

PRODUCCIÓN DE ACETALDEHÍDO EN LECHE POR CULTIVOS INICIADORES SIMPLES Y MÚLTIPLES

Production of Acetaldehyde in Milk by Single and Multiple Starter Cultures

Lilibeth Cabrera, Alexis Ferrer, Graciela Ojeda de Rodríguez y Gisela Colina

Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526.
Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela.

RESUMEN

A cultivos simples y múltiples con leche descremada reconstituida al 10% estéril, constituidos por once cepas de *Enterococcus faecalis*, siete cepas de *Lactobacillus casei* y cuatro cepas de *Enterobacter aerogenes*, se les determinó la producción de acetaldehído, utilizando la técnica cromatográfica (GC) headspace. Los cultivos fueron previamente colocados en baño de agua a 60°C para permitir el paso del acetaldehído a su estado gaseoso. Los resultados mostraron la producción activa de acetaldehído por parte de las cepas bacterianas en cultivos simples y múltiples con diferencias significativas entre especies y entre cepas de la misma especie ($P < 0,05$). Las cepas de *E. aerogenes* Ea1 y Ea2 y de *E. faecalis* Ef7, Ef8, Ef9 y Ef10 produjeron los mayores niveles de acetaldehído en cultivos simples (5,8-6,0 ppm y 2,6-2,8 ppm, respectivamente) mientras que las cepas de *L. casei* produjeron los niveles menores (0,4-0,6 ppm). En cultivos múltiples, las combinaciones *Enterococcus-Enterobacter* produjeron más acetaldehído (2,9 ppm, $P < 0,05$) que las combinaciones *Lactobacillus-Enterobacter* (2,5 ppm) y las *Enterococcus-Lactobacillus-Enterobacter* (2,1 ppm). Debido a que todas las combinaciones produjeron concentraciones relativamente similares de acetaldehído, se recomienda el uso de cualquiera de ellas para garantizar el sabor y olor característicos del queso tipo Palmita.

Palabras clave: Acetaldehído, cultivos iniciadores, leche, queso, headspace GC.

ABSTRACT

The production of acetaldehyde was determined by headspace GC in single and multiple cultures on sterilized reconstituted (10%) skim milk consisting of eleven strains of *Enterococcus*

faecalis, seven strains of *Lactobacillus casei* and four strains of *Enterobacter aerogenes*. The cultures were previously placed in a 60°C water bath in order to vaporize the acetaldehyde. The results showed the active production of acetaldehyde by the bacterial strains in single and multiple cultures, with significant differences among species and among strains of the same species ($P < 0.05$). The strains of *E. aerogenes* Ea1 y Ea2 and the strains of *E. faecalis* Ef7, Ef8, Ef9 and Ef10 produced the highest levels of acetaldehyde in single cultures (5.8-6.0 ppm and 2.6-2.8 ppm, respectively), whereas the strains of *L. casei* produced the lowest levels (0.4-0.6 ppm). In multiple cultures, *Enterococcus-Enterobacter* combinations produced more acetaldehyde (2.9 ppm, $P < 0.05$) than *Lactobacillus-Enterobacter* (2.5 ppm) and *Enterococcus-Lactobacillus-Enterobacter* (2.1 ppm) combinations. Since all the combinations produced relatively similar acetaldehyde concentrations, any of them could be used to guarantee the characteristic flavor of Palmita – type cheese.

Key words: Acetaldehyde, starters, milk, cheese, headspace GC.

INTRODUCCIÓN

El acetaldehído es producido por una serie de cultivos iniciadores lácticos. Es componente esencial de sabor y aroma de muchos productos lácteos fermentados tales como: mantequilla, crema agria y quesos [9, 11, 13, 14, 15, 21].

La producción de acetaldehído por parte de los microorganismos proviene de la fermentación de la glucosa y, a pesar de que es reconocido como un constituyente de sabor y aroma en ciertos productos lácteos, una excesiva concentración del mismo en el yogurt, determina sabores desagradables [17]. Son numerosas las bacterias productoras de acetaldehído. Este compuesto suele estar asociado a especies y cepas de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedio-*

coccus [3, 4, 5, 19] y *Enterococcus* [8, 10, 17]. Cepas de *Enterococcus faecalis* han resultado productoras de compuestos asociados con el aroma de productos lácteos de la India [12]. Los estreptococos lácticos, forman acetaldehído y ocurre durante el crecimiento activo del microorganismo [16]. *L. casei* genera acetaldehído como uno de sus más importantes productos volátiles en queso de Bulgaria [1, 11]. En general son varios los lactobacilos asociados con la producción de acetaldehído, entre los que se mencionan a *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum* y *L. brevis*.

En cuanto a la determinación del acetaldehído, existe información referente a métodos analíticos espectrofotométricos [13, 18], como cromatográficos [1, 17, 19, 20, 21] que contribuyen con la detección de concentraciones de dicho compuesto bajo condiciones previas de evaluación y estandarización debido a su alta volatilidad.

En el orden de conocer las actividades metabólicas inherentes a cultivos iniciadores en lo referente a la producción de compuestos asociados con el aroma y sabor de productos lácteos, tales como el acetaldehído, se planteó en el presente estudio, la evaluación de la producción de dicho compuesto, utilizando la técnica cromatográfica – *headspace*, en cultivos iniciadores simples y múltiples constituidos por cepas de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* y *Enterobacter aerogenes*, previamente aisladas del queso tipo Palmita, con el fin de seleccionar aquellas cepas que muestren mayor producción en cultivos simples y selección de especies bacterianas generadoras de niveles considerables en cultivos múltiples.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de los cultivos

Once (11) cepas de *E. faecalis* (Ef), siete (7) de *L. casei* (L) y cuatro (4) de *E. aerogenes* (Ea) aisladas previamente de queso tipo Palmita Comercial [6], se cultivaron en 12 mL de leche descremada estéril (112°C por 12 min) y reconstituida (LDER, 10% de sólidos totales) e incubadas a 35°C durante 18h. A partir de estos cultivos se prepararon los cultivos simples y múltiples por duplicado.

Cultivos iniciadores simples y múltiples

Los cultivos iniciadores simples fueron preparados según condiciones de inoculación e incubación descritos por Cabrera y col. [6].

Determinación cromatográfica de la concentración de acetaldehído en los cultivos iniciadores simples y múltiples

La determinación cromatográfica fue desarrollada modificando el método descrito por Lum y col. [19] para la determinación de acetaldehído por la técnica de *headspace* en jugos de naranja. En su estandarización fue necesario determinar

previamente el tiempo de equilibrio del acetaldehído, donde ocurre el pase a su estado gaseoso. Se prepararon soluciones de acetaldehído a la concentración de 7 mM en volúmenes de 5 mL y en viales con capacidad de 10 mL. Luego las muestras por triplicado, fueron colocadas en un baño de agua a 60°C a diferentes tiempos de exposición de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 min. Lecturas cromatográficas por triplicado fueron realizadas en cada tiempo. Los valores promedios obtenidos del área del pico correspondiente al acetaldehído, fueron graficadas contra los valores de tiempo de exposición. Para el análisis cromatográfico de los cultivos iniciadores simples y múltiples se utilizaron viales de 10 mL de capacidad, conteniendo 5 mL de leche descremada al 10%. Luego se sellaron herméticamente con tapones de goma y tapas de aluminio. Los viales una vez esterilizados en autoclave por 12 min a 112°C, fueron inoculados por triplicado, con las cepas bacterianas con una jeringa estéril de 1 mL, en porcentajes de inóculo (2% para *E. faecalis* y *L. casei* y 0,002% para *E. aerogenes*) y condiciones de incubación descritos por Cabrera y col. [6]. Después del período de incubación los viales se colocaron en un baño de agua a 60°C durante 30 min. Cada vial se colocó en un baño de agua, con una diferencia de 2 min, la cual correspondió al tiempo de corrida de cada muestra en el cromatógrafo. Posteriormente de cada vial (cultivo iniciador), se tomó 1 mL de gas con una jeringa de 3 mL e inmediatamente se inyectó en un Cromatógrafo de Gas con Detector de Ionización a la llama Varian, modelo 3300 acoplado a un integrador Varian, modelo 4400. Las condiciones cromatográficas utilizadas aparecen resumidas en la TABLA I. La columna cromatográfica empleada fue de 6' x 1/8" x 0,85" p/w de acero inoxidable con Porapak Q 80/100 mesh como material de empaque.

Estimación de la concentración de acetaldehído

La estimación de la concentración de acetaldehído en los cultivos iniciadores simples y múltiples se realizó utilizando el Método del Estándar Externo, con tres concentraciones del patrón de acetaldehído en solución acuosa. También se utilizó el método de adición estándar por considerarse la leche una matriz más compleja y que el acetaldehído no es el único producto del metabolismo bacteriano. Las soluciones patrones de acetaldehído fueron 0,004 mM, 0,05 mM y 0,1 mM, preparadas a partir de una solución patrón de 10 mM, en viales de 5 mL, sellados herméticamente con tapones de goma y tapas de aluminio. Las soluciones fueron preparadas en un ambiente de 4°C y mantenidos allí hasta el momento de su colocación en el baño de agua a 60°C durante 30 min. Finalmente, cada patrón fue inyectado por triplicado en el cromatógrafo bajo las condiciones descritas en la TABLA I.

Análisis estadístico

A los promedios de los valores de acetaldehído producidos por los cultivos iniciadores simples y múltiples, se le hizo un análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA realizado sobre determinada variable resultó significativo, a los prome-

TABLA I
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE ACETALDEHÍDO
EN CULTIVOS SIMPLES Y MÚLTIPLES

Condiciones Cromatográficas	
Gas Nitrógeno	30 mL/min
Gas Hidrógeno	30mL/min
Aire	300 mL/min
Temperatura del Horno	140°C
Temperatura del Inyector	180°C
Temperatura del Detector	190°C
Rango	10
Tiempo de Corrida *	2 min
Atenuación	14
Condiciones de la muestra	
Tiempo de equilibrio	30 min
Temperatura del baño de agua	60°C
Volumen de Inyección	1 mL
Volumen de cada vial	10 mL

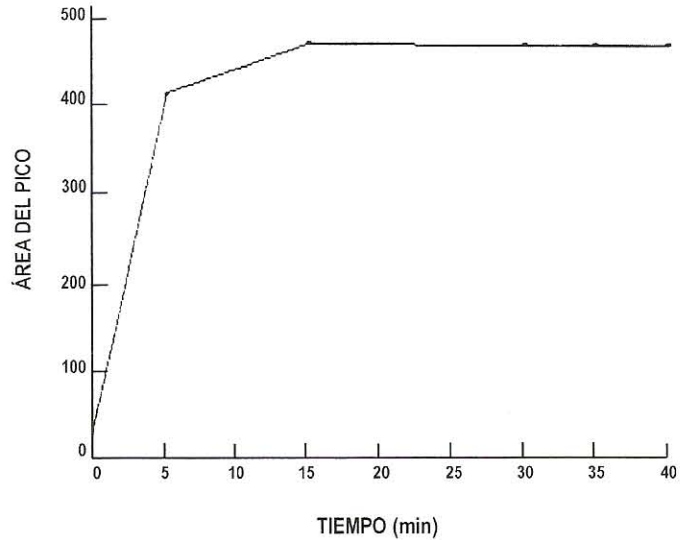
dios de los tratamientos, según el número de las muestras, se les aplicó la prueba de múltiple rango de Duncan, lo cual permitió ubicar la significación [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de concentraciones de acetaldehído en cultivos simples

En la FIG.1 se observa la curva de equilibrio del acetaldehído, encontrándose que entre 15 y 30 min hay una fase estacionaria donde la concentración de acetaldehído en la fase gaseosa está en equilibrio con la concentración del mismo en la fase líquida. Fue seleccionado 30 min como tiempo de equilibrio del acetaldehído. La FIG. 2 muestra la curva de calibración para las soluciones patrones de acetaldehído empleadas con una buena linealidad.

La TABLA II muestra los niveles de acetaldehído producidos por cepas de *E. faecalis*, *L. casei* y *E. aerogenes* en cultivos iniciadores simples, con diferencias significativas a un nivel del 0,05%, lo que indica una gran variabilidad entre cepas. Los cultivos con *E. faecalis* Ef7, Ef8, Ef9 y Ef10 y con *E. aerogenes* Ea1 y Ea2, mostraron los mayores niveles de acetaldehído, mientras que los cultivos con cepas de *L. casei* resultaron con niveles muy bajos de acetaldehído con diferencias no significativas ($P < 0,05$) entre las cepas. Comparando los valores promedios de los cultivos simples entre sí, TABLA III, los cultivos con cepas de *E. aerogenes* resultaron los mayores productores de dicho compuesto.



TEMPERATURA DE EQUILIBRIO = 60°C

FIGURA 1. CURVA DEL EQUILIBRIO DEL ACETALDEHÍDO.

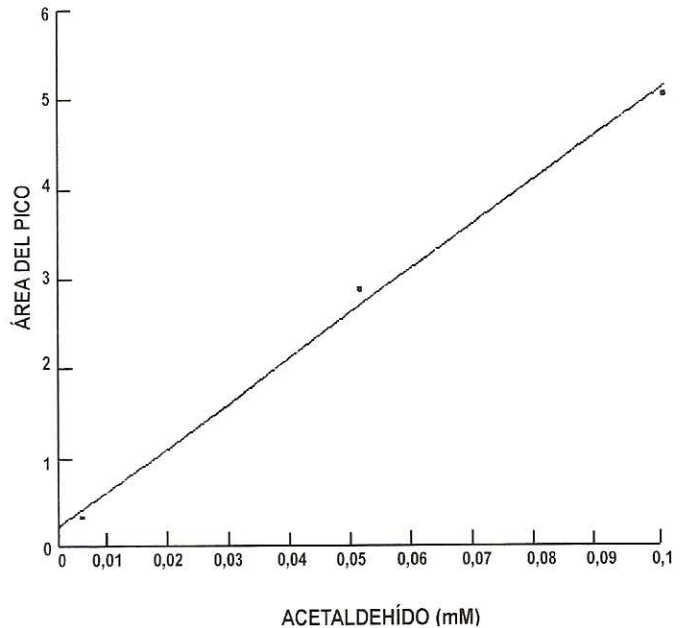


FIGURA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ACETALDEHÍDO.

La producción de acetaldehído por parte de especies de *E. faecalis*, *L. casei* y *E. aerogenes*, ha sido observada en cultivos iniciadores simples. Bassette y col. [1] han reportado a *E. faecalis* var. *liquefaciens* como productor de compuestos volátiles como el acetaldehído y diacetilo en cultivos simples en leche descremada, y a su vez resulta con niveles mayores que los aportados por especies de *L. casei* y *L. acidophilus*. En cultivos iniciadores simples con cepas de estreptococos se han llegado a reportar niveles de acetaldehído en un rango entre 2,3-3,2 ppm [18]. El-Samragy y col. [8] resaltan la producción de acetaldehído por parte de cepas de *Enterococcus* en el yo-

TABLA II
PRODUCCIÓN DE ACETALDEHIDO (PPM) EN LECHE POR CULTIVOS INICIADORES SIMPLES

Especie bacteriana	Cepa	Acetaldehído (ppm)	DE (±)	CV (%)
<i>E. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	Ef1	0,9 ^e	0,0	0,6
	Ef2	1,9 ^{bc}	0,1	5,8
	Ef3	2,3 ^{ab}	0,1	3,8
	Ef4	1,6 ^{cd}	0,2	10,7
	Ef5	1,5 ^{cd}	0,2	11,9
	Ef6	1,3 ^{de}	0,3	23,2
	Ef7	2,8 ^a	0,3	8,9
	Ef8	2,8 ^a	0,1	4,4
	Ef9	2,6 ^a	0,1	2,0
	Ef10	2,7 ^a	0,5	17,4
	Ef11	1,9 ^{bc}	0,2	11,1
<i>L. casei</i>	L1	0,5 ^a	0,1	22,7
	L2	0,6 ^a	0,1	16,8
	L3	0,5 ^a	0,0	0,0
	L4	0,6 ^a	0,1	21,5
	L5	0,6 ^a	0,0	4,0
	L6	0,6 ^a	0,1	14,2
	L7	0,4 ^a	0,0	5,3
<i>E. aerogenes</i>	E1	5,8 ^a	0,3	5,0
	E2	6,0 ^a	0,2	2,6
	E3	2,3 ^c	0,4	17,4
	E4	3,4 ^b	0,4	11,9

DE: Desviación Estándar. CV: Coeficiente de Variación. ^{a, b, c, d, e}: Coeficientes de Duncan (P < 0,05).

gurt de Egipto, al igual que Hagrass y col. [12] en productos lácteos de la India.

Con respecto a los coliformes, Bawdon y Bassette [2] mencionan que cepas de *E. aerogenes* producen acetaldehído cuando son crecidas en leche descremada estéril a 35°C por 24 h al igual que *Escherichia coli*. En el presente estudio, las cepas de *Enterobacter* produjeron niveles considerables de acetaldehído, aún a concentraciones del 0,002% v/v [6], y a las mismas condiciones de temperatura de incubación.

Determinación de concentraciones de acetaldehído en cultivos múltiples

La TABLA IV muestra valores de concentración de acetaldehído en cultivos múltiples, con diferencias significativas (P < 0,05). Los cultivos A resultaron con los mayores niveles de acetaldehído, seguidos de los C y por último los B. Los cultivos con *E. faecalis* y *E. aerogenes* presentaron un valor promedio similar (2,9 ppm) a los producidos por ciertas cepas de *E. faecalis* en cultivos simples, y menor con respecto a los cultivos simples con *E. aerogenes*, 4,4 ppm, TABLA III, lo que revela diferencias por efecto de interacciones entre especies distintas que condujo a la disminución evidente de la producción de acetaldehído por parte de las enterobacterias Ea1 y Ea2.

TABLA III
VALORES PROMEDIO DE ACETALDEHÍDO OBTENIDOS EN CULTIVOS INICIADORES SIMPLES

Cultivo	Concentración (ppm)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,4 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,0 ^b
<i>Lactobacillus casei</i>	0,5 ^c

^{a, b, c}: Coeficientes de Duncan (P < 0,05).

TABLA IV
VALORES PROMEDIOS DE ACETALDEHÍDO (PPM) OBTENIDOS EN LOS CULTIVOS INICIADORES MÚLTIPLES

Cultivo	Especies Bacterianas	Acetaldehído (ppm)
A	<i>E. faecalis</i> y <i>E. aerogenes</i>	2,9 ^{1,a}
B	<i>L. casei</i> y <i>E. aerogenes</i>	2,5 ^{2,b}
C	<i>E. faecalis</i> , <i>L. casei</i> y <i>E. aerogenes</i>	2,1 ^{3,c}

A: cultivos con las cepas Ef7, Ef8, Ef9, Ef10, Ef11, Ea1, Ea2.

B: cultivos con las cepas L1, L2, L3, Ea1, y Ea2.

C: cultivos con las cepas Ef7, Ef8, Ef9, Ef10, L1, L2, L3, Ea1 y Ea2.

1: media de 6 cultivos. 2: media de 3 cultivos. 3: media de 12 cultivos. ^{a, b, c}: Coeficientes de Duncan (P < 0,05).

En el caso de los cultivos con *L. casei* y *E. aerogenes* los valores sobrepasan los aportados por las cepas de lactobacilos en cultivos simples, pero todavía resulta menor que la aportada por las cepas de *Enterobacter* Ea1 y Ea2 en cultivos simples, TABLA II, quizás debido a la utilización del acetaldehído producido por las cepas de *Enterobacter* por parte de los lactobacilos, ya que existe evidencia en la literatura de este hecho para cultivos con *E. faecalis* y *E. aerogenes* [1]. Dado que las mezclas dieron valores en el mismo orden, cualquiera de las combinaciones tienen un buen potencial de ser utilizados para producir acetaldehído como parte del aroma y sabor en el queso tipo Palmita.

Al comparar los valores de acetaldehído obtenidos en los cultivos simples con los cultivos múltiples, *E. faecalis*, *L. casei* y *E. aerogenes* son capaces de generar compuestos volátiles asociados con el sabor y aroma en productos lácteos, ya sea en forma individual o combinadas en cultivos en leche, en niveles superiores a los reportados por otros autores. Así Lindsay y Day [17] reportan niveles entre 0,1 y 1,1 ppm de acetaldehído en cultivos mixtos con estreptococos. Litopoulou y Vafopoulou [18] señalan niveles de 0,3 y 0,4 ppm de acetaldehído en cultivos en leche constituida por cepas de *Enterococcus durans*, *Streptococcus diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus*; y por *L. casei* y *S. thermophilus*, respectivamente, bajo condiciones de incubación similares a las ejecutadas en el presente trabajo. Como los quesos tipo Palmita necesitan iniciadores que incluyen enterococos y/o lactobacilos junto con *Enterobacter* [7] y todas las combinaciones produjeron niveles relativamente similares (2,1-2,9 ppm) de acetaldehído, se considera que cualquiera de las tres combinaciones puede ser utilizada para la elaboración de queso tipo Palmita con características organolépticas adecuadas.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que las cepas de *E. aerogenes* Ea1 y Ea2 y *E. faecalis* Ef7, Ef8, Ef9 y Ef10 produjeron los mayores niveles de acetaldehído en cultivos simples. En cultivos múltiples cualquiera de las combinaciones genera niveles de acetaldehído requeridos para la elaboración de un producto lácteo con características organolépticas deseables y controlables, como es el sabor y olor.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) por el financiamiento que hizo posible este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BASSETTE, R.; BAWDON, R.; CLAYDON, T. Production of volatile materials in milk by some species of bacteria. **J. Dairy Sci.** 50: 167-171. 1967.

- [2] BAWDON, R.; BASSETTE, R. Differentiation of *Escherichia coli* and *Aerobacter aerogenes* by Gas-Liquid Chromatography. **J. Dairy Sci.** 48: 624-627. 1966.
- [3] BEYENE, F.; NARVHUS, J.; ABRAHAMSEN, R. Evaluation of new isolates of lactic acid bacteria as a starter for cultured milk production. **Sinet Ethiopian J. Sci.** 21: 67-80. 1998.
- [4] BIEDE, S.; REINBOLD, G.; HAMMOND, E. Influence of *Lactobacillus bulgaricus* on commercial Swiss cheese. **J. Dairy Sci.** 59: 834-857. 1976.
- [5] BOTTAZI, V.; DALLAGLIO, F. Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other streptococci. **J. Dairy Sci.** 34: 109-113. 1967.
- [6] CABRERA, L.; FERRER, A. Contenido de acidez en leche descremada inoculada con cepas de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*. **Rev. Cient. FCV-LUZ.** VI (1): 37-43. 1996.
- [7] CABRERA, L.; FERRER, A. Evaluación de cepas de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* como cultivos iniciadores para la elaboración de queso tipo Palmita Venezolano. **Rev. Cient. FCV-LUZ.** IV (2): 73-78. 1994.
- [8] EL-SAMRAGY, Y.; FAYED, E.; ALY, A.; HAGRASS, A. Properties of labrech-like product manufactured using *Enterococcus* starter cultures as novel dairy fermentation bacteria. **J. Food Prot.** 51: 386-390. 1988.
- [9] FAYED, E.; HAGRASS, A.; ALY, A.; EL-SAMRAGY, Y. Use of enterococci starter culture in the manufacture of a yoghurt-like product. **Cult. Dairy Prod. J.** 24: 16-18. 1989.
- [10] GARG, S.; MITAL, B. Enterococci in milk and milk products. **Crit. Reviews. Microbiol.** 18: 15-45. 1991.
- [11] G"OSHEVA, B.; STEFANOVA, M.; BANKOVA, N.; DEDOVA, P. Taste and aroma of white brined cheese. **Khaniteina Promish.** 40: 15-16. 1991.
- [12] HAGRASS, A.; FAYED, E.; ALY, A.; EL-SAMRAGY, Y. Growth characteristics of enterococci isolated from labanrayeb. **Nahrun** 35: 209-213. 1991.
- [13] HARVEY, R. Production of acetaldehyde and acetone by lactic streptococci. **J. Dairy Res.** 27: 41-45. 1960.
- [14] JOENSSON, F.; PETERSPM, H. Aroma formation lactic starter cultures. **Nahrung** 35: 209-213. 1991.
- [15] KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods.** 2th ed. Kosikowski & Associate. New York. 1978.
- [16] LESTER, I.L. Starter: an introduction. **J. Soc. Dairy Technol.** 43: 2-3. 1990.

- [17] LINDSAY, R.; DAY, E. Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter cultures. **J. Dairy Sci.** 48: 665-669. 1965.
- [18] LITOPOULOU, T.; VAFOPOULOU M., A. Diacetyl and acetaldehyde concentrations during ripening of kefalotyri cheese. **J. Food Sci.** 53: 663-664. 1988.
- [19] LUM, O.; WONG, M.; LEE, C.K. A simple headspace – gas chromatographic method for the quantitative determination of organic volatiles of fresh orange juice. **Food Chem.** 37: 313-317. 1990.
- [20] OTT, A.; GERMOND, J.; BAUMGARTNER, M.; CHAIN-TREAU, A. Aroma comparisons of traditional and mild yoghurts: head-space gas chromatography quantification of volatiles and origin of alpha-diketones. **J. Agric. Food Chem.** 47: 2379-2385. 1999.
- [21] SALVADORI, B. Lactic and bacteria starters for cheese production. **Sci. Tecn. Latt. Cascaria** 36: 411-449. 1985.
- [22] SNEDECOR, G.; COCHRAN, W. **Statistical Methods.** 7 Ed. Iowa State University Press. Iowa, U.S.A. 1980.