



---

# PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

---

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL EN LA  
FABRICACIÓN DEL QUESO.



**FERMENTED DAIRY PRODUCTS.**

INDUSTRIAL MICROBIOLOGY IN CHEESE ELABORATION.

7 DE FEBRERO DE 2020

**SOFIA SAN MARTIN GARCIA**  
**4º BIOLOGIA, USAL SALAMANCA**

# INDICE

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. BACTERIAS LÁCTICAS.....	3
- Microbiología y fisiología de las bacterias.....	3
- Metabolismo de las bacterias lácticas y producción de ácido láctico por ellas.....	6
- Otras funciones de las bacterias lácticas.....	9
<b>1) Producción de bacteriocinas.....</b>	<b>9</b>
<b>2) Producción de compuestos aromáticos.....</b>	<b>11</b>
<b>3) Inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y facilitan la digestión.....</b>	<b>15</b>
4. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS.....	15
- Mantequilla.....	16
- Kéfir.....	16
- Yogur.....	18
- Queso:.....	21
Elaboración del queso.....	22
<b>1) Preparación de la leche.....</b>	<b>22</b>
<b>2) Coagulación.....</b>	<b>22</b>
<b>3) Deshidratación, salado y maduración.....</b>	<b>25</b>
5. CONCLUSIÓN.....	26
1. BIBLIOGRAFIA.....	27

## **1. RESUMEN.**

Este trabajo tiene como objetivo principal comprender el papel de los microorganismos en la elaboración de productos lácteos. Por eso comenzaré hablando de aspectos de la microbiología y fisiología de bacterias lácticas y seguidamente detallaré el metabolismo de la fermentación láctica.

A continuación, hablaré del origen y elaboración de algunos productos lácteos y como las técnicas de obtención y los gustos del consumidor han ido avanzando hasta nuestros días. El trabajo se centrará en la fabricación de queso. Se estudiarán todas las etapas en su elaboración, acidificación, coagulación, secado/salado y maduración y los microorganismos y las enzimas de origen microbiano que participan. Se hará especial hincapié en la fase de coagulación.

El objetivo del trabajo consiste en explicar la importancia el metabolismo microbiano en la fabricación del queso para que los microorganismos beneficiosos junto a las condiciones de elaboración adecuadas permitan evitar alteraciones en el producto final.

### **ABSTRACT.**

This work has as main objective to understand the role of microorganisms in the manufacture of dairy products. I will start talking about different aspects of the microbiology and physiology of lactic bacteria and then I will feature the metabolism of lactic fermentation.

Other important topics are the origin and elaboration of some dairy products and how the techniques of obtaining and the tastes of the consumer have been advancing in presents days. The work will focus on cheese making. All stages in its elaboration, acidification, coagulation, drying / salting and maturation and the microorganisms and enzymes of microbial origin involved. Special emphasis will be placed on the coagulation phase.

The aim of this work is to explain the importance of microbial metabolism in the manufacture of cheese, so that beneficial microorganisms along with the appropriate processing conditions allow to avoid alterations in the final product.

## 2. INTRODUCCIÓN.

La fermentación de la leche se ha utilizado desde la antigüedad como método de conservación. Actualmente se sigue empleando para prolongar la vida media de la leche en países en vías de desarrollo y comunidades rurales, mientras que en los países desarrollados se emplea para conseguir productos nuevos, con mejores características organolépticas y con mayor aceptación por parte de los consumidores. Además, la fermentación mejora la seguridad microbiológica de los distintos productos, puesto que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos.

Los productos lácteos fermentados se obtienen al añadir a la leche de cualquier tipo, vaca, cabra, oveja, búfala, cultivos de bacterias lácticas. Estas bacterias utilizan, la lactosa que es el azúcar de la leche, como fuente de energía y lo transforman en ácido láctico provocando la acidificación.

Desde el momento en que se añade el cultivo de bacterias lácticas a la leche es de vital importancia la reducción del pH en un periodo de 4-8 horas. El pH debe bajar a menos de 5,3 en el queso y a menos de 4,6 en las leches fermentadas, de esta manera, una vez completada la fermentación, solo las bacterias ácido tolerantes pueden multiplicarse. Cualquier inconveniente en el tiempo de desarrollo de la acidez o si el pH no baja lo suficiente, podría favorecer el crecimiento de microorganismos indeseables.

Se ha comprobado que es inevitable que los productos lácteos se elaboren en ambientes libres de microorganismos, por eso existen técnicas asépticas adecuadas a cada producto lácteo que van a permitir la destrucción de microorganismos patógenos cuando es necesario.

El presente estudio está enfocado al estudio de las bacterias lácticas y su participación en la obtención de productos lácteos fermentados, como la leche, el yogurt, quesos etc.

Las bacterias lácticas que se añaden a la leche para que se produzca la acidificación, se conocen como cultivos estarter, Los cultivos estarter más comunes llevan bacterias pertenecientes a los géneros *Lactococcus lactis subesp.lactis*, *Lactococcus lactis subesp.cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subesp.bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus* (Thompson ,1979).

En el caso del queso, el flavor, la textura o su aspecto depende también de otro tipo de microorganismos que son conocidos como microflora secundaria. En la microflora secundaria se incluyen las levaduras del género *Penicillium*, bacterias como *Propionibacterium freundenreichii* y

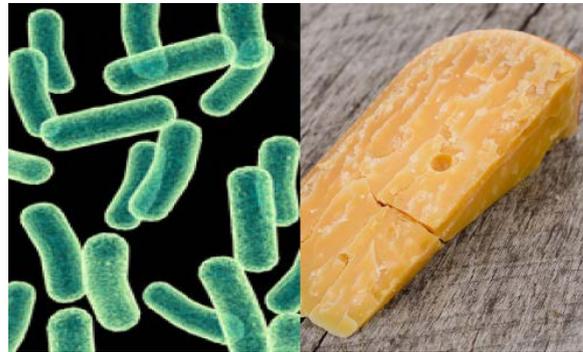
algunas bacterias lácticas, como *Leuconostoc citrato*<sup>+</sup> y *Lactococcus lactis sub lactis* (Özcan et al., 2019).



**Figura 1:** *Penicillium Camemberti*. Microflora secundaria en el queso Camembert (cheesescience.org , 2019).



**Figura 2:** *Propionibacterium freundenreichii*. Microflora secundaria en los quesos suizos(cheesescience.org, 2019).



**Figura 3:** *Lactobacillus helveticus*. Bacteria estarter en el queso Gouda (cheesescience.org , 2019).

### 3. BACTERIAS LÁCTICAS.

#### - Microbiología y fisiología de las bacterias.

Son bacterias Gram positivas, no esporuladas y microaerófilas que producen ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Se diferencian en dos grupos según los productos resultantes de la fermentación de la glucosa de la leche, homofermentativas y heterofermentativas.

Las homofermentativas transforman las hexosas en ácido láctico por la ruta de Embden Meyerhoff y las heterofermentativas producen una mezcla de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> por una vía lateral de hexosa monofosfato (Martín del Campo M., et al., 2008).

Las bacterias lácticas (BL) comprenden muchos géneros: *Streptococcus* (*Enterococcus*, *Lactococcus*), *Pedococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Entre ellos, el género con mayor número de especies es *Lactobacillus*. Basándose en la secuencia de RNA ribosomal 16s clasifica los géneros *Lactobacillus*, *Pedococcus* y *Leuconostoc*.

Las bacterias lácticas pueden ser cocos o bacilos, los cuales se diferencian a simple vista por su forma y por su capacidad de tolerar el pH. Los cocos son bacterias con forma esférica y pueden presentarse enlazados, formando cadenas o racimos, o vivir solos, además pueden iniciar su desarrollo en medios básicos o neutros. Y los bacilos, con forma de barra o vara, no pueden crecer en medios con pH mayor a 6. Su capacidad de tolerar el pH las hace resistentes a las condiciones en las que se desarrolla la fermentación láctica y su capacidad para producir ácido láctico a partir de la leche les permite eliminar la competencia de otros microorganismos (Doyle *et al*, 2018).

Las BL crecen en anaerobiosis, pero toleran pequeñas cantidades de oxígeno por tanto son anaerobias facultativas. Además, tienen la propiedad de ser catalasa negativa, carecen de la capacidad de sintetizar el grupo hemo. Al ser catalasa negativa, la mayoría poseen peroxidasa para destruir el peróxido de hidrógeno.

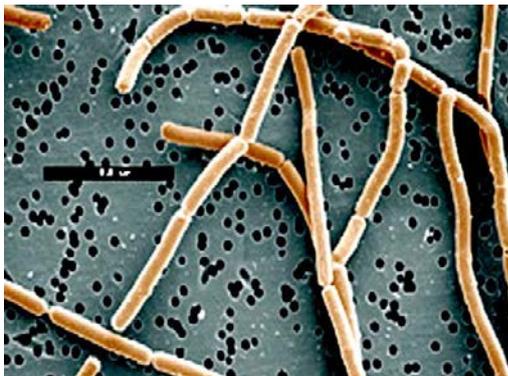
La mayoría son mesófilas, toleran temperaturas entre 30 y 40°C pero también hay unas pocas psicrófilas (toleran temperaturas bajas entre 15 a 20°C) y termófilas (soportan temperaturas superiores a 45°C).

Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, por ello no llevan a cabo fosforilación acoplada a la cadena de transporte de electrones, sino que obtienen la energía a través de fosforilación a nivel de sustrato. Es decir, recurren a la reducción de un sustrato de su propio metabolismo para reciclar el poder reductor y así permitir que la glucólisis continúe y se siga generando ATP.

Presentan una capacidad biosintética muy limitada por lo que son muy exigentes nutricionalmente y requieren medios de cultivo ricos, con gran cantidad de aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas.

Las BL presentan plásmidos que pueden conferir a las bacterias características especiales. Llevan genes que codifican enzimas metabólicas que participan en la ruta PEP-PTS, enzimas para el transporte del citrato e intermediarios en el transporte de oligopéptidos, otros genes codifican enzimas que participan en los mecanismos de resistencia a bacteriófagos, en la producción de bacteriocinas y en la resistencia a ellas (Kok *et al.*, 2017). Propiedades que veremos más adelante.

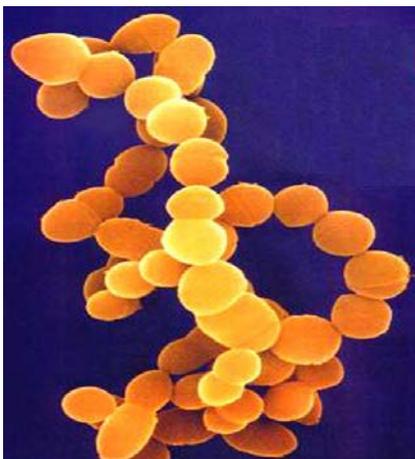
Algunos ejemplos de bacterias lácticas y conocidas como estarter y productoras de la acidez en quesos como el Camembert, quesos azules y Roquefort, son bacterias del genero *Lactococcus lastis subesp. cremoris*. Otras se utilizan en la elaboración de yogures como *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subesp.bulgaricus*, y en la de mantequilla como *Leuconostoc* (Doyle *et al*, 2018).



**Figura 4:** *Lactobacillus delbrueckii* (lifeder.com, 2016).



**Figura 5:** *Streptococcus thermophilus* (istockphoto.com, 2016).



**Figura 6:** *Leuconostoc lactis* (lifeder.com, 2016).

## - **Metabolismo de las bacterias lácticas y producción de ácido láctico por ellas.**

La producción de ácido láctico solo se puede entender si conocemos el metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas. Se trata de un ácido incoloro y prácticamente insípido pero indispensable para la conservación de productos fermentados, porque al bajar el pH permite crear un microambiente desfavorable para las bacterias patogénicas. El metabolismo es diferente, según las bacterias lácticas sean clasificadas como homofermentativas o heterofermentativas.

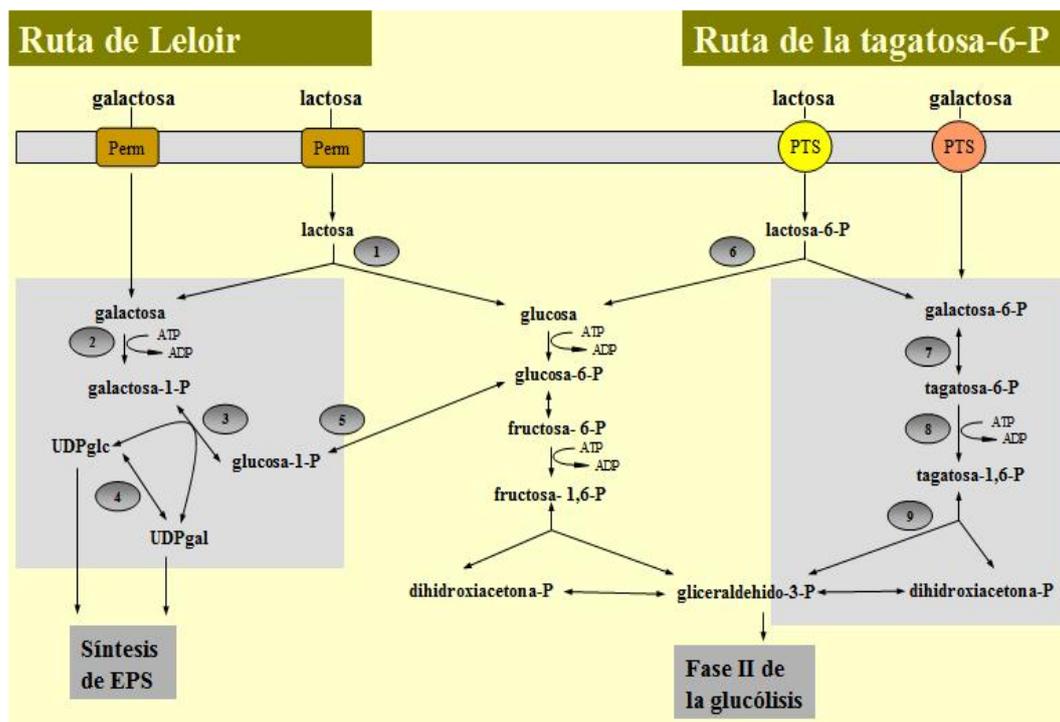
### ❖ Bacterias lácticas homofermentadoras:

La mayoría son bacterias mesófilas homofermentadoras, toleran temperaturas entre 20°C y 45°C y suelen pertenecer al género *Lactococcus*. También podemos encontrar otras termófilas, toleran temperaturas por encima de 45°C, por ejemplo *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*. Estas bacterias homofermentadoras, fermentan la lactosa de la leche produciendo únicamente ácido láctico.

Generalmente el metabolismo de la lactosa empieza cuando este disacárido es introducido en el interior de las células por un sistema de transporte, llamado fosfoenol piruvato-lactosa fosfotransferasa (PEP-PTS<sup>lac</sup>) (Thompson ,1979). Este sistema se caracteriza por la transferencia del grupo fosforil del fosfoenolpiruvato hacia la lactosa, de modo que permite la translocación de este azúcar a través de la membrana plasmática-

Una vez dentro, la lactosa fosforilada será escindida mediante una fosfo-galactosidasa (codificada por el gen *lac G*) a glucosa y galactosa-6 fosfato (número 6 de la figura 7). Seguidamente, la glucosa entra en la ruta glucolítica, mientras que la galactosa-6-fosfato será transformada a tagatosa-6-fosfato por la ruta de la tagatosa (número 7 de la figura 7). Es a partir de estos últimos intermediarios sobre los que actúan las enzimas aldolasas, que permitirán la transformación de estos compuestos en triosas fosfatos, como dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP) (Figura 7). Las triosas fosfato serán transformadas a ácido pirúvico a expensas del NAD<sup>+</sup>, que finalmente es regenerado mediante la reducción del ácido pirúvico a ácido láctico. El proceso libera una pequeña parte de la energía (2 moles de ATP) y dos moléculas de ácido láctico.

Otros géneros de bacterias como *Streptococcus thermophilus* y algunos *Lactobacillus* termófilos transportan la lactosa por un sistema antiporte lactosa-galactosa conducido por un gradiente electroquímico de protones. La lactosa no es fosforilada durante el transporte, pero será escindida por una beta-galactosidasa para dar glucosa y galactosa (Poolman, 1993). En los lactobacilos termófilos como *Lactobacillus delbrueckii lactis sub bulgaricus*, la glucosa entrará en la vía glucolítica, mientras que la galactosa defosforilada puede ser secretada al medio que en este caso es la leche o el queso, donde puede ser metabolizada por bacterias lácticas heterofermentativas. Esto podría traer problemas en la calidad del producto porque estas bacterias generan CO<sub>2</sub> provocando rotura de los quesos y el hinchamiento de su envoltorio.



**Figura 7:** El metabolismo de la lactosa. Ruta de Leloir (izquierda) y de la Tagatosa (derecha) (probioticsysalud.com, 1996).

Otras cepas, como *Lactobacillus helbeticus* son capaces de transportar la galactosa secretada al interior de la célula, gracias a una permeasa y utilizan la ruta llamada de Leloir (Figura 7), que metaboliza la galactosa en glucosa-1-fosfato (número 3, figura 7), la cual por la enzima fosfoglucomutasa (número 7, figura 7) se isomeriza a glucosa-6-fosfato, la cual se incorporara a la glucólisis. En la ruta de Leloir participan varias enzimas: la galactoquinasa (número 2, figura 7) que transforma la galactosa en galactosa-1-fosfato, la galactosa-1-fosfato uridil transferasa (número 3,

figura 7) que convierte este último compuesto en UDP-galactosa y la enzima UDP-galactosa-4-epimerasa (número 5, figura 7) que se va a reciclar la UDP-galactosa convirtiéndola en UDP-glucosa.

En general los microorganismos termófilos tienen problemas para metabolizar los azúcares residuales durante el almacenamiento del queso. Por ello, a veces en los cultivos iniciadores o estárter se emplean los *lactococcus* (mesófilos) para asegurar de que todo el azúcar residual sea fermentado.

❖ Bacterias lácticas heterofermentadoras:

Las bacterias lácticas heterofermentadoras, metabolizan la lactosa y producen una molécula de ácido láctico, una de etanol y una de CO<sub>2</sub> y además en condiciones de aerobiosis producen ácido acético. La producción de cada uno de estos componentes viene determinada por la energía, el estado redox del microorganismo y por la ausencia de aldolasa.

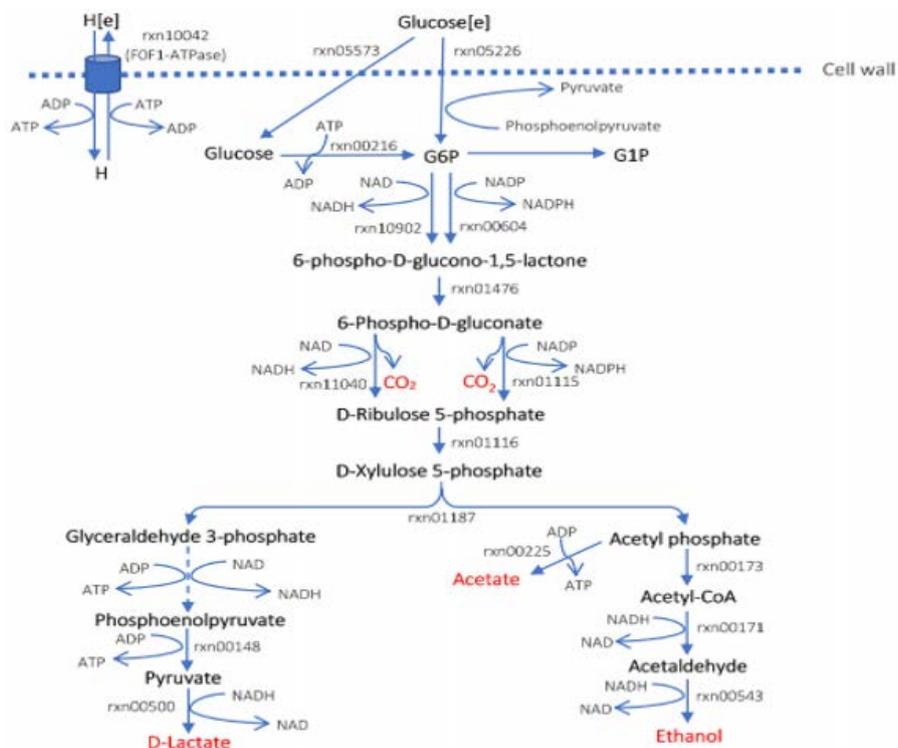


Figura 8: Ruta de hidrolisis de la lactosa en bacterias lácticas heterofermentadoras (Özcan et al. ,2019).

Este proceso se ha estudiado en detalle en la bacteria *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. Aquí la lactosa es hidrolizada por una beta-galactosidasa, originándose glucosa y galactosa. La galactosa es transformada a glucosa-6-fosfato por la ruta de Leloir y junto con la glucosa es metabolizada por la ruta de la fosfocetolasa (Figura 8). En primer lugar, se produce una deshidrogenación por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y una descarboxilación oxidativa por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa que convierten la glucosa-6-fosfato en CO<sub>2</sub> y en una molécula de 5 átomos de carbono (xilulosa-5-P). La xilulosa-5-P es escindida por una fosfocetolasa para dar gliceraldehido y acetil-fosfato (Figura 8).

La rama donde el gliceraldehido es convertido en piruvato y seguidamente en ácido láctico es redox balanceada y produce ATP necesario para la célula, mientras que en la rama que se produce acetil-fosfato, este puede ser convertido a etanol, dando como resultado la oxidación de NADH a NAD, o producirse la conversión del acetil-fosfato en ácido acético por la acetato quinasa dando como resultado ATP. Solo cuando se forma láctico y etanol se regenera el NAD (Figura 8).

En condiciones aeróbicas las bacterias ácido lácticas heterofermentativas como *Leuconostoc* requieren menos NADH que se obtendría por la producción de etanol y por tanto, se produce la ruta alternativa, la producción de acetato aumenta (Figura 8). Este fenómeno permite obtener más ATP, más energía para permitir el crecimiento de la célula y menos etanol. Por tanto, es en condiciones aeróbicas cuando transforman el acetil-fosfato en ácido acético en lugar de etanol y es una manera de generar ATP que se relaciona con estimulaciones de crecimiento.

La producción de etanol en las bacterias heterofermentadoras puede afectar a la fluidez de la membrana de las bacterias patógenas, evitando que se repliquen e incluso puede ocasionar su muerte. También algo parecido con el CO<sub>2</sub>, puesto que se trata de un gas que cuando es liberado crea un ambiente anaeróbico en el cual las bacterias aeróbicas no puede crecer (Özcan et al. ,2019).

## - **Otras funciones de las bacterias lácticas.**

### 1) **Producción de bacteriocinas.**

Las bacteriocinas son toxinas proteicas producidas por algunas bacterias lácticas que inhiben el crecimiento de otras bacterias Gram (+) y de Gram (-). Las bacteriocinas son considerados como “biopreservantes” y en algunos casos pueden remplazar a algunos antibióticos con fines de conservación.

En el pasado, la utilización de antibióticos con fines de desinfección de los productos lácteos eran la causa de una producción irregular de ácido. Actualmente está prohibida la presencia de antibióticos en la leche y se utilizan cultivos de bacterias lácticas capaces de sintetizar bacteriocinas. Además, las bacteriocinas no son tóxicas, no provocan alergias y son bien digeridos en el intestino humano. Generalmente están codificados por plásmidos o transposones (Vieco-Saiz et al, 2019).

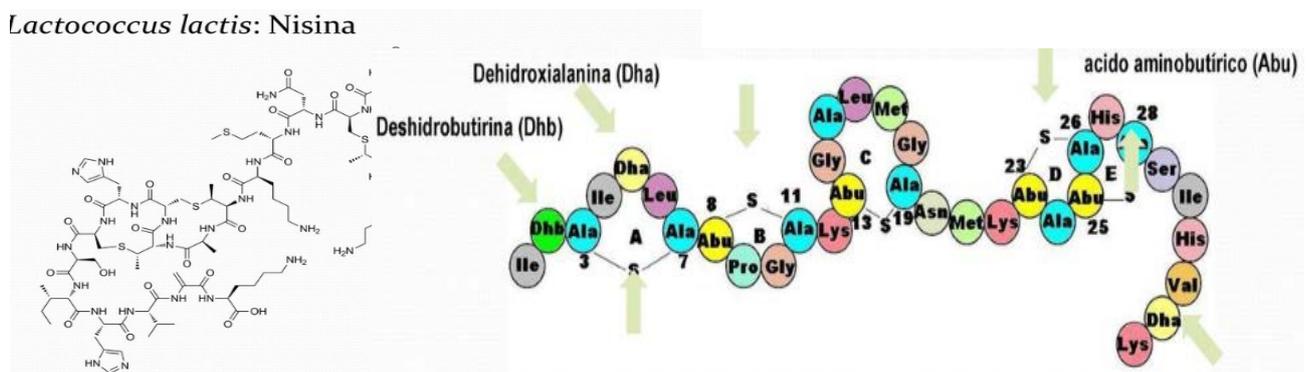
La más conocida es la Nisina A, producida por *Lactococcus lactis*. Su función es inhibir el crecimiento sobre todo de bacterias Gram (+), entre ellas *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria monocitogenes*. También inhibe el crecimiento de algunas Gram (-), como *Salmonella*. Su mecanismo de acción consiste en la capacidad de formación de poros en la membrana plasmática de la bacteria sensible a la acción de esta bacteriocina, lo que altera la permeabilidad de la membrana, la fuerza protón-motriz de la misma y su capacidad de sintetizar ATP (Shin et al., 2015).

La Nisina posee cargas netas positivas y cuando entra en contacto con una bacteria sensible, es atraída por las cargas negativas del peptidoglicano de la pared celular, al que se ancla. A continuación, actúa el transportador de peptidoglicanos de la pared procedente de la bacteria sensible, conocido como lípido II, y la Nisina es transportada junto al peptidoglicano hacia la membrana plasmática de la bacteria sensible alterándola.

Es importante destacar que las bacterias lácticas que contienen el plásmido con el operón de la Nisina, presentan genes que corresponden a proteínas llamadas de inmunidad, de las que se desconoce su naturaleza, pero que confieren resistencia a la Nisina. Se conocen dos posibles mecanismos de acción de estas proteínas (López et al, 2008).

-1) Mediante el secuestro de la bacteriocina (Nisina), por una de las proteínas, las cuales la inactivarían a la Nisina o bien impedirían la unión de esta a su receptor.

- 2) Mediante la expulsión de la bacteriocina anclada a la membrana plasmática por proteínas transportadoras de tipo ABC presentes en la bacteria insensible.



**Figura 9:** Estructura de la bacteriocina, Nisina A (Slideplayer.es, 2014).

La Nisina A está formada por 34 aminoácidos, algunos de estos aminoácidos son poco comunes en la naturaleza, como, por ejemplo:

- La lantionina, formada por enlaces entre Alaninas, Ala-s-Ala (Figura 4, letra A)
- La  $\beta$ -metilantionina formada por enlaces entre alanina y aminobutirico Abu-s-Ala. (Figura 4, letra B).
- Aminoácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados: 2,3-didehidroalanina (Dha) y 2,3-didehidrobutirina (Dhb).

Existen variantes de Nisina que pueden hacer frente a patógenos Gram-positivos y Gram-negativos como la Nisina Z, que se aisló de *L. lactis* y que difiere de la Nisina A en el aminoácido 27, que es asparragina en lugar de histidina.

La Nisina se produce industrialmente y se usa para conservar alimentos como queso, fresas, etc, en muchos países y tiene estatus GRAS (“generally recognized as safe”) por la FAO (Food and Agriculture Organization) (Shin *et al.*, 2015).

## 2) Producción de compuestos aromáticos.

### 2.1. Producción de diacetilo.

Aunque el ácido láctico es el metabolito final más importante del metabolismo de la lactosa en los productos lácteos fermentados y es el responsable del sabor ácido, no es un compuesto volátil, carece de olor y no contribuye al aroma. El aroma de algunos productos lácteos es producido por una diversidad de compuestos volátiles que son diferentes dependiendo de las BL utilizadas, de los componentes de la leche y de su conversión en productos que afectan al gusto. Esta conversión a su vez depende de la carga de enzimas proteolíticas y lipolíticas de las BL empleadas, que como se ha indicado anteriormente, es muy alta puesto que necesitan gran cantidad de aminoácidos, péptidos vitaminas y factores de crecimiento para desarrollarse.

Se ha visto que en diferentes productos lácteos los compuestos volátiles pueden ser diferentes. En los yogures los más comunes son el ácido acético, el acetaldehído, el diacetilo, el ácido propiónico etc. En el queso Gouda, el metabolismo de los aminoácidos de la leche produce compuestos volátiles como 2-metilpropanol, dimetilsulfuro (DMTS), metanotiol etc. Sin embargo, en los quesos de tipo suizo se obtienen compuestos como metional, 3-metilbutanal y escatol (Doyle *et al.*, 2018).

Incluso algunas bacterias lácticas homofermentadoras, como *Lactococcus lactis citrato*<sup>+</sup>, además de realizar la fermentación láctica, utiliza el ácido cítrico y produce compuestos aromáticos como el diacetilo que es el principal responsable del sabor a mantequilla característico de los productos lácteos. Esta bacteria se ha encontrado en la mantequilla como responsable de la producción del diacetilo y del acetil-metil-carbonilo. (Christensen , M. y Pederson, C., 1958) y (Özcan *et al*, 2019). Otro tipo de bacterias lácticas, heterofermentativas, como algunas cepas de *Leuconostoc* también pueden metabolizar el ácido cítrico y se han detectado en la mantequilla y el kéfir contribuyendo al flavor de ambos productos lácteos.

En la producción de compuestos volátiles, el piruvato puede transformarse en muchos compuestos volátiles si no es transformado a ácido láctico. Esta transformación es propia de los yogures, pero también se da en algunos quesos. A continuación, se explica la producción de compuestos volátiles a partir del ácido pirúvico y del ácido cítrico.

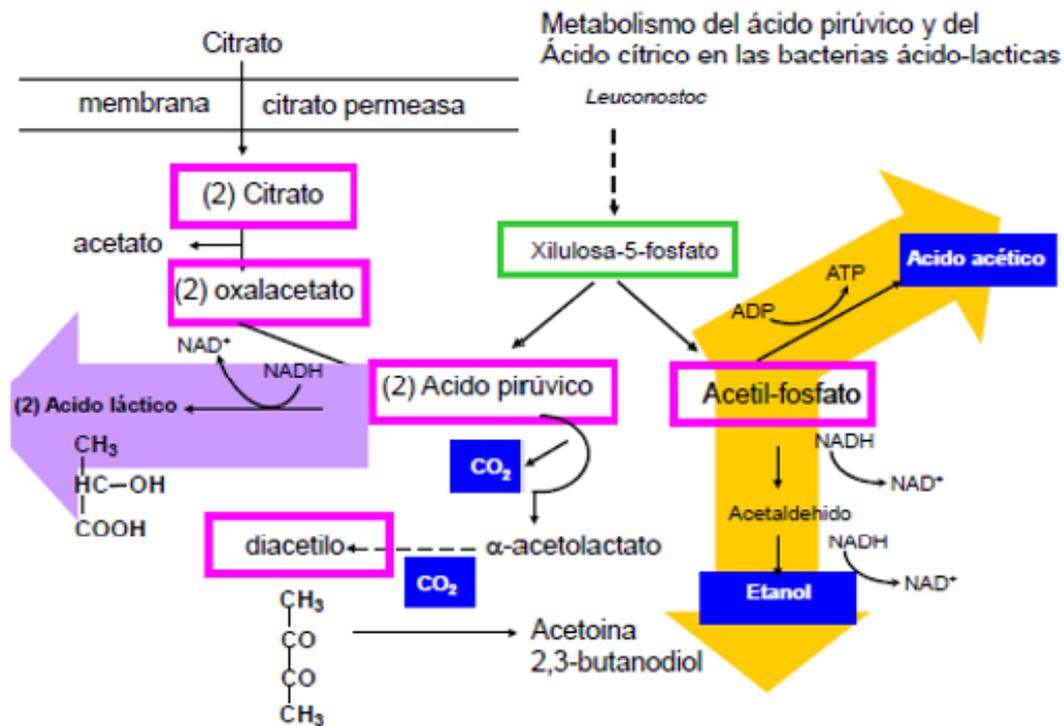
El ácido cítrico es una fuente de carbono, lo que puede estimular la formación de compuestos volátiles y de CO<sub>2</sub>. En ciertas bacterias, generalmente del género *Leuconostoc*, el ácido cítrico es transportado al interior celular por una permeasa del ácido cítrico que esta codificada en un plásmido. El ácido cítrico es transformado por la enzima oxalacetato descarboxilasa en oxalacetato, el cual se descarboxila a pirúvico y CO<sub>2</sub>, sin generar NADH. El resultado es un exceso de pirúvico que no ha sido reducido hasta ácido láctico para regenerar el NAD y que, por consiguiente, está disponible para otras reacciones (Figura 10).

La condensación de 2 moléculas de pirúvico por parte de la  $\alpha$ -acetolactato sintetasa, seguida de una descarboxilación, hacen que se acumule  $\alpha$ -acetolactato. A continuación, se forma diacetilo mediante una descarboxilación oxidativa no enzimática del  $\alpha$ -acetolactato y también se produce CO<sub>2</sub> (Speckman *et al.*, 1968).

Las especies de *Leuconostoc* metabolizan el ácido cítrico durante el crecimiento, pero no se forma diacetilo hasta que el pH está por debajo de 5,4, porque la sintetasa de  $\alpha$ -acetolactato es inhibida a pH de 5,4 o superiores por muchos intermediarios del metabolismo de la lactosa.

En algunas bacterias el diacetilo que se obtiene puede ser reducido a acetoína y 2,3 butanodiol, ambos compuestos carecen de flavor (olor, sabor, etc). La presencia de ácido cítrico inhibe estas reacciones, pero la reducción del diacetilo empieza cuando el cítrico se acaba. Para asegurar que haya una cantidad residual de ácido cítrico en los productos lácteos fermentados, se debe controlar la relación entre el cultivo iniciador y las bacterias o microflora secundaria que utilizan el citrato. La

leche fermentada es agitada cuando el pH baja a 4,6, esto introduce oxígeno y ayuda a aumentar y mantener el contenido en diacetilo. El aporte de oxígeno es necesario para la descarboxilación oxidativa no enzimática del  $\alpha$ -acetolactato a diacetilo.

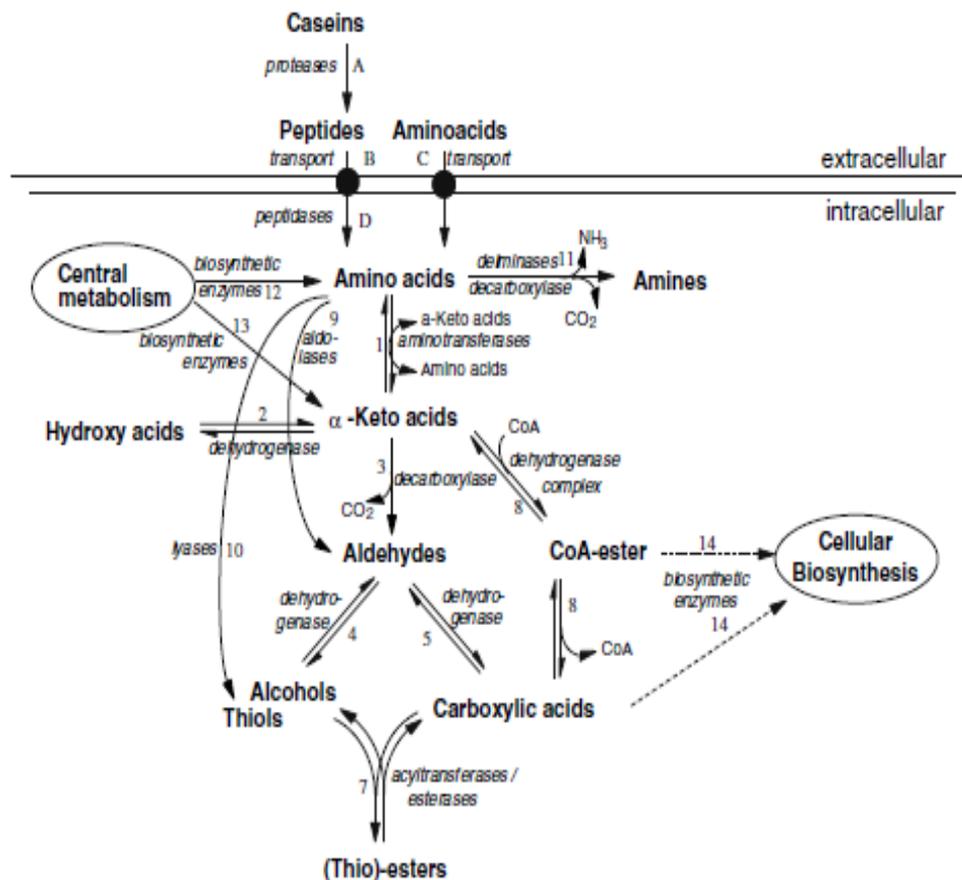


**Figura 10:** Metabolismo del ácido pirúvico y del ácido cítrico en las bacterias ácido-lácticas. Adaptado de Microbiología de los alimentos (Doyle *et al*, 2018).

Cuando no se forma diacetilo las especies de *Leuconostoc* producen ácido láctico a partir del ácido pirúvico proveniente del ácido cítrico y regeneran el NAD. Al regenerarse el NAD, hay menos demanda para formar NAD por parte del acetilfosfato que se genera en la ruta de la fosfoacetolasa, y menor producción de etanol. Consecuentemente el acetilfosfato se transforma en ácido acético por la acetato quinasa generando ATP, lo que permite incrementar el crecimiento de la célula.

## 2.2. Degradación de caseínas y producción de péptidos y aminoácidos

También se ha demostrado que la formación de compuestos aromáticos y el crecimiento de las BL también depende de la degradación de las caseínas por los sistemas proteolíticos presentes. Las BL sintetizan peptidasas que se anclan a la pared celular y que son capaces de hidrolizar las caseínas de la leche para dar péptidos, oligopeptidos y aminoácidos (Smit *et al*, 2005).



**Figura 11:** Los sistemas proteolíticos de las BL convierten las caseínas en aminoácidos y péptidos que contribuyen a la formación de compuestos aromáticos e intervienen en el crecimiento de las bacterias (Smit et al., 2005).

En este esquema se aprecia como las caseínas de la leche previamente hidrolizadas acabarán entrando al interior de las bacterias mediante sistemas específicos de transporte de oligopéptidos. Una vez dentro, los péptidos serán atacados por las enzimas intracelulares endopéptidasas y exopeptidasas (aminopéptidasas, dipeptidasas y tripeptidasas) que los fraccionarán en aminoácidos necesarios para el crecimiento.

En *Streptococcus thermophilus* se han encontrado 14 peptidasas de las cuales algunas como, Pep N, C, S, X y O presentan características y especificidad diferente con respecto a las de otras bacterias.

Algunos sabores específicos se producen mediante la conversión de los aminoácidos en  $\alpha$ -cetoácidos por aminotransferasas. Los cetoácidos son compuestos intermediarios que se descarboxilan a aldehídos, los cuales podrán ser deshidrogenados o hidrogenados a sus respectivos

alcoholes o ácidos orgánicos (Figura 11). También contribuyen al olor y sabor, ésteres y compuestos de azufre obtenidos por diferentes tipos de vías enzimáticas (Figura 11) (Rodríguez Serrano et al., 2018).

### **3) Inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y facilitan la digestión.**

Existe una exclusión competitiva entre bacterias patógenas y las bacterias lácticas por los sitios de adhesión en el intestino y por los nutrientes. Esto es posible gracias a su capacidad para formar biopelículas y a su capacidad para detectar el “quorum sensing” y comunicarse entre ellas.

Además, gracias a la presencia de bacterias lácticas los productos lácteos fermentados presentan nutrientes que se digieren mejor. El ejemplo clásico es el de intolerancia a la lactosa; las BLs que producen lactasa disminuyen la cantidad de lactosa en el producto fermentado y por consiguiente la intolerancia a este azúcar. También mejoran la eficiencia alimenticia puesto que producen enzimas digestivas, como amilasas, quitinasas, lipasas, fitasas, proteasas, compuestos volátiles y vitaminas B. Todas estas sustancias pueden modificar indirectamente la microbiota, conduciendo a una mejor asimilación de nutrientes por la activación del sistema inmune del huésped (Vieco-Saiz et al , 2019).

## **4. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS.**

Los productos lácteos fermentados son obtenidos intencionadamente añadiendo bacterias ácido lácticas a la leche de vaca, oveja, búfala, cabra etc.

Gracias a la actividad de las bacterias lácticas los productos fermentados presentan diferente contenido en agua, ácido y además reducen la actividad de determinadas enzimas de la leche que pueden afectar a la fermentación láctea. Los cambios en el pH y en el contenido de agua junto a su capacidad para producir bacteriocinas impiden el crecimiento de otros microorganismos favoreciendo su conservación.

A continuación, veremos diferentes tipos de productos lácteos fermentados;

## - Mantequilla

La mantequilla es un producto con alto contenido en grasa que se obtiene a partir de la nata de la leche y contiene agua y otros componentes de la leche, en bajo porcentaje. Dependiendo del contenido en ácidos grasos insaturados, la mantequilla puede tener diferentes texturas.

Para la formación de la mantequilla debemos explicar cómo se obtiene la nata. En primer lugar, la nata que equivale a la grasa de la leche, se separa del resto de los componentes de la leche. La nata debe ser pasteurizada a temperaturas elevadas para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos que como *Streptococcus*, que puedan acelerar la maduración de la mantequilla. La pasteurización también elimina la actividad de enzimas, como las lipasas, que podrían tener efectos perjudiciales sobre la calidad de la nata. Estas enzimas son las responsables de la degradación de los triglicéridos y de la liberación de ácidos grasos que darían flavor desagradable al producto lácteo.

Seguidamente se produce su batido, lo que lleva a la ruptura de las membranas que rodean los glóbulos de materia grasa formadas por fosfolípidos, lipoproteínas y proteínas y entonces permite que se junten los glóbulos de materia grasa formando una masa única (Doyle *et al*, 2018).

A este batido además se pueden adicionar bacterias lácticas como *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, que permiten hidrólisis controlada de la nata, es decir de los triglicéridos (Joo-Ann Ewe y Su-YI Loo, 2016) y otras como *Leuconostoc citovarum* y *Leuconostoc dextranicum*, que producen el diacetilo que da el sabor a la mantequilla. En algunos casos se ha comprobado que uno de los ácidos grasos liberados es el ácido linoleico, importante en la dieta como ácido graso omega que ayuda a disminuir colesterol. La mantequilla contiene bajos porcentajes de este ácido, solo 2%.

## - Kéfir

El kéfir es parecido al yogurt líquido y es producido por una combinación de bacterias del ácido láctico y levaduras que viven en asociación simbiótica en una matriz de lípidos y azúcares. Los nódulos de kéfir tienen un aspecto similar al de la coliflor, pero son más blandos y gelatinosos. Esta asociación es la responsable de proporcionar la síntesis de metabolitos bioactivos, como exopolisacáridos responsables del crecimiento de los granos y la inhibición de patógenos y contaminantes (Moses *et al.*, 2015).

Las bacterias lácticas encontradas son especies homofermentativas, como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Streptococcus*, responsables de la fermentación de la leche. También se han encontrado bacterias heterofermentativas pertenecientes al género *Leuconostoc spp.* que utilizan el citrato y contribuyen al flavor del kéfir y propionibacterias.

En cuanto a las levaduras, se han caracterizado especies de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Candida sp.*, encargadas de producir CO<sub>2</sub> y una pequeña cantidad de alcohol a partir de la rotura de la lactosa (Moses et al., 2015).

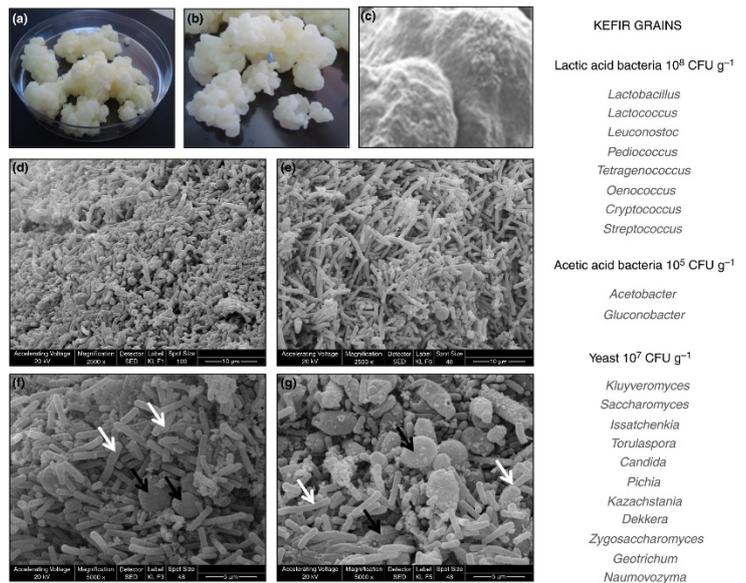
Además del ácido láctico producido por las bacterias lácticas, el ácido propionico que producen las bacterias propionicas y el CO<sub>2</sub> y el alcohol (1-3%) producido por las levaduras, otras sustancias que contribuyen al sabor del kéfir son el ácido pirúvico, ácido acético, diacetilo, acetoína, ácido cítrico, acetaldehído y aminoácidos.

Los microorganismos presentes en el Kefir poseen características probióticas (Rosa DD, et al., 2017). El kéfir lleva beta-galactosidasa, lo que facilita la digestión de la lactosa en personas intolerantes y algunos de sus componentes pueden producir sustancias antagonistas a microorganismos patógenos, como las bacteriocinas.

El Kéfir se obtiene mezclando los nódulos de Kéfir con leche a temperatura ambiente en un recipiente de cristal herméticamente cerrado. Lo que consumimos del Kéfir es la leche fermentada por las bacterias lácticas y levaduras que componen el nódulo, pero no se consume el nódulo, el cual es filtrado y usado para una nueva fermentación.

Este producto es muy parecido, pero no igual, al yogur ya que además de la obtención de ácido láctico, las levaduras presentes, provocan la aparición de alcohol, como etanol y gas en cantidades pequeñas que serán la mayoría eliminados rápidamente en su elaboración a partir de la apertura de vez en cuando del recipiente de cristal donde se hace la mezcla. Se deja en reposo y se agita alguna vez durante las 12-36 horas siguientes. Como resultado, los granos de biomasa aumentan y la concentración de exopolisacáridos también.

La formación del kéfir, depende de la temperatura ambiente que debe ser entre 18 y 30°C. Altas temperaturas conllevan alta acidez del producto, la cual debe ser controlada. Y además depende de la cantidad de nódulos (Bengoa et al., 2018).



**Figura 12:** Representación del Kéfir (Vitonica.com, 2019) y granos del kéfir, izquierda (Bengoa et al., 2018).

## - Yogur

El yogur es un producto lácteo fermentado que consiste en una preparación de leche ácida con pH igual o inferior a 4,6. Los yogures suelen estar formados por leche entera (3% de materia grasa), parcialmente descremada y que ha sufrido previa pasteurización. Seguidamente pasa por un proceso de enfriamiento e inoculación de cultivos de bacterias lácticas y después se incuba a 41°C-45° C tal y como se explica más detalladamente a continuación.

Los yogures se obtienen a partir de mezclas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* (Nagaoka, 2019). La primera bacteria además de ácido láctico produce ácido fórmico, ácido pirúvico y dióxido de carbono, lo que permite el crecimiento de *Lactobacillus*. Los sistemas proteolíticos de *Lactobacillus*, a su vez, hidrolizan las proteínas de la leche, como las caseínas y permiten la formación de péptidos y aminoácidos que estimulan el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*. Además, *Lactobacillus* puede desarrollar una actividad lipolítica que libera ácidos grasos y produce acetaldehído que es fundamental para obtener el aroma del yogur.

El descenso de pH tras la fermentación desencadena la coagulación de las proteínas de la leche, las cuales establecen enlaces entre ellas y acaba formando un gel viscoso.

Hay diferentes tipos de yogures, según sean líquidos o no, con frutas etc, y sus procesos de elaboración no varían mucho. El que se muestra a continuación hace referencia al yogurt seco.

Elaboración del yogurt seco:

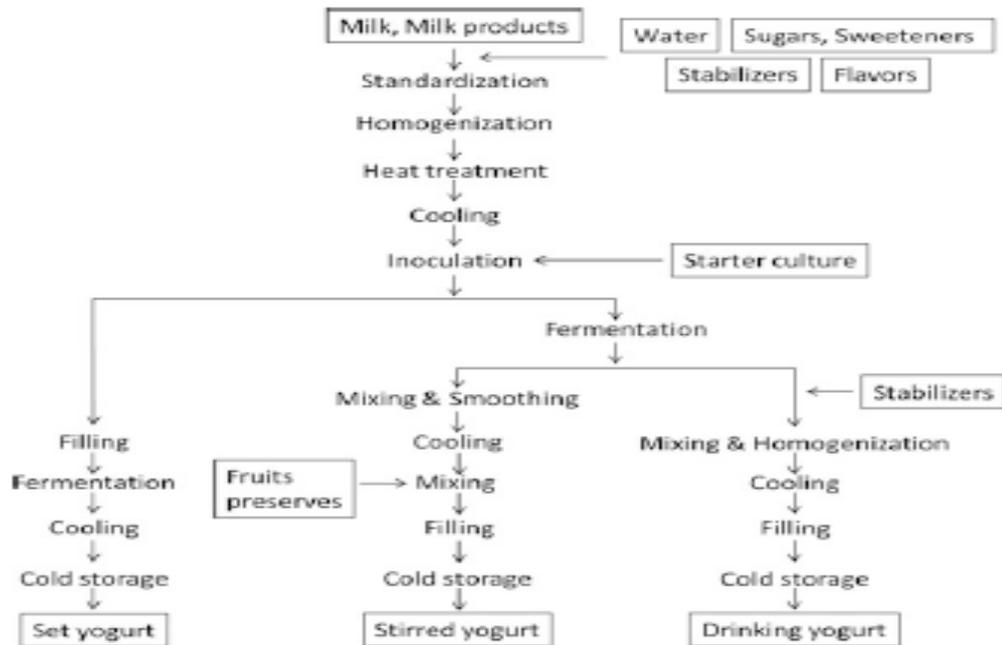
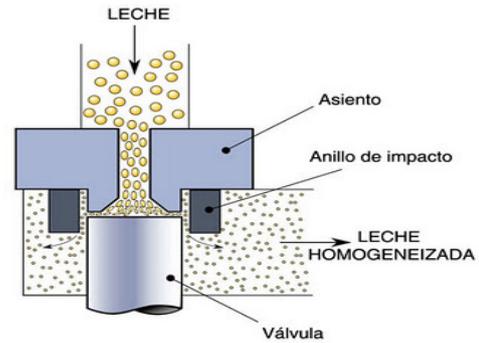


Fig. Manufacturing process of yogurt

Figura 13: Proceso de fabricación del yogurt (Nagaoka, 2019).

1. Estandarización de contenido de grasa de la leche: este proceso puede variar pero en general los yogures que se comercializan se preparan a partir de leche entera con un contenido en grasa entre 0,5-3%. En esta etapa se añaden proteínas como leche descremada, leche concentrada para poder mantener la consistencia de gel del yogurt.
2. Homogenización: Consiste en calentar la leche a 65-70 grados y en pulverizarla haciéndola pasar a través de un filtro, a presión, con objetivo de reducir el tamaño de los glóbulos grasos.

**Figura 14:** Homogenización de la leche(Gominolasdepetroleo.com,2011).



3. Tratamiento térmico, pasteurización: calentamiento a 85 grados durante 20-30 minutos o 90-95 grados durante menos tiempo, unos 5 minutos para desinfectarla.
4. Enfriar el medio de cultivo en un baño de agua fría y mantenerla en un refrigerador.
5. Adición de sabores e inoculación del cultivo de bacterias lácticas, *Lactobacillus delbruekii ssp.bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus* (Nagaoka ,2019).
6. Fermentación: el cultivo de bacterias lácticas convierte la lactosa en ácido láctico a 40-43 ° C hasta que la acidez alcanza el 0,8%, pH que correspondería a 4,6.
7. Enfriamiento: enfriar inmediatamente la leche fermentada en una sala fría (15°C).
8. Almacenamiento en frío: conservar el producto en un frigorífico de 5°C. Con ello se pretende evitar la re-fermentación por parte del inóculo bacteriano que todavía está presente.
9. En algunos casos la última etapa viene determinada por una pasteurización, importante para que no continúe la acidificación. Sin embargo, la mayoría de los yogures que se sitúan en las neveras de los supermercados se vende como “cultivo activo vivo” puesto que todavía contienen las bacterias inoculadas. Por ello todos los yogures son probióticos, y algunos llevan bacterias especiales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* cuya capacidad para colonizar el tracto digestivo es beneficiosa.

## - Queso

El queso es un producto que se obtiene como consecuencia de la separación del suero tras la coagulación de los distintos tipos de leche, o entera, o desnatada o incluso de la nata. Hoy en día, existe una gran variedad de quesos, blandos y duros, y que se diferencian en el sabor, ya sea suave o fuerte, la textura, el color, pero todos ellos comparten un alto contenido en grasa (Cuffia et al, 2019).

En su elaboración se produce primero una fermentación láctica primaria por bacterias lácticas, conocidas como cultivos estárter o iniciadoras, las cuales son distintas según el tipo de queso. Las especies más utilizadas son *Lactococcus lactis subesp. cremoris* en quesos Camembert, quesos azules y Roquefort y bacterias como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii subesp. bulgaricus* en algunos quesos como Mozzarella, Provolone, Romano, y quesos suizos.

Además de estos, muchos tipos de quesos requieren la participación de otros microorganismos denominados microflora secundaria, entre ellas, levaduras, algunas bacterias lácticas y otros microorganismos que llevan a cabo reacciones bioquímicas complejas de obtención de compuestos aromáticos. Por ejemplo, las bacterias *Lactococcus lactis diacetylactis* y *Leuconostoc* permiten metabolizar el ácido cítrico para producir compuestos aromáticos y CO<sub>2</sub> en ciertos quesos como Gouda y Havarti. En otros quesos como Limburger y el Brick, participan cepas bacterianas como *Brevibacterium linens*, mientras que el Camembert y los quesos azules tipo Roquefort son producidos por hongos como *Penicillium camembertii* y *Penicillium roqueforti*, respectivamente (Johnson, 2017).



**Figura 15:** Queso Camembert, a la izquierda (quesosdeeuropa.com , 2020) y a la derecha, el queso Gouda (quesoss.com ,2020).

Todos los tipos de quesos comparten en común algunas etapas para su elaboración.

## Elaboración del queso.

### **1) Preparación de la leche.**

Antes de comenzar a hablar del proceso de elaboración del queso es necesario decir que procede de la leche de las vacas, ovejas, cabras y búfalas sanas. Si la leche esta recién ordeñada suele llevar muy pocos microorganismos.

Se distinguen dos tipos de quesos, según la leche haya sido o no pasteurizada. Los que no se pasteurizan se llaman quesos de leche cruda y debe aparecer en la etiqueta. Para obtener el queso pasteurizado, la leche se somete a temperaturas de entre 70-80° C durante unos 15 segundos con el objetivo de eliminar bacterias patógenas y reducir la cantidad de enzimas como las lipasas, cuya actividad es indeseable. Al calentamiento, le sigue una refrigeración del producto entre 20-22°C durante 30 minutos, imprescindible para prolongar el tiempo de conservación. Se suele realizar la pasteurización tanto en la fabricación de quesos frescos como en la de quesos maduros.

Seguidamente la leche se homogeniza, para ello se somete a altas presiones que destruyen partículas en suspensión y producen leche con una distribución de grasa homogénea sin tendencia a la separación y aumento de viscosidad. Todo ello permite obtener mayor calidad en los productos, mayor valor nutricional, textura y cuerpo (Johnson, 2017).

A continuación, se utilizan “los estarter bacterianos”, es decir bacterias lácticas homofermentativas, no patógenas, que al crecer en la leche durante un tiempo más o menos largo proporcionan la acidez adecuada al medio tras la transformación de lactosa en ácido láctico. A veces se añaden compuestos saborizantes. Este aumento de acidez conlleva una disminución del pH, características adecuadas para acortar el tiempo de coagulación, es decir para la formación del cuajo y así asegurar una buena calidad del queso.

### **2) Coagulación.**

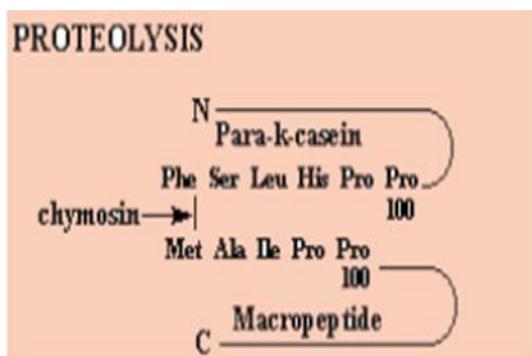
La coagulación de la leche consiste en su transformación de líquido a gel, como consecuencia de las modificaciones fisicoquímicas que sufren las submicelas de caseína. Las caseínas son las proteínas

mayoritarias de la leche y constituyen una familia formada por la alfa 1-caseína, alfa 2-caseína, beta-caseína y kappa-caseína. De ellas solo la kappa-caseína es hidrofílica.

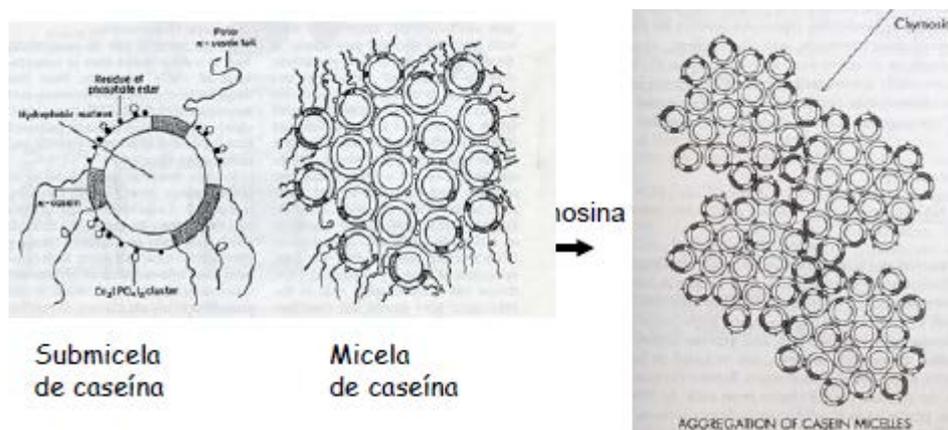
La coagulación enzimática se consigue gracias a la adición del cuajo sobre la leche. El cuajo tradicional es una mezcla de quimosina y pepsina, proteínas excretadas por el cuarto estómago de los rumiantes, que permitirán la hidrólisis específica de la kappa-caseína de las submicelas de la leche y que es el primer paso para la formación de la cuajada.

La quimosina, se sintetiza como pre-pro-quimosina en el citoplasma de las células mucosas, la cual es inactiva. Esta forma contiene la secuencia “pre señal” constituida por 16 aminoácidos, la secuencia “pro” y la quimosina madura. Para la activación de la quimosina, primero se elimina la secuencia “pre señal” quedando la enzima con un peso molecular de 41.000 daltons. Seguidamente en condiciones ácidas se activa totalmente la enzima liberándose la secuencia “pro” lo que deja un peso molecular de 35.000 daltons (Doyle *et al.*, 2018).

La Quimosina una vez activa, hidroliza la kappa-caseína de la submicela de la leche entre la Phe-105 y Met-106, liberando de la submicela de caseína su extremo hidrofílico, que comprende desde la Met 106 hasta el último aminoácido que es el 169. En la submicela queda el segmento 1-105, conocido como paracaseína, de carácter básico e hidrofóbico, capaz de establecer enlaces entre otras submicelas de caseína. Sin la parte hidrofílica no hay formación de capa protectora de agua alrededor de las micelas con carga negativa frente a las cargas positivas del calcio. Esta ruptura conlleva agrupación de muchas submicelas por puentes de hidrogeno entre ellas y la reacción del calcio con los grupos fosfato de las caseínas. Esto es lo que permite dar consistencia a la leche, en forma de gel. Cuando la formación del gel está suficientemente avanzada, se producen enlaces fuertes de puentes disulfuro entre aminoácidos azufrados de la paracaseína, lo que acaba determinando la formación definitiva de la cuajada (Panthi *et al.*, 2019). En definitiva, el cuajo está formado por la agrupación de calcio atrapado en las micelas junto con los granos de grasa, azúcares como la lactosa, aminoácidos de la leche y microorganismos.



**Figura 16:** Ruptura de la kappa-caseína de la caseína de la leche por la quimosina activa presente en la leche. Adaptado de Microbiología de los alimentos (Doyle *et al.*, 2018).



**Figura 17:** Representación de una submicela de caseína y a su lado agrupación de muchas de ellas. Adaptado de Microbiología de los alimentos (Doyle *et al.*, 2018).

La bajada de pH debida a la acidificación hasta aun pH de 5,2 proporciona un medio óptimo a la enzima quimosina. De esta manera la etapa de coagulación es más corta y el gel más duro, debido a que este medio ácido permite la salida de iones de calcio de la micela y la neutralización de las cargas eléctricas entre micelas, necesario para iniciar gelificación. Sin embargo, valores de pH por debajo de 5,2 o superiores a 7, la enzima no es activa.

Hoy en día, hay sustitutos de la enzima quimosina del cuajo para la elaboración de quesos. Se utilizan enzimas proteolíticas como metaloproteasas procedentes de hongos como *Termitomyces clypeatus* MTCC-5091, de *Rhizomucor miehei*, *Cryphonectria parasitica* (Majumder *et al.*, 2015). También se utilizan coagulantes vegetales, procedentes de flores y estratos de la hierba-cuajo, en el cual se han visualizados dos proteinasas, la cardosina A y la cardosina B; que tienen una actividad proteolítica alta y enzimas vegetales como *Cynara cardunculus*, utilizado en la fabricación de la Torta del Casar y quesos parecidos.

Podemos encontrar algunas enzimas recombinantes, se tratan de mezclas de peptidasas y proteasas o proteasas y lipasas, entre ellas las más utilizadas son las proteasas neutras de *Bacillus subtilis*. También, se ha clonado el gen de la quimosina de terneras lechales y se ha expresado en algunos microorganismos (*E. coli*, *S. cerevisiae*, *Trichoderma ...etc*) a partir de los cuales se produce la quimosina recombinante.

### **3) Deshidratación, salado y maduración.**

El proceso de deshidratación comienza con el corte de la cuajada con cuchillas y va seguida de un tratamiento térmico que tiene por finalidad la expulsión del suero de manera suave. La cantidad de suero que se libera viene determinada por el tamaño de grano de cuajada cortado. Por ejemplo, para quesos blandos, es necesario cortar la cuajada en tamaños grandes, como un haba. El proceso debe realizarse de forma lenta para evitar que se pierda demasiada grasa y cuajada antes del primer desuerado.

En el caso de la temperatura, su aumento favorece el desuerado, ayudando a la formación de enlaces intermoleculares entre la cuajada. Además, con el calor los granos de cuajada se encogen y sueltan suero.

Seguidamente al proceso de deshidratación se produce el salado que permite seguir extrayendo el suero y así evitar grietas en el queso. El aporte de sal da sabor al queso, reduce la actividad del agua, evita la proliferación de ciertos microorganismos y controla la intensidad de la proteólisis de las alfa-s1 y beta-caseínas, mejorando la apariencia y consistencia de los quesos (Manuel. Instituto Nacional de investigación agropecuarias de Ecuador, 1991).

La maduración del queso implica la modificación de proteínas y grasas por lipasas microbianas, presentes en la leche y también influye la temperatura. En muchos casos la maduración se completa con la adición de inóculo microbiano (microflora secundaria) u otros aditivos como especias o hierbas aromáticas, que acaban determinando la textura del queso y la producción de algunas sustancias responsables del gusto y del aroma (Johnson, 2017).

## 5. CONCLUSIÓN.

Es a partir del desarrollo de la ingeniería genética que se ha podido descubrir nuevas técnicas que nos permiten elaborar nuevas formulaciones lácteas especiales que satisfacen necesidades en el mercado. Entre ellos están:

- 1) La estabilización de genes codificados por plásmidos por integración cromosómica en los cultivos de bacterias estarter.
- 2) El desarrollo de cultivos estarter resistentes a bacteriofagos.
- 3) La producción de compuestos antimicrobianos naturales, como la Nisina.
- 4) La mejora de la textura, el sabor, la aceleración de la maduración de los quesos.

Hoy en día se aplican técnicas de clonación que permiten que se clonen los genes de bacterias que participan en la resistencia a bacteriófago con el fin de traspasarlos a bacterias que no lo son e inducir la resistencia. También se han clonado y caracterizado los genes que codifican bacteriocinas, como la Nisina, muy utilizada como “biopreservante” en la conservación de alimentos y otros genes que codifican enzimas, como la quimosina que participa en la coagulación de la leche para producir queso. Muchos de estos genes están codificados por plásmidos, es decir su es ADN extracromosómico y puede ser transferido a bacterias que carecen de ellos (Kok *et al.* ,2017).

Se ha demostrado que la cepa resistente mejor caracterizada frente a bacteriofagos es la cepa *Lactococcus lactis* ME2. Esta cepa tiene al menos 5 loci distintos de defensa frente a los fagos, con genes que pueden ser clonados en huéspedes heterólogos (*Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*). Esto ha permitido un gran avance en la lucha contra las contaminaciones por bacteriófagos en la actualidad. Las infecciones por bacteriófagos pueden conducir a un descenso o una inhibición completa de la producción de ácido láctico si el cultivo iniciador está infectado que tiene como resultado unos productos de menor valor económico.

La quimosina es muy importante en la elaboración del cuajo en la manufactura de quesos. Los primeros ensayos de clonación de la renina o quimosina se realizaron en cepas bacterianas de *Escherichia coli*, aunque posteriormente se ha expresado también en levaduras y hongos. A partir del mRNA correspondiente a la enzima quimosina, extraída del estómago de los rumiantes, se obtuvo el cDNA y se insertó en un vector de clonación con un promotor procariota responsable de su expresión. Actualmente la gran mayoría de los quesos se obtienen con quimosina recombinante producida a partir de un organismo modificado genéticamente (Doyle *et al*, 2018).

## 1. BIBLIOGRAFIA

- Bengoa, A., Iraporda, C., Garrote, G.L y Abraham, A.G. kéfir micr-organisms :their role in grain assembly and health properties of fermented milk. Journal of Applied Microbiology. ((1), 364-5072). Disponible en : <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jam.14107>
- Brewersjournal. Pediococcus. Brewersjournal.info, 2016. (Consulta de :20 de septiembre). Disponible en : <http://microenalimentos.blogspot.com/2016/04/leuconostoc.html>
- Cheesescience. Lactobacillus helveticus. Bacteria estarter en el queso Gouda. Cheesescience.org, 2019. (Consulta de :20 de septiembre). Disponible en: <https://www.cheesescience.org/microbes.html>
- Cheesescience .Penicillium Camemberti. Microflora secundaria en el queso Camembert. Cheesescience.org, 2019. (Consulta de :20 de septiembre). Disponible en: <https://www.cheesescience.org/microbes.html>
- Cheesescience. Propionibacterium freundenreichii. Microflora secundaria en los quesos suizos. . Cheesescience.org, 2019. (Consulta de :20 de septiembre). Disponible en : <https://www.cheesescience.org/microbes.html>
- Christensen , M. y Pederson, C. (1958). Factors Affecting Diacetyl Production by Lactic Acid Bacteria'. New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York, (1, 1-4). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1057422/pdf/applmicro00319-0035.pdf>
- Cuffia ,F. , Bergamini , C. , Wolf, I. , Hynes ,E. , Perotti y M. (2019). Influence of the culture preparation and the addition of an adjunct culture on the ripening profiles of hard cheese. Journal of Dairy Research, (86 (1), 120-128). Disponible en : <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1017/S0022029918000870>
- Doyle M., R. Beuchat Larry, J. Montville Thomas (2018). Adaptado del libro de Microbiología de los alimentos. American Society for Microbiology.
- Istockphoto. Streptococcus thermophilus. Istockphoto.com, 2016 .( Consulta de: 10 septiembre 2019). Disponible en : <https://www.istockphoto.com/es/foto/las-bacterias-streptococcus-thermophilus-gm1077227180-288537121>
- Johnson, M. (2017). A 100-Year Review: Cheese production and quality. Journal of Dairy Science, (100, 9952-9965). Disponible en : [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(17\)31054-8/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(17)31054-8/fulltext)
- Joo-Ann Ewe y Su-YI Loo, (2016). Effect of cream fermentation on microbiological, physicochemical and rheological properties of L. helveticus-butter. Food chemistry, (201, 29-36). Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1016/j.foodchem.2016.01.049>
- Kok ,J. , van Gijtenbeek ,L. , de Jong, A. , van der Meulen ,S. , Solopova , A. y Kuipers , O. (2017). The Evolution of gene regulation research in Lactococcus lactis. FEMS microbiology reviews, (41 (1), 220-243). Disponible en : [https://academic.oup.com/femsre/article/41/Supp\\_1/S220/4084363](https://academic.oup.com/femsre/article/41/Supp_1/S220/4084363)
- Lifeder. Lactobacillus delbrueckii. lifeder.com, 2016.( Consulta de: 10 septiembre 2019). Disponible en : <https://www.lifeder.com/lactobacillus-delbrueckii/>

- Lifeder. *Lactococcus lactis*. lifeder.com, 2016. (Consulta de: 10 septiembre 2019). Disponible en: <https://www.lifeder.com/lactococcus/>
- López, JM., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, JL., Medina, E., Martínez, M., Damián, P. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas* (39(3), 49-57). Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57911110007.pdf>
- Majumder, R., Banik, S. y Khowala, S. (2015). Purification and characterisation of  $\kappa$ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. *Food Chemistry*, (2015, 441-448). Disponible en: <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.027>
- Martín del Campo M., Cástulo I.; Gómez H., Héctor E.; Alaníz de la O., Ricardo (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *E-Gnosis*. (6, 1-17). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005>
- Martini, M., Salari, F., Altomonte, I., Ragona, G., Piazza, A., Gori, R., Casati, D. y Brajon, G. (2018). Effects of pasteurization and storage conditions on donkey milk nutritional and hygienic characteristics. *Journal of Dairy Research*, (85 (4), 445-448). Disponible en: <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1017/S0022029918000687>
- Moses y Deeseenthum, S. (2015). Properties and benefits of Kefir-A review. *Songklanabakarini J. Sci. Technol.* (37(3), 275-282). Disponible en: <https://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/37-3/37-3-5.pdf>
- Nagaoka, S. (2019). Yogurt production. *Methods in Molecular Biology*, (1887, 45-54). Disponible en: [https://sci-hub.tw/10.1007/978-1-4939-8907-2\\_5](https://sci-hub.tw/10.1007/978-1-4939-8907-2_5)
- Özcan, E., Selvi, S., Nikerel, E., Teusink, B., Toksoy, Öner, E. y Çakır, T. (2019). A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (3 (7), 3153-3165). Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1007/s00253-019-09630-4>
- Panthi, R., Kelly, A., Sheehan, J., Bulbul, K., Vollmer, A. y McMahon, D. (2019). Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *Journal of Dairy Science*, (102 (1), 177-189). Disponible en: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(18\)31062-2/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(18)31062-2/fulltext)
- Poolman, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, (12, 125-148). Disponible en: <https://academic.oup.com/femsre/article/12/1-3/125/492599>
- Probióticos y salud. El metabolismo de la lactosa. Ruta de Leloir y de la Tagatosa. *Probioticosysalud.com*, 1996. Disponible en: <https://www.probioticosysalud.com/tesis-doctoral/introduccion/iv-metabolismo-de-la-lactosa-y-regulacion-del-operon-lac-de-lactobacillus-casei/iv-1-transporte-y-metabolismo-de-la-lactosa-en-bacterias-lacticas/iv-1-1-ruta-de-leloir/>
- quesosdeeuropa. Queso Camembert. *quesosdeeuropa.com*, 2020. (Consulta de 1 de enero 2020). Disponible en: <https://quesosdeeuropa.com/queso/camembert/>
- quesoss. Queso Gouda. *quesoss.com*, 2020. (Consulta de 1 de enero 2020). Disponible en: <https://quesoss.com/gouda/>

- Rodríguez Serrano ,G. ,García-Garibay,J. ,Cruz-Guerrero,A., Gómez-Ruiz, L., Ayala-Niño A., Castañeda-Ovando ,A. y González-Olivares ,L. (2018). Proteolytic system of streptococcus thermophilus. Journal of Microbiology and Biotechnology, (28 (10), 1581-1588).Disponible en : [http://www.jmb.or.kr/submission/Journal/028/JMB028-10-01\\_FDOC\\_1.pdf](http://www.jmb.or.kr/submission/Journal/028/JMB028-10-01_FDOC_1.pdf)
- Rosa DD , Dias MMS, Grzėskowiak LM, Reis SA, Conceiçao LL y Peluzio MDCG (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. Nutrition Research Reviews (1,1-15).Disponible en: <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Sciencesource.com. Leuconostoc lactis. Sciencesource.com, 2019 ( Consulta de :20 septiembre 2019). Disponible en : <https://www.sciencesource.com/archive/Leuconostoc-mesenteroides-SS2108448.html>
- Shin J.M , Gwak JW., Kamarajan P., Fenno JC., Richard AH. Y Kapilla YL (2015). Biomedical Applications of Nisin. Journal of Applied Microbiology.(120,1-17).Disponible en : <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jam.13033>
- Slideplayer. Estructura de la Nisina, una bacteriocina.Slideplayer.es, 2014. (Consulta de: 1 de octubre 2019). Disponible en : <https://slideplayer.es/slide/13037595/>
- Smit , G. ,Smit, B. y Engels ,W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiology Reviews, (29, 591-610). Disponible en : <https://academic.oup.com/femsre/article/29/3/591/546865>
- Speckman ,R., Nd ,A. y Collins , E. (1968). Diacetyl Biosynthesis in Streptococcus diacetilactis and Leuconostoc citrovorum. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, (1, 174-180). Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC251989/pdf/jbacter00399-0202.pdf>
- Thompson , J. (1979). Lactose Metabolism in Streptococcus lactis: Phosphorylation of Galactose and Glucose Moieties In Vivo. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, (140 (3), 774-785). Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC216715/pdf/jbacter00277-0038.pdf>
- Vieco-Saiz , N., Belguesmia ,Y., Raspoet ,R., Auclair ,E. , Gancel, F., Kempf y I., Drider D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Frontiers in Microbiology, (10, 1-33). Disponible en : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00057/full>
- Vitonica. Representación del Kefir.Vitonica.com, 2019. (Consulta de: 1 de enero 2020). Disponible en : <https://www.vitonica.com/alimentos/kefir-propiedades-beneficios-su-uso-cocina->

