, (2003), quien indica que la producción de esterasas intracelulares por *L. helveticus* no sometido a tratamiento de atenuación, presenta un óptimo de temperatura de 40 a 45°C, la cual se reduce a sólo una pequeña actividad estereolítica al incubarlo entre 30 y 35°C.

En el presente estudio, en los tratamientos de atenuación, el grado de lipólisis presenta diferencias significativas en la interacción entre los tiempos de incubación, temperatura y pH inicial, con un valor $p=0,0053$ para el control y $p=0,0043$ para el tratamiento bajo. El tratamiento alto presenta diferencias significativas en la interacción tiempo - temperatura y en el efecto principal "pH". Además el análisis de Regresión Múltiple muestra que para el tratamiento control son significativos los efectos tiempo y temperatura, los que combinados explican en un 69,8% el desarrollo de la lipólisis.

La evolución de la lipólisis en el tratamiento alto, resulta altamente significativo al 99% ($p=0,0000$), y es explicado por la combinación de las tres variables en un 72,8% ($R^2=0,728$), por lo tanto, a medida que alguna de las tres variables presenta un aumento, se incrementa también el grado de lipólisis. En cambio, en el caso del tratamiento bajo la evolución de la lipólisis es explicada sólo en un 26% por un

aumento del pH y de tiempo de incubación y, al disminuir la temperatura, el 74% restante del modelo puede deberse a factores no considerados en este estudio, consecuentemente resulta difícil predecir la evolución de la lipólisis para este tipo de atenuación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio con leche, al agregar *L. helveticus* CNRZ 32, atenuado por tratamiento térmico alto en quesos semiduros chilenos, como Chanco ó Gauda (3 - 4 semanas de maduración), cabría esperar un aumento en el grado de lipólisis, pero no se podría asegurar que se produzca en niveles tales que puedan ser detectables en análisis específicos o bien en niveles que pudieran producir efectos sensoriales beneficiosos en Chanco y Gauda, particularmente por la corta maduración normal que presentan estos quesos.

Evolución de la glicólisis (pH). El descenso del pH, fue progresivo en la medida del avance del tiempo de incubación para los tres tratamientos y en todos los niveles de pH al que fueron ajustados los medios (Fig. 5)

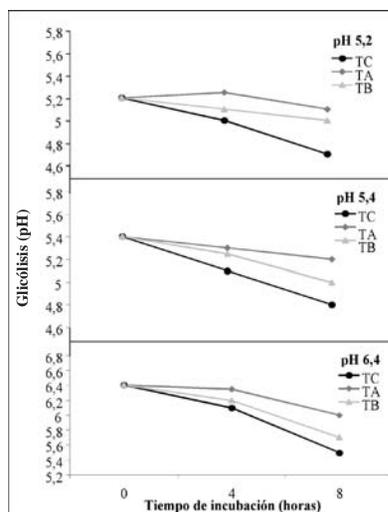


Figura 5. Glicólisis producida por *L. helveticus* CNRZ 32 atenuado por tratamiento térmico alto y bajo y cepa sin atenuar, en leche a pH de 5.2, 5.4 y 6.4 en un período de 8 hrs.

Figure 5. Glycolysis produced by *L. helveticus* CNRZ 32 attenuated with high and low heat treatment and the culture without treatment in milk at pH 5.2, 5.4 and 6.4 during 8 hrs.

Dentro del tiempo de incubación estudiado (8 h) en *L. helveticus*, se observa según el análisis de Varianza Multifactorial, que existen diferencias significativas debido a la interacción de los tres efectos ($p=0,0000$). Dentro de este tiempo los valores más altos de pH corresponden al tratamiento alto, seguido del tratamiento bajo y por último el control, todos diferentes entre sí según intervalos Tukey al 95%.

En la Figura 3 se observa que se presentan efectos similares bajo las dos temperaturas de incubación, siendo estadísticamente diferentes entre sí en los dos niveles estudiados, donde se obtienen valores de pH significativamente inferiores al incubar a 35°C.

Por otra parte hubo interacción significativa ($p=0,0000$) entre el tiempo, temperatura de incubación y el pH inicial del sustrato, por lo tanto los tres factores fueron dependientes en sus efectos sobre la diferencia de pH, lo que se evidenció en una Regresión Multifactorial muy significativa dentro de cada nivel de atenuación r^2 : 82,921; 92,346 y 89,771, para el tratamiento control, alto y bajo, respectivamente.

Dado que la actividad proteolítica en los quesos está influenciada en gran medida por su pH, elevados valores de éste aumentan la actividad de los microorganismos, así como la producción y el accionar de sus enzimas acelerando los procesos de degradación, en cambio a pH inferiores a 5,0 se reduce notablemente la velocidad de degradación de los componentes (Brito *et al.*, 2000). Por ello es que una glicólisis intensa, ocurrida durante el proceso por causa del cultivo adjunto, incidiría muy negativamente sobre la actividad proteolítica en la maduración del queso, retardando las degradaciones normales y por ende, el desarrollo del sabor y textura típicos, por ello es necesario que estas cepas presenten una baja actividad \leq -galactosidásica. En esta investigación, y de acuerdo a lo determinado en la primera etapa del presente estudio, el tratamiento alto de atenuación presenta la menor actividad glicolítica y consecuentemente, el menor descenso de pH en el tiempo en comparación al control y al tratamiento bajo de atenuación.

Los resultados obtenidos en esta investigación, con relación a la evolución del pH en el tiempo, concuerdan con lo obtenido por Johnson *et al.* (1995) quienes al elaborar queso Cheddar de bajo

tenor graso adicionado de *L. helveticus* tratado a 67°C/10 s, no obtuvieron efectos significativos en el desarrollo de la fermentación, frente a un control sin adición.

Los resultados del estudio de la glicólisis a través de la evolución de la acidez, manifestaron un comportamiento absolutamente coherente con el pH. Además, el pH inicial y la temperatura de incubación estuvieron altamente relacionados con el tiempo en cuanto a la responsabilidad en el aumento de acidez por la adición del cultivo en estudio.

Por todo lo anterior se esperaría que *L. helveticus* CNRZ 32, tratado por atenuación alta, al ser adicionado en el proceso de quesos semiduros, produzca un mínimo descenso del pH, inferior que al adicionar esta cepa sin atenuar o atenuada por tratamiento bajo, aunque esta última también debería acidificar menos que el testigo. Lo anterior se debe particularmente a que las cepas que fueron atenuadas por el tratamiento alto presentan la menor actividad \leq -galactosidásica, reflejada en el nivel de acidificación, significativamente inferior a los demás tratamientos correspondientes a igual temperatura (35°C). Más aún, a 25°C la glicólisis se observa totalmente ausente, debido a la combinación del tratamiento de atenuación con la temperatura de incubación, en que *L. helveticus* no encuentra sus condiciones óptimas de desarrollo.

CONCLUSIONES

El tratamiento térmico a 68°C/18 s aplicado sobre la cepa de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 para realizar su atenuación, permite obtener en leche fluida, el mejor balance entre disminuir la capacidad enzimática glicolítica y mantener las propiedades enzimáticas proteolíticas y lipolíticas propias de la cepa, consecuentemente se propone esta metodología de atenuación al aplicar dicha cepa en producciones que requieren acelerar ó intensificar los procesos degradativos de maduración como es el caso de los quesos de larga maduración, los reducidos en grasa, aquellos elaborados con leche concentrada y otros.

El tratamiento de congelación (-18°C durante 24 h), surge también como alternativa de atenuación de la cepa *L. helveticus* CNRZ 32, al presentar menor capacidad de acidificación que el control (sin atenuar), aunque es evidente que presenta menor eficiencia que la misma cepa tratada por tratamiento térmico alto en relación a la retención de su capacidad degradativa frente a la reducción de su capacidad glicolítica desarrollada en leche.

AGRADECIMIENTOS

Al Centre Nationale de Recherche Zootechnique, (Jouy - en - Josas, Francia), por proveer la cepa de *Lactobacillus*, a la Dirección de Investigación DID UACH por proveer fondos para realizar la Investigación.

BIBLIOGRAFIA

- ALY, M.E. 1990. Utilization of Freeze – shocked Lactobacilli for Enhancing Flavor Development of Ras Cheese. *Nahrung* 34: 329-335.
- BRITO, C.; ASTETE, M.A.; PINTO, M.; MOLINA, L. H. 2000. Maribo cheese manufactured with concentrated milk: Characteristics, Maturation and Yield. *International Journal of Dairy Technology* 53(1): 6-12.
- BOCK, S. 1999 Atenuación de *Lactobacillus helveticus* y estudio de sus propiedades de glicólisis, proteólisis y lipólisis. Tesis Ingeniero en Alimentos. Universidad Austral de Chile, Valdivia 112p.
- CALLAGAN, M. L.; ROOS, R. P. 2004. Starter Cultures: Genetics. **In:** Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3th Edit. Vol.1. Cork, Elsevier Ltd. pp. 149 - 161.
- CASTAÑEDA R., VASSAL L., GRIPON J.C., ROUSSEAU, M. 1990. Accelerated Ripening of a Saint-Paulin Cheese Variant by Addition of Heat-Shocked lactobacillus Suspensions. *Netherlands Milk Dairy Journal* 44: 49-62.
- CHAMBA, J-F. 2004 Secondary and Adjunct Cultures. **In:** Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3th Edit. Vol.1. Cork, Elsevier pp. 191 - 206
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION INN. 1999. Productos lácteos. Queso Chanco. Requisitos. Norma Chilena 2090 Of 99.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. INN. 1979. Leche y productos lácteos. Determinación de pH. Norma Chilena 1671 Of 79.
- COLLINS, Y.F.; McSWEENEY, P.H.; WILKINSON, M.G. 2004. Lipolysis and catabolism of Fatty acids in cheese. **In:** Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3th Edit. Vol.1. Cork, Elsevier pp. 373 – 389.
- COGAN, T.M. 2003. Microbiology of cheeses. **In:** Roginski, H.; Fuquay, J.W.; Fox, P.F. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London Academic Press pp. 306 - 314
- DRAKE, M.A.; BOYLSTON T.D.; SPENCE, K.D.; SWANSON, B.G. 1996. Chemical and Sensory Effects of a Lactobacillus Adjunct in Cheddar Cheese. *Food Research International* 29: 381-387.
- DRAKE M.A.; BOYLSTON T.D.; SPENCE K.D.; SWANSON, B.G. 1997. Improvement of Sensory Quality of Reduced Fat Cheddar Cheese by a Lactobacilli Adjunct. *Food Research International* 30: 35-40.
- EL ABOUDI, M.; PANDIAN, S.; TRÉPANIÉ, G.; LEE B.H. 1991. Heat-shocked Lactobacilli of Cheddar Cheese Ripening. *Journal of Food Science* 56: 948-953.
- EL SODA, M. 2003. Accelerate Cheese Ripening. **In:** Roginski, H.; Fuquay, J.W.; Fox, P.F. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London, Academic Press. pp. 327 – 329.
- EZZAT, N.; EL SODA, M.; DESMAZEAUD, M.J.; ISMAIL, A. 1982. Peptide Hydrolases from Thermobacterium Group of Lactobacilli. II. Physiological factors and enzyme production. *Milchwissenschaft* 37: 666-668.
- FOX, P. F. 2003. Biochemistry of cheese ripening. **In:** Roginski, H.; Fuquay, J.W.; Fox, P.F. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London, Academic Press. pp. 320 – 326.
- FREY, J.P.; MARTH, E.H.; JOHNSON, M.E.; OLSON, N.F. 1986. Heat-and-Freeze-shocking cause Changes in Peptidase and Protease Activity of *Lactobacillus helveticus*. *Milchwissenschaft* 41: 681-684.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. FIL/IDF

149. 1991. Lactic acid starters. Standard of identity. Belgium. 8p.
- JOHNSON, J.A.C.; ETZEL, M.R. 1995. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 Attenuated by Spray Drying, Freeze Drying or Freezing. *Journal of Dairy Science* 78: 761-768.
- JOHNSON M.E. 2003. Low - Fat cheese. **In:** Roginski, H; Fukai, J. W.; Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L., Cogan, T.M; Guinee, T.P. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London, Academic Press. pp. 438 – 444.
- JOHNSON, J.A.C.; ETZEL, M.R.; CHEN, C.M.; JOHNSON, M.E. 1995. Accelerated Ripening of Reduced-fat Cheddar Cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 Adjunct. *Journal Dairy Science* 78: 769-776.
- KIM M.S.; KIMS.C.; OLSON, N.F. 1994. Effect of Commercial Fungal Proteases and Freeze-Shocked *Lactobacillus helveticus* CDR 101 on Accelerating Cheese Fermentation. II. Proteolysis. *Milchwissenschaft* 49: 442-445.
- MCKELLER, R, C. 1981. Development of off-flavors in UHT and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science* 64: 2139-2145.
- Mc SWEENEY, P. L. 2004. Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. **In:** Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3th Edit. Vol.1. Cork, Elsevier pp.347 – 360
- McSWEENEY, P. L.; FOX, P F. 2004 Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. **In:** Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3th Edit. Vol.1. Cork, Elsevier pp 361 – 371
- OLIVEIRA, M. N.; BRITO, C. 2006. Brined Cheeses and Analogues of Latin American Chapter 7. **In:** Tamime, A.Y. (Ed.) *Brined cheeses*. Society of Dairy Technology Series. London Blackwell publishing. pp 211 – 248.
- PARENTE, E; COGAN, T. M. 2004. Starter Cultures: General Aspects. **In:** Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3th Edit. Vol.1. Cork, Elsevier. pp. 123 - 147.
- PILLAY, T., MYRH, A.N.; GRAY, J.L., BIGGS, D.A. 1980. Lipolysis in milk. II. Effect of milking systems. *Journal of Dairy Science* 63: 1219- 1223.
- RATTRAY, F.P. 2003. Secondary Cultures. **In:** Roginski, H.; Fuquay, J.W.; Fox, P.F. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London Academic Press. pp. 275 – 281
- ROMERO, A.; OLANO, C. 1993. Modificación de un método para determinar la actividad proteásica en leches fluidas. Trabajo presentado en el X Congreso de la Sociedad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (SOCHITAL) Pucón. Chile.
- SKEIE, S.; NARVHUS, J.; ARDÖ, Y.; ABRAHAMSEN, R. 1995. Influence of liposome-encapsulated Neutrase and Hest-treated Lactobacilli on the Quality of Low-fat Gouda-type Cheese. *Journal of Dairy Research* 62:131-139.
- SPANGLER, P.L.; EL SODA, M.; JOHNSON, M.E.; OLSON N.F.; AMUNDSON, C.H.; HILL JR, C.G. 1989. Accelerated Ripening of Gouda Cheese made from ultrafiltered Milk using a Liposome Entrapped enzyme and Freeze shocked Lactobacilli. *Milchwissenschaft* 44: 197-264.
- UPADHYAY, V.K; Mc SWEENEY, P.L; MAGBOUL, A. A; FOX P.F. 2004 Proteolysis in Cheese during ripening. **In:** Fox, P.F., Mc Sweeney, P.H.L.; Cogan,