

COLECCIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos

Jorge Reinheimer, Carlos Zalazar
(Editores)

ediciones **UNL**



Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos

Jorge Reinheimer

Carlos Zalazar

Nanci Bailo

Carina Bergamini

Susana Bernal

Ana Binetti

Luis Calvinho

Mario Candiotti

María Capra

Mónica Gaggiotti

Daniela Guglielmotti

Erica Hynes

Carlos Meinardi

Diego Mercanti

María Perotti

Andrea Quiberoni

Viviana Suárez

Celso Vinderola

**UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL**

 **ediciones UNL**

Dirección editorial
Ivana Tosti
Coordinación editorial
María Alejandra Sedrán
Coordinación comercial
José Díaz

© Ediciones UNL, 2023.

—

Sugerencias y comentarios
editorial@unl.edu.ar
www.unl.edu.ar/editorial



Reinheimer, Jorge
Avances en microbiología, bioquímica
y tecnología de quesos / Jorge Reinheimer ;
Carlos Zalazar. - 1a ed. - Santa Fe : Ediciones
UNL, 2023.
Libro digital, PDF/A - (Ciencia y tecnología)
Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-749-452-5

1. Quesos. 2. Tecnologías. I. Zalazar, Carlos. II.
Título.
CDD 637.3

@ de los editores, Jorge Reinheimer
y Carlos Zalazar, 2023.

@ Nanci Bailo, Carina Bergamini,
Susana Bernal, Ana Binetti, Luis Calvino,
Mario Candiotti, María Capra, Mónica Gaggiotti,
Daniela Guglielmotti, Erica Hynes, Carlos
Meinardi, Diego Mercanti, María Perotti,
Andrea Quiberoni, Viviana Suárez,
Celso Vinderola, 2023.

Sección 1
Nuevos sistemas para
el saneamiento de leche
destinada a quesería

La industria alimentaria, y la láctea en particular, se ha interesado siempre en aplicar nuevas tecnologías para la disminución de la carga microbiana natural presente en las materias primas, tratando de alterar lo menos posible sus características químicas y sensoriales.

Básicamente, existen dos modos diferentes de preservar los alimentos. Los métodos tradicionales se han basado en la aplicación de calor, el cual, además de destruir microorganismos, puede producir un efecto indeseable sobre los constituyentes del alimento, causando cambios en el “flavor”, como un sabor a cocido. La otra posibilidad podría enmarcarse en los llamados procesos en frío, entre los cuales la microfiltración (MF), la carbonatación y la alta presión son los que revisten mayor interés (Nielsen, 1996).

Ninguno de estos procesos es capaz de producir una completa eliminación de los microorganismos presentes (esterilización) pero, operando a bajas temperaturas, logran reducir significativamente o estabilizar la carga microbiana de la leche cruda, hablando de una aplicación en la industria láctea.

Por otro lado, al tratarse de leche destinada a la elaboración de quesos duros, todos los recursos que puedan implementarse para reducir el nivel de esporos de clostridios gasógenos adquieren gran importancia ya que este grupo microbiano resulta particularmente peligroso como responsable de fenómenos gaseosos graves en la masa del queso, que deprecian absolutamente la calidad del producto.

Capítulo 1

Microfiltración

Jorge A. Reinheimer, Ana G. Binetti y Nanci B. Bailo

La microfiltración (MF), como todo proceso de separación por membrana permite la concentración diferencial en un líquido (denominado retenido) de los componentes de mayor tamaño que el diámetro de poro de la misma. El líquido que atraviesa la membrana se denomina microfiltrado o permeado y contiene, en la misma concentración que la corriente entrante, los componentes de menor tamaño que el diámetro de poro. Las membranas de filtración tienen poros que oscilan entre 0,1 y 20 micrones, lo que permite la separación específica de partículas presentes en un líquido (Birolo, 1999).

A principios de los 80, la MF se empleó como una tecnología alternativa de la centrifugación para la clarificación y remoción de microorganismos del suero de quesería. Sin embargo, las membranas orgánicas utilizadas (polisulfonas y policarbonatos) no resultaron satisfactorias tanto en términos de flujo y selectividad como en su estabilidad térmica y química. La aparición de membranas cerámicas (química y térmicamente estables) solucionó estos inconvenientes, haciendo posible su aplicación en la industria láctea. A pesar de ello, las pérdidas graduales de flujo y selectividad determinaron que ninguno de los procesos resultara apto para su aplicación a escala industrial. Mediante la introducción del concepto de presión transmembrana uniforme (PTU) y baja se evita el problema de ensuciamiento heterogéneo de la membrana resultante de las altas velocidades de flujo requeridas para obtener permeación y selectividad adecuadas (Saboya y Maubois, 2000).

Básicamente, la estructura de la membrana está formada por un soporte

macroporoso (alúmina, carbón o acero inoxidable) y una capa de material activo (usualmente alúmina, óxido de titanio o zirconio o una mezcla de ambos). El material activo cubre el soporte en forma de una suspensión coloidal de partículas finamente divididas (mayor a 100 m²/g), con un espesor de 3-5 micrones, pudiendo formar dos o más capas sucesivas que determinarían la selectividad del proceso de MF.

La MF ha surgido como una tecnología de separación en la industria láctea para 3 aplicaciones fundamentales: eliminación de microorganismos, remoción de la grasa de suero y enriquecimiento en caseína micelar durante la elaboración quesera. No obstante, otras posibles utilidades, aún en estudio, son la separación de células somáticas a partir de leche cruda entera, el fraccionamiento de proteínas de suero y la separación de grasa de leche (Kulosik, 1992; Kelly y Tuohy, 1997; Jost y Jelen, 1997; Saboya y Maubois, 2000).

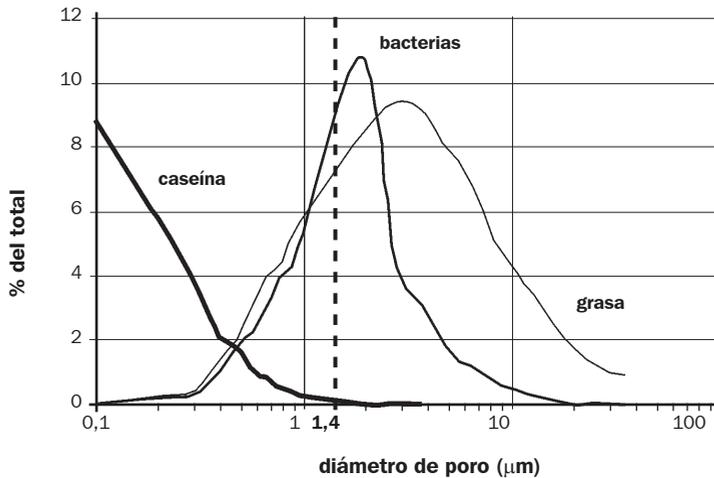
Remoción de microorganismos por MF en la industria láctea

Aplicaciones en leche fluida

La leche cruda contiene partículas en suspensión con rangos de distribución por tamaño relativamente bien definidos que, en orden decreciente, están representados por células somáticas (6-15 µm), glóbulos grasos (0,2-15 µm), bacterias (0,2-6 µm) y micelas de caseína (0,03-0,3 µm) (Fig.1). Su flora microbiana está formada por numerosos géneros y especies, pudiendo incluir bacterias patógenas (*Listeria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Salmonella*), como contaminantes comunes de diversos orígenes (ubre, máquinas ordeñadoras, medioambiente, tanques de almacenamiento, equipos de transporte, etc). La distribución por tamaño de las bacterias resulta muy similar a la de los glóbulos grasos por lo que, para una efectiva eliminación de microorganismos mediante MF se requieren membranas de tamaño de poro muy pequeño, que conjuntamente retendrían la fracción mayoritaria de grasa. Esto representa una limitación importante para el proceso, haciéndolo aplicable solamente a leche descremada (Jost y Jelen, 1997; Kelly y Touhy, 1997).

Figura 1

Distribución por tamaño de los principales componentes de la leche cruda (Lehmann y col., 1998)



Por otro lado, puede observarse que en el rango comprendido entre 0,2 y 2 μm una pequeña fracción de las micelas de caseína posee un diámetro igual al de las bacterias, por lo que se requiere adoptar una solución de compromiso en el momento de elegir la membrana de microfiltración. Se deberá optar por aquella que minimice tanto la carga microbiana como la pérdida de sólidos, maximizando así la eficiencia del proceso; por esta razón, 1,4 μm es un diámetro de poro conveniente. Consecuentemente, un porcentaje minoritario de microorganismos estará presente en el producto microfiltrado (permeado), por lo que resulta indispensable someterlo a un posterior tratamiento térmico que asegure la ausencia de patógenos en el producto final. Esto se suma al hecho de que la legislación argentina no permite llevar a cabo ningún proceso lácteo sin una pasteurización HTST o equivalente (Birollo, 1999; Binetti y col., 2000).

Estudios realizados en Suiza y Francia (Trouvé y col., 1991, Madec y col., 1992; Saboya y Maubois, 2000) permitieron la obtención de leche fluida microfiltrada para consumo, haciendo uso de un equipo llamado Bactocatch (Tetra Laval Co.). Actualmente, en estos países la leche descremada es tratada a 50 °C, haciéndola circular por una membrana Sterilox (tamaño de poro de 1,4 μm) a una velocidad de 7,2 m/s, con un valor de PTU cercano a 0,5 bar y un flujo en el orden de los 500 L/hm² durante 10 h. A partir de una leche descremada con un contenido de 2×10^4 UFC/mL, la reducción

decimal observada luego del tratamiento es de aproximadamente 3,5 órdenes log, obteniéndose un producto microfiltrado con menos de 10 UFC/mL. En el caso de bacterias esporuladas (que suelen sobrevivir a los tratamientos de pasteurización) la retención por la MF resulta más eficiente debido a su mayor tamaño celular, reduciéndose su carga inicial en más de 4,5 órdenes log (Trouvé y col., 1991).

De acuerdo con trabajos realizados por Madec y col. (1992), para *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Salmonella typhimurium* y *Mycobacterium tuberculosis* se observaron reducciones de 3,4; 4; 3,5 y 3,7 órdenes log, respectivamente. De este modo, teniendo en cuenta los niveles de contaminación usualmente encontrados en leche cruda con estos microorganismos patógenos, se aseguraría en el producto final una carga inferior a 1 UFC/L. Asimismo, las células somáticas son totalmente eliminadas mediante la MF y, en consecuencia, la leche obtenida no estará expuesta a la acción perjudicial de sus enzimas, que suelen soportar establemente los tratamientos convencionales de pasteurización (Saboya y Maubois, 2000).

Comercialmente se dispone de distintos tipos de leche MF. En el mercado francés existe una leche MF no pasteurizada, por lo que es considerada como leche cruda, con una vida útil de 15 días a 4-6 °C. En otros países europeos y en Canadá, antes del envasado aséptico el producto obtenido por MF es sometido a un tratamiento térmico HTST (72 °C - 15 s), con lo cual su vida útil se extiende hasta 35 días. En general, estas leches MF tienen amplia aceptación por parte de los consumidores debido a sus agradables caracteres organolépticos (ausencia de sabor a cocido) y a la posibilidad de almacenarlas por un período de tiempo más prolongado que las leches solamente pasteurizadas (Eino, 1997).

En la Argentina, para el desarrollo de un producto de similares características se utilizó una planta Bactocatch MFS-7 (Tetra Pak) operando en condiciones similares a las descritas pero haciendo uso de una membrana multicanal bicapa de óxido de aluminio (Membralox) de 1,4 mm de diámetro de poro. En cuanto a la carga microbiana, pudo observarse que la leche procesada de esta forma experimenta, en promedio, una reducción de 5 órdenes log en el nivel de recuento total, 4 en el de bacterias psicrotrofas y 2 en el de bacterias coliformes. La pasteurización posterior (72 °C - 15 s), necesaria en la Argentina para comercializar este tipo de productos, no reveló una reducción adicional significativa en el contenido microbiano. El estudio de conservabilidad de esta leche demostró que su vida útil puede extenderse por un período mínimo de 28 días en condiciones adecuadas de almacenamiento (4-6 °C) (Binetti y col., 2000).

La MF puede aplicarse también a la obtención de derivados lácteos tales como leche en polvo de baja temperatura, concentrado de proteínas de suero

o caseína en polvo. Por otro lado, el proceso de MF, al eliminar bacterias muertas y células somáticas, ofrece la oportunidad de estudiar el efecto propio de las enzimas endógenas sobre los componentes de la leche (Saboya y Maubois, 2000).

Aplicaciones en la industria quesera

La aplicación de la MF a la leche destinada a la elaboración de quesos tiene como objeto la obtención de un producto con caracteres organolépticos similares a los elaborados a partir de leche cruda, pero asegurando una constancia en las características del producto final y preservando la salud del consumidor.

El uso de leche tratada por MF con la misma tecnología descrita para la obtención de leche fluida proporciona a la industria quesera un completo control sobre la materia prima. Las membranas de MF eliminan una alta proporción de bacterias formadoras de esporos, como *Clostridium tyrobutyricum*. En consecuencia, la adición de nitratos para evitar la hinchazón tardía de los quesos duros o semiduros (que todavía se realiza en algunos países, como Nueva Zelanda) podría suprimirse, beneficiando así la salud del consumidor (Trouvé y col., 1991; Lehmann y col., 1998).

Por otro lado, el uso de leche microfiltrada permite determinar y caracterizar el rol exacto que juega cada especie microbiana durante la maduración de los quesos (bacterias lácticas integrantes o no del “starter”, propionibacterias, hongos y levaduras de la superficie), eliminando la influencia de la actividad enzimática de las células muertas, que resulta inevitable en el caso de leches tratadas térmicamente.

En la industria quesera se requiere de la sanitización eficiente de la salmuera para prevenir la poscontaminación de los quesos durante la etapa de salado. Se sabe que la salmuera suele contener microorganismos indeseables como brevibacterias, bacterias patógenas (*Staphylococcus*, *Listeria*, etc.), levaduras y hongos. La calidad de la salmuera y, consecuentemente, del queso, dependerá no sólo de su carga microbiana sino también de un equilibrio entre el contenido de NaCl (18-26 %), las sales de Ca solubles y precipitadas, la lactosa, el ácido láctico y las proteínas de suero solubles y desnaturalizadas (Pedersen, 1992).

Las metodologías tradicionalmente empleadas para el tratamiento de las salmueras son el tratamiento térmico y la filtración Kieselguhr. En la actualidad, ambas tienden a ser reemplazadas debido a razones económicas y de salubridad. Particularmente, el uso de la MF para la purificación de salmueras se lleva a cabo en equipo UTP con membranas de 1,4 ó 0,8 μm , reteniendo completamente levaduras y hongos, así como el 99,9 % de bacterias contaminantes y una fracción minoritaria de sales de calcio y de materia nitrogenada.

De este modo, su aplicación en procesos de rutina será posible si el costo de las membranas cerámicas de MF disminuye, como es de esperarse.

Conclusiones

Con el uso de la tecnología de microfiltración por membrana la industria láctea tiene hoy una nueva herramienta para mejorar la seguridad higiénica de numerosos productos lácteos, aplicando a la leche un mínimo tratamiento térmico. Consecuentemente, es esperable que las propiedades nutricionales y bioactivas de los componentes de la leche se conserven prácticamente intactas en los productos derivados de leche MF (leche fluida, quesos, leche en polvo, productos fermentados, etc.). La remoción de bacterias y células somáticas con sus enzimas termodúricas endógenas ofrece, por otro lado, la posibilidad de determinar la actividad atribuible a las enzimas propias de la leche en función del tiempo de almacenamiento y las condiciones de temperatura. Al mismo tiempo, es posible estudiar la actividad metabólica de cada componente del ecosistema microbiano adicionado a la leche de quesería obtenida por MF.

Referencias bibliográficas

- Binetti, A.G.; Bailo, N.B.; Alesso, R.; Perín, O.; Vicentín, D.; Giumelli, O.; Rodríguez, C. y Reinheimer, J.A. (2000).** *Revista Argentina de Lactología*, vol. 19, pp. 13-22.
- Biorollo, G.A. (1999).** "Reducción del recuento bacteriano en leche utilizando microfiltración". VIII Jornadas Lactocasearias, Santa Fe, Argentina.
- Eino, M.F. (1997).** Lessons learned in commercialization of microfiltered milk. *Bulletin International Dairy Federation*, vol. 320, pp. 32-36.
- Jost, R. y Jelen, P. (1997).** Cross-flow microfiltration-an extension of membrane processing of milk and whey. *Bulletin International Dairy Federation*, vol. 320, pp. 9-15.
- Kelly, P.M. y Tuohy, J.J. (1997).** The effectiveness of microfiltration for the removal of microorganisms. *Bulletin International Dairy Federation*, vol. 320, pp. 26-3.
- Kulozik, U. (1992).** Membranes in microbial fermentations. *Bulletin International Dairy Federation*, Special issue 9201, pp. 141-160.
- Lehmann, O.; Klantschitsch, T. y Puhan, Z. (1998).** Ausbeute von Rohmilchkäse und Käse aus mikrofiltrierter Milch. *Agrarforschung*, vol. 5 (11-12), pp. 489-491.
- Madec, M.N.; Méjean, S. y Maubois, J.-L. (1992).** Retention of *Listeria* and *Salmonella* cells contaminating skim milk by tangential membrane microfiltration (Bactocach process). *Lait*, vol. 72, pp. 327-332.
- Nielsen, W.K. (1996).** New methods for food preservation. In Heat treatments & alternative methods. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, SI 9602, pp. 240-248.
- Pedersen, P.J. (1992).** Microfiltration for the reduction of bacteria in milk and brine. *Bulletin International Dairy Federation*. Special issue 9201, pp. 33-50.
- Saboya L. y Maubois J.-L. (2000).** Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait*, vol. 80, pp. 541-553.
- Trouvé, E.; Maubois, J.L.; Piot, M.; Madec, M.N.; Fauquant, J.; Rouault, A.; Tabard, J. y Brinkman, G. (1991).** Rétenion de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangential. *Lait*, vol. 71, pp. 1-13.

Capítulo 2

Carbonatación

Jorge A. Reinheimer y Andrea Quiberoni

La mayor parte de los estudios aplicativos de este método se refieren a su utilización en leche cruda con el objetivo de prolongar el almacenamiento de la misma en frío (Rashed y col., 1986; Ruas-Madiedo y col., 1996; Sierra y col., 1996; de la Fuente y col., 1998; Ma y col., 2003).

La leche cruda recién ordeñada puede ser mantenida refrigerada en los tambos y en las usinas lácteas. Bajo esta situación, se reprime el desarrollo de los microorganismos mesófilos y termófilos pero no se logra reprimir totalmente el desarrollo de los psicrotrofos, lo cual conduce, en mayor o menor medida, a una alteración de la materia prima. La inyección de CO₂ tiende a frenar este deterioro.

También se han propuesto aplicaciones para leche pasteurizada (Hotchkiss y col., 1999), y estudiado el efecto sobre quesos (Ruas-Madiedo y col., 1998a; Ruas-Madiedo y col., 1998b) y leches fermentadas (Vinderola y col., 2000; Karagül-Yüceer y col., 2001).

Actividad antimicrobiana del CO₂

La actividad antimicrobiana del CO₂ inyectado se debe a varios factores. En primer lugar, cuando se inyecta CO₂ en un líquido hay un desplazamiento o barrido del oxígeno, volviendo el medio más anaerobio. Hay que tener en cuenta que los psicrotrofos más alterantes son aerobios, de modo que aumentando

la anaerobiosis del medio se favorece el bloqueo o control de estos microorganismos. Por otro lado, cuando el CO_2 se disuelve en un líquido se forma ácido carbónico, bajando el pH. Un medio más ácido contribuye a reprimir el crecimiento de las bacterias psicrotrofas. En el caso de la industria láctea esto debe controlarse ya que si el pH desciende demasiado podrían aparecer otros problemas de tipo químico y tecnológico. Finalmente, se ha visto que el CO_2 se acumula como gas en la membrana celular de las bacterias, alterando la permeabilidad de la misma. Al pasar ácido carbónico al interior de la célula se reduce el pH intracelular, lo que lleva a una inhibición de enzimas clave, entre ellas las decarboxilasas (Shimoda y col., 1998).

Como para cualquier antimicrobiano la actividad del CO_2 dependerá de:

- concentración: cuanto más CO_2 se inyecta, mayor será el descenso del pH del medio (Rashed y col., 1986);
- temperatura: este factor influye inversamente ya que aumentando la temperatura se aumenta la expulsión de CO_2 porque disminuye la solubilidad del gas en el medio líquido (Rashed y col., 1986) y
- tipo de microorganismos: no todos los microorganismos resultan igualmente sensibles (Hendricks y Hotchkiss, 1997; Shimoda y col., 1998; Kimura y col., 1999).

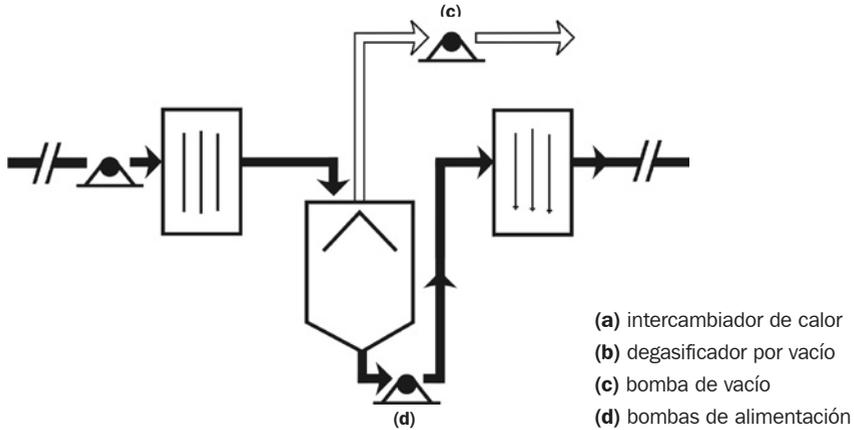
Aplicaciones a leche cruda

La aplicación en leche cruda es la más estudiada y ya se considera optimizada. Como ya se dijo, se aplica sobre leche mantenida a $5\text{ }^\circ\text{C}$ en los tambos o en las usinas. Las concentraciones usadas varían, pudiendo ser de entre 10 y 30 mM de CO_2 , lo que implica bajar el pH a 6 - 6,4, dependiendo de la concentración (Sierra y col., 1996).

Durante los días en que la leche se mantiene en frío el CO_2 se inyecta automáticamente para mantener el valor del pH constante. En esta etapa se instrumenta una agitación muy suave de la leche para homogeneizar la distribución del gas. Luego debe eliminarse el CO_2 de la materia prima para poder industrializarla, lo que se logra con una combinación de temperatura y vacío. La leche se calienta en un intercambiador de calor a $55\text{ }^\circ\text{C}$, pasando luego a un degasificador donde se aplica vacío a través de una bomba. Una vez eliminado el CO_2 , la leche se pasteuriza en forma convencional para utilizarla en quesería o como leche fluida de consumo (Ruas-Madiedo y col., 1996) (Fig. 1).

Figura 1

Sistema aplicado a la eliminación de CO₂ para leche cruda carbonatada (Ruas-Madiedo y col., 1996)

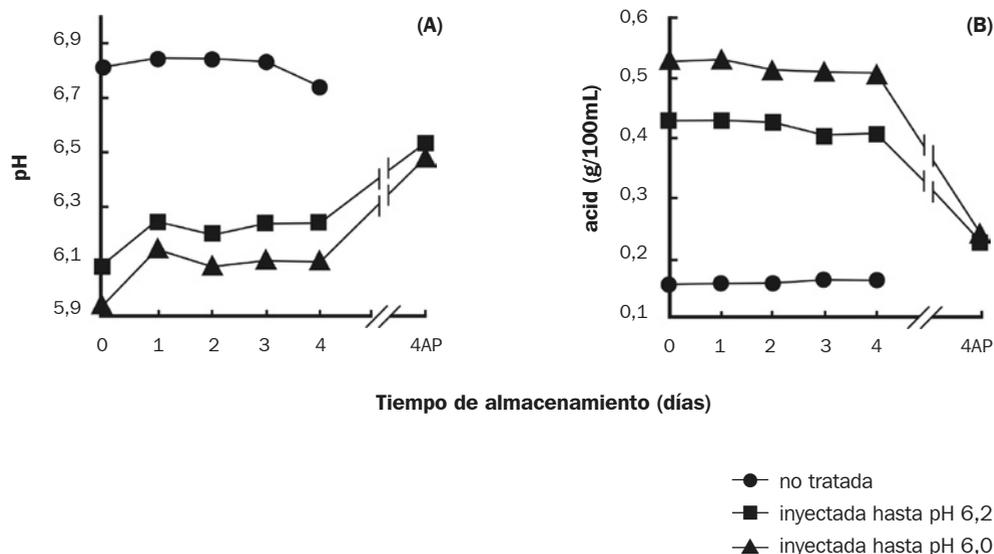


Es importante controlar que la adición de CO₂ no produzca cambios químicos desfavorables, dado que la leche debe mantener la aptitud industrial original como materia prima. Por ejemplo, si va a ser utilizada en quesería debe conservar la respuesta al coagulante. En este sentido, se ha visto que el tratamiento con CO₂ no produce cambios en el contenido de proteínas, vitaminas ni ácidos orgánicos de la leche ni cambia la organolepsis una vez que el CO₂ se elimina, pudiendo luego ser empleada en la elaboración normal de productos tales como leche larga vida, quesos y leche fermentada (probiótica o no) (Ruas-Madiedo y col., 1996; Sierra y col., 1996; Vinderola y col., 2000). Es interesante destacar que el CO₂ disuelto ejerce una actividad particular sobre el Ca micelar, incrementando la concentración de la forma iónica (Ca²⁺) en la fase soluble, lo que facilita luego la agregación de las micelas mejorando la aptitud a la coagulación (de la Fuente y col., 1998).

En la Fig. 2 se compara la variación del pH y la acidez durante el almacenamiento de leche tratada y no tratada con CO₂. En estas experiencias se mantuvo la leche en frío, carbonatada hasta dos niveles (pH 6,0 y 6,2).

Figura 2

Cambios en el pH (A) y acidez (B) de leche almacenada a 4° C luego de la pasteurización (Ruas-Madiedo y col., 1996)

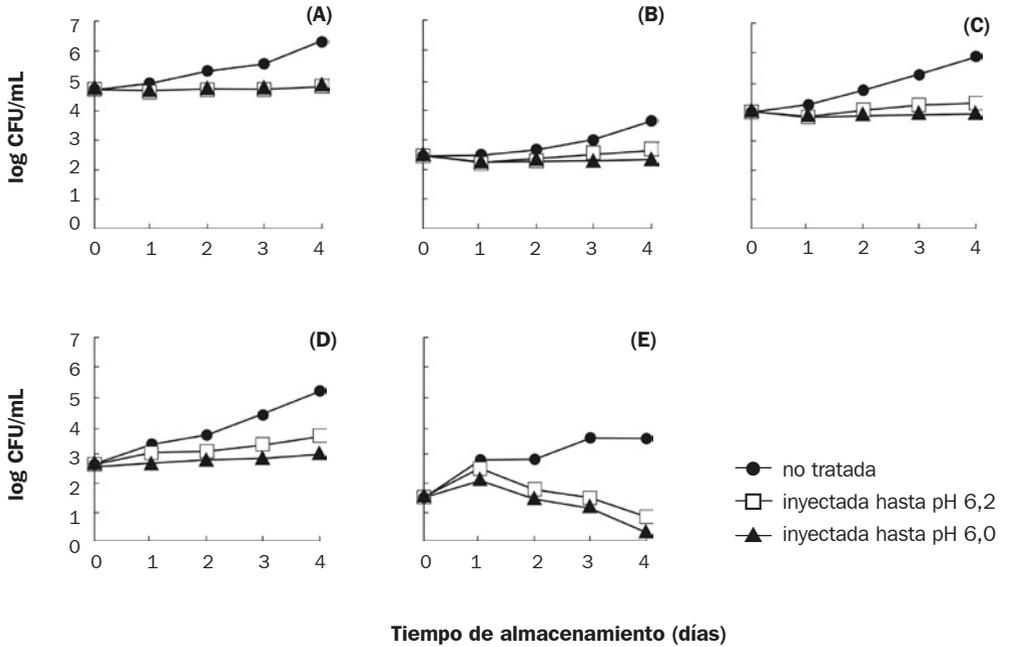


El aumento de pH en las muestras carbonatadas luego del cuarto día corresponde al período de degasificación, con el cual el pH sube pero no alcanza al valor original porque una parte del CO_2 queda disuelta. Sin embargo, esto no implica ningún cambio desfavorable en el proceso industrial (Ruas-Madiedo y col., 1996).

Con respecto a la microbiología, la Fig. 3 muestra las evoluciones de diferentes grupos microbianos estudiados durante el almacenamiento en frío: recuento total, coliformes, psicrotrofos, psicrotrofos proteolíticos y psicrotrofos lipolíticos. Comparando con un control, sin carbonatar, se observa que en todos los casos se logra inhibir el crecimiento microbiano e incluso, para los lipolíticos psicrotrofos se reveló una actividad bactericida (Ruas-Madiedo y col., 1996). El nivel de bacterias lácticas resulta también afectado por la adición de CO_2 a 7 °C, en el sentido de no sufrir incrementos durante el almacenamiento (Rashed y col., 1986).

Figura 3

Efecto del tratamiento con CO₂ en el recuento total (A), coliformes (B), psicrotrofos (C), proteolíticos psicrotrofos (D) y lipolíticos psicrotrofos (E) en leche control (Ruas-Madiedo y col., 1996)



Los niveles de proteólisis y lipólisis en leche tratada con CO₂ disminuyen significativamente, en comparación con leche no carbonatada. La reducción en la proteólisis ocurre por al menos dos mecanismos: la reducción de proteasas microbianas debido al menor desarrollo microbiano y la posible reducción de la actividad de la proteasa endógena (plasmina) debido al descenso del pH. En cambio, el efecto del CO₂ sobre la lipólisis es debido principalmente a la represión sobre el crecimiento microbiano. Se ha demostrado que leche cruda de alta calidad bacteriológica adicionada de 1.500 ppm de CO₂ puede ser mantenida a 4 °C por 14 días, con una mínima proteólisis y lipólisis, y recuentos inferiores a 3.10⁵ UFC/mL (Ma y col., 2003). Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con CO₂ no afecta la actividad metabólica de los fermentos lácticos para quesería (Ruas-Madiedo y col., 1998a y 1998b).

Estudios realizados sobre quesos elaborados con leche que había sido tratada previamente con CO₂ (de la Fuente y col., 1998; Ruas-Madiedo y col., 1998a) no mostraron diferencias significativas en la proteólisis y propiedades

sensoriales de los productos, comparado con controles elaborados con leche no tratada. El tratamiento con CO₂ previene efectivamente la disminución del rendimiento quesero causado por los microorganismos presentes en leche cruda de pobre calidad microbiana. De acuerdo con esto, se concluye que la leche preservada por refrigeración y adición de CO₂ puede ser usada satisfactoriamente para la producción de quesos.

Ventajas de la carbonatación

- Es una tecnología muy simple pero efectiva, con aplicaciones potenciales variadas en la industria láctea.
- El CO₂ es un gas seguro para su manejo.
- Sólo requiere modificaciones simples en los procesos tradicionales de producción. No hay que cambiar demasiado el diseño de un proceso tecnológico de la industria láctea para sumar la inyección de CO₂.
- Tiene bajo costo, porque se utilizan bajas concentraciones del gas y requiere equipos sencillos.
- Es un agente antimicrobiano natural.
- No altera las características organolépticas ni la apariencia de los productos, siempre que se maneje dentro de los límites mencionados.
- En el caso que se desee remover el gas inyectado, como en la leche cruda, es fácil llevarlo a cabo.

A modo de conclusión, puede decirse que la adición directa de CO₂ resulta una tecnología sencilla, económica y eficiente para reducir el biodeterioro en leche y productos lácteos.

Referencias bibliográficas

- de la Fuente, M.A.; Olano, A.; Requena, T.; Juárez, M. (1998).** Salt balance and rennet clotting properties of cow's, ewe's, and goat's milks preserved with carbon dioxide. *Journal of Food Protection*, vol. 61 (1), pp. 66-72.
- Hendricks, M.T.; Hotchkiss, J.H. (1997).** Effect of carbon dioxide on the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria monocytogenes* in aerobic atmospheres. *Journal of Food Protection*, vol. 60 (12), pp. 1.548-1.552.
- Hotchkiss, J.H.; Chen, J.H.; Lawless, H.T. (1999).** Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 690-695.
- Karagül-Yüceer, Y.; Wilson, J.C.; White, C.H. (2001).** Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 543-550.
- Kimura, B.; Yoshiyama, T.; Fujii, T. (1999).** Carbon dioxide inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on a pH-adjusted surface in a model system. *Journal of Food Science*, vol. 64 (2), pp. 367-370.
- Ma, Y.; Barbano, D.M.; Santos, M. (2003).** Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 1.616-1.631.
- Rashed, M.A.; Mehanna, N.M.; Mehanna, A.S. (1986).** Effect of carbon dioxide on improving the keeping quality of raw milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, vol. 39 (2), pp. 62-64.
- Ruas-Madiedo, P.; Bada-Gancedo, J.C.; Fernández-García, E.; González del Llano, D.; de los Reyes-Gavilán, C. (1996).** Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study. *Journal of Food Protection*, vol. 59 (5), pp. 502-508.
- Ruas-Madiedo, P.; Bada-Gancedo, J.C.; Leocadio, A.; de los Reyes-Gavilán, C. (1998a).** Afuega'l Pitu cheese quality: carbon dioxide addition to refrigerated milk in acid-coagulated cheesemaking. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 951-958.
- Ruas-Madiedo, P.; Leocadio, A.; González del Llano, D.; de los Reyes-Gavilán, C. (1998b).** Growth and metabolic activity of cheese starter in CO₂-acidified and non-acidified refrigerated milk. *Z Lebensm Unters Forsch A*, vol. 206, pp. 179-183.
- Shimoda, M.; Yamamoto, Y.; Cocunubo-Castellanos, J.; Tonoike, H.; Kawano, T.; Ishikawa, H.; Osajima, Y. (1998).** Antimicrobial effects of pressured carbon dioxide in a continuous flow system. *Journal of Food Science*, vol. 63(4), pp. 709-712.
- Sierra, I.; Prodanov, M.; Calvo, M.; Olano, A.; Vidal-Valverde, C. (1996).** Vitamin stability and growth of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk acidified with carbon dioxide. *Journal of Food Protection*, vol. 59 (12), pp. 1.305-1.310.
- Vinderola, C.G.; Gueimonde, M.; Delgado, T.; Reinheimer, J.A.; de los Reyes-Gavilán, C. (2000).** Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 213-220.

Capítulo 3

Reducción de la contaminación por clostridios gasógenos

Mónica Gaggiotti, Luis F. Calvino y Jorge A. Reinheimer

Los clostridios gasógenos son agentes bacterianos que pueden alterar quesos de pasta dura y corteza sólida (Gouda, Swiss, Emmental, Grana, Eddam, Gruyere, Provolone, quesos procesados trozados y envasados). Producen una fermentación ácida-butírica, que se traduce en una hinchazón tardía debido a la producción de anhídrido carbónico e hidrógeno y en cambios del flavor por la presencia de ácido butírico (Emaldi y col., 1977; Bottazzi, 1983; Alais, 1985; Coussi, 1988).

Se considera que el tracto intestinal de los animales es un ambiente idóneo para contener esporos de clostridios, pero el hábitat primario es el suelo. Su presencia en el intestino se debe a la ingestión de forraje contaminado con tierra, en especial de forraje conservado en forma de ensilaje. El nivel de contaminación de la leche por clostridios depende del número de esporos presente en el forraje usado en la alimentación de las vacas, del medioambiente que rodea la sala de ordeño y de las condiciones de higiene durante el mismo, en particular de la higiene de la ubre (Bergère y Hermier, 1970; Henry, 1977; Saywell y col., 1977; Chamba, 1980; Corrot, 1984; Baraton, 1985; Coulon y Lilas, 1988; Coussi, 1988; Bertilsson y col, 1996; Demarquilly, 1998).

En países europeos, particularmente Italia y Francia, se tiene especial cuidado con la calidad de la leche que se va a destinar a la elaboración de los quesos antes mencionados. Se utiliza leche de vacas no alimentadas con silaje y si se usa silaje en la alimentación se realizan campañas para concientizar al productor sobre prácticas de confección que minimicen la contaminación con esporos de clostridios gasógenos (Emaldi, 1977; Alais, 1985).

En la Argentina, hasta no hace mucho tiempo se confeccionaban reservas forrajeras (henos y silajes) para transferir los excedentes de pastura en primavera y en otoño a otras épocas del año donde la oferta es menor. Esto permitía cubrir los déficits de forraje de verano e invierno para mantener una carga animal (número de animales por unidad de superficie) promedio constante a lo largo del tiempo. El concepto ha cambiado ya que en la actualidad los forrajes conservados participan en la dieta del animal en forma cotidiana y en proporciones variables, y no sólo para cubrir los períodos de déficit. En los últimos años se han incrementado las hectáreas sembradas para la confección de silaje. La calidad general de los forrajes conservados ha ido mejorando pero todavía existen diferencias importantes entre el valor nutritivo del forraje original y del conservado. Una encuesta realizada a nivel nacional indica que del 100 % de la superficie destinada a la explotación tambora el 9 % se destina a silaje, se usa un promedio de 700 kg de silaje vaca/año y el 65 % de los productores lo utiliza para la alimentación de vacas lecheras (Gambuzzi y col., on line).

Poca importancia se le ha dado hasta el presente a la rutina de higiene de la ubre previa al ordeño. Aproximadamente el 90 % de los tambos sólo hacen lavado, no secando las ubres (Taverna y Abrigo, 1991).

Ensayos realizados en la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria indicaron que los niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en ensilajes de diferentes especies forrajeras y en particular de alfalfa, podrían ser riesgosos para la alimentación de vacas cuya leche se destina a la elaboración de quesos de pasta dura y que los silajes tipo puente presentan mayor número de esporos que los tipo bolsa (Taverna y col., 1997; Gaggiotti, 2000).

Estas observaciones conducen a pensar que los industriales queseros de nuestro país habrían comenzado a tener inconvenientes en la elaboración de este tipo de quesos. Comunicaciones personales con profesionales de la industria confirman esta presunción. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que el 9,5 % del volumen de leche del país se utiliza para la elaboración de quesos de pasta dura, representando el 21,3 % de los quesos elaborados y el 38,9 % de las exportaciones totales de queso (SAGP y A, on line).

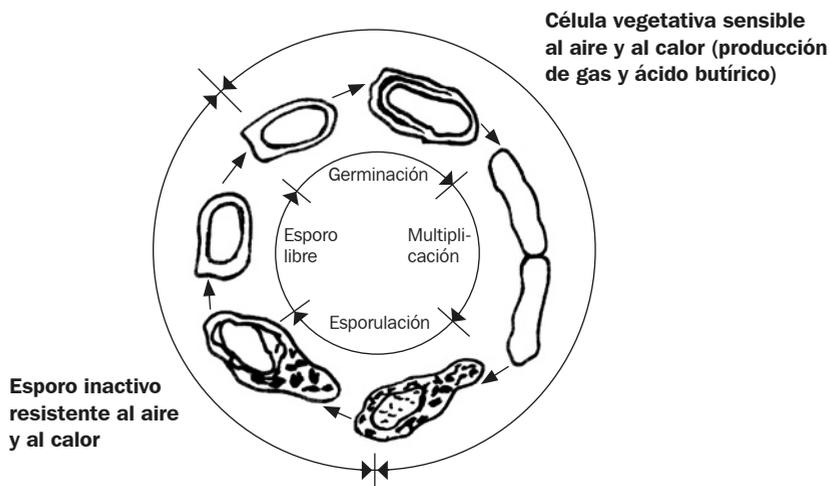
Los clostridios gasógenos

Los clostridios gasógenos actúan sobre azúcares y ácidos orgánicos produciendo fermentación ácida butírica. Es un grupo heterogéneo; las especies que se incluyen por excelencia en esta categoría son *Clostridium tyrobutyricum* y *Clostridium butyricum*, comúnmente denominados butíricos (Bottazzi, 1983; Ingham y col., 1998).

En la Fig. 1 se muestra el ciclo de vida de los clostridios. Las células vegetativas son anaerobias estrictas y las responsables de producir la fermentación butírica. Para resistir a las condiciones de aerobiosis, esporulan; los esporos son particularmente termorresistentes y cuando encuentran condiciones favorables (pH y temperatura) germinan y se multiplican (Baraton, 1985; Coussi, 1988).

Figura 1

Ciclo de vida de los clostridios (Coussi, 1988)



El más temido en quesería es *Clostridium tyrobutyricum*, pues utiliza lactato para producir fermentación ácida butírica (Matteuzzi y col., 1977; Dasgrupta y Hull, 1989; Klijn y col., 1994; Klijn y col., 1995); se requieren 3 horas a 80 °C o 15 minutos a 90 °C para obtener una reducción decimal de sus esporos (Coussi, 1988). El hinchamiento tardío de los quesos en las salas de maduración resulta de la fermentación del lactato de calcio, con producción de ácidos (butírico y acético) y gases (hidrógeno y anhídrido carbónico) (Emaldi y col., 1977; Bottazzi, 1983; Alais, 1985; Coussi, 1988). Una evolución grave de este defecto lleva a zonas localizadas de putrefacción.

La contaminación es frecuente y el material más contaminado son las heces vacunas. Sin embargo, el accidente no se produce en todos los tipos de quesos madurados y, en los que ocurre, se manifiesta de manera inconstante. Se conocen múltiples causas de estas variaciones (Bottazzi, 1983; Alais, 1985; Coussi, 1988):

1- el hinchamiento tardío no se produce en los quesos de pasta blanda sino en los de pasta dura y corteza sólida; la presencia de la corteza hace posible la retención de gases que da origen a una presión interna. Por otra parte, las temperaturas elevadas que experimenta la cuajada de los quesos de pasta cocida tienen probablemente una influencia favorable a causa del descenso del potencial redox (Eh), de la formación de compuestos fácilmente asimilables por los clostridios y, quizás, también de la destrucción de microorganismos antagónicos.

2- Algunas bacterias butíricas no pueden utilizar los lactatos y, por lo tanto, no provocan fermentación gaseosa en los quesos.

3- En el desarrollo de los clostridios intervienen diversos factores: la temperatura de almacenamiento, el pH de la pasta, el contenido de cloruro de sodio, la humedad del queso y el contenido en ácido láctico. Estas bacterias utilizan el ácido láctico, pero cuando éste alcanza una concentración suficiente (esto es, un pH inferior a 4,8) son inhibidos.

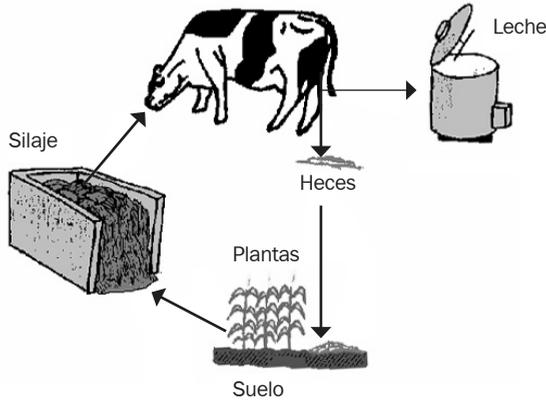
4- El momento de la contaminación no es el mismo para las bacterias butíricas que para la microflora total. Para evitar esta última debe limpiarse la instalación de ordeño y para suprimir los butíricos, prepararse cuidadosamente la ubre.

5- El número de esporos contenidos en la leche tiene una importancia fundamental; el accidente se produce por encima de un determinado nivel de contaminación. Los excrementos de vacas alimentadas con ensilajes contienen frecuentemente millares y aun millones de esporos por gramo, mientras que normalmente la leche no contiene más que algunos centenares. Los forrajes ensilados aportan muchos esporos, especialmente si son de mala calidad (pH superior a 4 y contenido elevado de nitrógeno amoniacal con respecto al nitrógeno total (NH_3/NT)). Los silajes de maíz tienen bajo contenido de esporos. En los EE.UU., donde se utiliza mucho este tipo de ensilaje, el hinchamiento tardío en los quesos es muy raro, pero deben tenerse en cuenta también los minuciosos cuidados con que se hace la recolección de la leche en ese país.

El nivel de contaminación por clostridios de la leche depende del número de esporos presente en el forraje usado en la alimentación de las vacas, del medioambiente que rodea la sala de ordeño y de las condiciones de higiene durante el ordeño. Los esporos ingeridos por el animal con el alimento se eliminan con las heces. Estas constituyen una de las principales fuentes de contaminación, habiéndose demostrado una correlación significativa entre el número de esporos presentes en la leche y en las heces (Bergère y Hermier, 1970; Henry, 1977; Saywell y col., 1977; Chamba, 1980; Corrot, 1984; Baraton, 1985; Coulon y Lilas, 1988; Coussi, 1988; McDonald y col., 1991; Bertilsson y col., 1996; Demarquilly, 1998) (Fig. 2).

Figura 2

Contaminación de la leche con esporos de clostridios (Baraton, 1985; Coussi, 1988)



Lucha contra la hinchazón butírica: estrategias

Restricción del consumo de ensilajes

En Europa se piensa que sería importante prohibir los ensilajes en las regiones productoras de leche con destino a la fabricación de quesos de pasta dura, ya que no se dispone aún de un medio seguro para luchar contra la hinchazón butírica sin poner en peligro la flora láctica y sin que se deriven inconvenientes para el consumidor. Es un método radical pero ilógico del punto de vista agrícola. La prohibición de una técnica ventajosa para conservación de los forrajes se traduce en una penalización indirecta al productor de leche y esta solución sólo debería aceptarse cuando la leche pudiese pagarse mejor para revalorizar el queso. La lucha directa debiera ser eficaz para limitar la contaminación butírica. Los técnicos especializados pueden aconsejar a los productores indicándoles: 1) precauciones de higiene rigurosa que deben aplicar en el momento del ordeño; 2) la manera de alimentar con ensilado y 3) los medios para producir ensilados ácidos, pobres en esporos (Bragadir, 1983; Alais, 1985).

Salado

El cloruro sódico no inhibe la germinación de los esporos más que a partir del 3 % en la fase acuosa y a pH 5,3; esta concentración no se alcanza en los

quesos de pasta cocida Emmental y Comté. Durante muchos años se han preconizado otras sales más eficaces (bromato, clorato, nitrato o nitrito de sodio o potasio), mezclas como el “antibut”, etc., pero su acción es irregular y no debe despreciarse su efecto inhibitor de las especies lácticas si se utilizan dosis demasiado altas. Los nitratos son eficaces pero son sustancias que preocupan a los higienistas. En Holanda, para la fabricación del Gouda y del Edam se considera como normal y necesaria la adición de nitrato sódico (15 g/100 L de leche), que aporta una protección contra la fermentación butírica por *Clostridium tyrobutyricum*, cuyos esporos pueden sobrevivir a la pasteurización. El desarrollo de estas bacterias no se frena con la sal (NaCl), ya que su penetración hacia el interior del queso es lenta (particularmente en este tipo de queso de tamaño bastante grande). En el caso de los quesos cuya cuajada se sala antes del moldeo, como el Cheddar, el nitrato no es necesario (Bragadir, 1983; Kleter y col., 1984; Alais, 1985).

Uso de nisina

La nisina, producida por *Lactococcus lactis*, es eficaz contra los clostridios. Este antimicrobiano se utiliza en la fabricación del queso fundido, pero aún no ha entrado en la práctica corriente de quesería y no está autorizada en Francia (salvo para quesos fundidos). Otra solución reside en el empleo de fermentos “nisinógenos” (Giraffa y col., 1984; Alais, 1985; Thuault y col., 1991; Susani y col., 1995).

Bactofugación

La bactofugación es un medio eficaz para eliminar los esporos de clostridios pero, la temperatura de 80 °C recomendada para conseguir una eficacia del 99 % es demasiado elevada para los quesos de pasta cocida. Con la leche tratada de esta forma se observan defectos en la pasta y, por otro lado, el procedimiento elimina también bacterias propiónicas, lo que limita la formación de ojos. Es posible bactofugar a sólo 65 °C, logrando una eficacia del 95-96 %. También es posible, según la cantidad de esporos presentes en la leche, bactofugar sólo una parte de ésta y volver a mezclarla con la leche no tratada, para conseguir que la mezcla no tenga más de 100 esporos/L (Bergère, 1969; Bragadir, 1983; Alais, 1985).

Uso de agua oxigenada

Se conoce el efecto destructor y eficaz del agua oxigenada sobre *Clostridium* y se sabe también que puede ser destruida a su vez por catalasa. Sobre estas bases se ha desarrollado un procedimiento para la fabricación de quesos de pasta cocida. Se añade 0,2 % de agua oxigenada (de 35 volúmenes) a la leche y se mantiene 30 minutos a 35 °C; a continuación se añade la cantidad de catalasa precisa (procedimiento Per-zyme o método peroxicatalásico). El agua oxigenada es un reactivo demasiado eficaz para no tener efectos directos ni indirectos sobre los componentes de la leche y, en particular sobre las proteínas. Se ha demostrado que tras el tratamiento con este producto la movilidad electroforética de las caseínas alfa y beta se modifica y que el contenido en sustancias nitrogenadas no proteicas aumenta en la leche desnatada. Por consiguiente, es cierto que se producen transformaciones de las proteínas, acompañadas de una ligera degradación. El descenso del valor nutritivo, medido en ratas, confirma estas modificaciones estructurales. Diversos autores han señalado que los quesos obtenidos a partir de una leche que ha sufrido este tratamiento presentan un defecto de textura: la pasta no es tan compacta como en un queso normal. Esto se ha relacionado con una curiosa modificación de las propiedades de la caseína: aumenta su sensibilidad a los iones calcio y a las enzimas proteolíticas. La caseína tratada con agua oxigenada tiene una solubilidad mucho mayor en presencia de Ca (II), sobre todo a bajos valores de pH (cerca de 4,6). Además, la liberación de NNC (nitrógeno no caseínico, soluble a pH 4,6) bajo la acción del cuajo es tres veces más rápida después de este tratamiento, mientras que el NNP (nitrógeno no proteico, soluble en ácido tricloroacético) cambia poco; por lo tanto, lo que se acelera es la reacción de proteólisis en general, aceleración que, si bien menos intensa, se produce también con la pepsina y la tripsina. La esterilización de la leche de quesería por este procedimiento es desde luego eficaz pero, no se puede recomendar más que con reservas (Alais, 1985).

Utilización de lisozima

La lisozima es una β -glucosaminidasa o muramidasa, que provoca la hidrólisis del polisacárido que constituye la pared de ciertas bacterias conduciéndolas a su destrucción (los polisacáridos están constituidos por un encadenamiento de glucosamina y ácido murámico, al cual están ligados los péptidos). Esta enzima, que está muy difundida en los reinos animal y vegetal, desde el punto de vista químico es un péptido básico de bajo peso molecular (14.000 a 18.000), muy estable al calor. En la leche humana se ha aislado un

componente proteico que presenta estas propiedades; es idéntico a la lisozima de la saliva o de la placenta y, probablemente tiene un origen leucocitario. La leche humana contiene cantidades muy variables de lisozima, de 40 a 500 mg/L. La leche de vaca normal es pobre en leucocitos y no contiene lisozima en cantidades apreciables; por el contrario, sí la contiene cuando hay abundancia de leucocitos. La estructura de la lisozima de la leche de mujer ha sido establecida y muestra analogías con la de la clara de huevo de gallina, que sirve de referencia, pero su actividad específica es 3,5 veces más elevada. La lisozima inhibe las fermentaciones butíricas y puede considerarse como un remedio para evitar la hinchazón de los quesos de pasta cocida. Parece no ser capaz de inhibir la fermentación propiónica, necesaria para la obtención de ojos en estos quesos, y su efecto sobre la fermentación láctica a las dosis útiles es débil. El tratamiento con lisozima, cuyo costo ha bajado mucho estos últimos años, tiene en Francia autorización temporal para ser utilizado en los quesos que no tienen denominación de origen. Con destino a quesería se comercializa una preparación de lisozima con el nombre de Aflact (Lodi y Carini, 1980; Ottogalli y col., 1983; Bottazzi, 1984; Alais, 1985; Crawford, 1987; Bester y Lombard, 1990; Carini, 1995).

Otros

Se ha evaluado el efecto de polifosfatos de cadena larga como inhibidores del crecimiento del *Clostridium tyrobutyricum* en quesos fundidos y logrado la inhibición de su crecimiento con una concentración de 1 % de polifosfatos, lo que indica que este puede ser un método muy útil para prevenir el hinchamiento tardío en quesos fundidos pasteurizados (Loessner y col., 1997).

Si bien bien a nivel industrial existen técnicas (mencionadas anteriormente) para reducir el número de esporas en la leche destinada a la elaboración de quesos de pasta dura y semidura, su implementación es costosa y la eficacia, limitada (Lodi y Carini, 1980; Bottazzi, 1983; Bragadir, 1983; Carini, 1983; Coulon y Lilas, 1988).

Por esto, los trabajos correctivos sobre el tema se orientan fundamentalmente a determinar las principales vías de contaminación, para luego establecer prácticas de prevención que permitan reducir la contaminación de la leche en el tambo (Emaldi y col., 1977; Coussi, 1988).

Ensayos de campo realizados en Italia para detectar el origen de la contaminación con clostridios de leche destinada a la elaboración de queso Grana concluyeron que el nivel de contaminación con esporos de los ensilajes, en este caso de maíz, se correlacionaba directamente con el nivel en leche y que la metodología utilizada en la elaboración del silaje y la higiene en el ordeño

eran factores importantes para disminuir el nivel de contaminación (Emaldi y col., 1977). Estudios similares se realizaron para la elaboración del Parmigiano-Reggiano (Pecorari y Fossa, 1980).

En ese país se establecieron criterios de aceptación de los ensilajes en función de los niveles de contaminación, para ser utilizados en la alimentación de vacas cuya leche se destina a la elaboración de quesos de pasta dura (Bottazzi, 1983). Los mismos proponen que un forraje con menos de 100 esporos /g de material húmedo sea considerado de calidad óptima; entre 100 y 1.000 esporos/g, de buena calidad; entre 1.000 y 10.000 esporos/g, de mala calidad y con más de 10^4 esporos/g, de calidad pésima. También se establecieron niveles de contaminación para leche cruda destinada a la elaboración de quesos de pasta dura: leche con menos de 200 esporos/L implica ausencia de hinchazón tardía en quesos; un rango de 200 a 1.000 esporos/L se corresponde con algunos casos de hinchazón y con más de 1.000 esporos/L, la hinchazón estará muy difundida.

En Francia se evaluó el nivel de contaminación con esporos de clostridios en ensilajes de maíz y de gramíneas (los más utilizados en ese país), en las heces y en la leche de las vacas que los consumían (Baraton, 1985; Coussi, 1988). Se establecieron correlaciones entre el nivel de contaminación de las heces y de los ensilajes con el nivel de contaminación de la leche y se definieron criterios de aceptación para heces, ensilajes y leche en función del número de esporos presentes (Coussi, 1988). En la Tabla 1 se presenta dicha información. Por otra parte, determinaron el nivel de contaminación con esporos de clostridios gasógenos de la leche que produce inconvenientes en la elaboración de quesos Emmental, Gouda, Edam y Mimolette, observando que a partir de 200 esporos/L puede aparecer el riesgo del hinchamiento tardío y que cuando se superan los 2.000 esporos/L el hinchamiento es generalizado (Baraton, 1985).

Tabla 1

Criterios de aceptación para heces, ensilajes y leche en función del número de esporos presentes, utilizados en Francia (Baraton, 1985; Coussi, 1988)

Niveles de contaminación en ensilaje (esporos/g de material húmedo)	Valoración (calidad)
<100	Muy bueno
100 a 1.000	Bueno
1.000 a 5.000	Mediocre
5.000 a 10.000	Malo
>10.000	Muy malo

Niveles de contaminación en heces (esporos/g de material húmedo)	Valoración
< 10.000	Leche poco contaminada
10.000 a 40.000	Leche contaminada
> 40.000	Leche muy contaminada

Niveles de contaminación en leche (esporos/L)	Valoración
<400	Excelente
400 a 1.000	Poco contaminada
1.000 a 4.000	Contaminada
4.000 a 10.000	Muy contaminada
>10.000	Pésima

Los niveles de aceptación para clostridios gasógenos presentes en leche difieren en función del tipo de queso; cuanto mayor es el tiempo de maduración se admiten valores más bajos.

Coussi (1988) identificó, en función del nivel de clostridios gasógenos presentes en leche, cuál es la principal fuente de contaminación de la misma. En la Tabla 2 se presenta dicha información.

Tabla 2

Principales fuentes de contaminación de la leche con esporos de clostridios gasógenos, en función del contenido de éstos (Coussi, 1988)

Contaminación de la leche	<1.500 esporos/L	1.500 a 3.000 esporos/L	3.000 a 4.000 esporos/L	>4.000 esporos/L
Baja <10.000 esporos/g bosta <1.000 esporos/g silaje	Higiene			
Mediana 10.000 a 40.000 g/ bosta 1.000 a 10.000 g/ silaje	Alimentación e higiene			
Alta >40.000 esporos/g bosta >10.000 esporos/g silaje	Alimentación		Alimentación e higiene	

En la Argentina, un estudio realizado (campaña 1996-1997) en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) indicó que los niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en los ensilajes fueron altos, que los silajes tipo puente presentaron mayor número de esporos que los tipo bolsa y que los niveles de contaminación en los ensilajes de alfalfa podrían producir inconvenientes en la elaboración de quesos de pasta dura (Taverna y col., 1997). En la Tabla 3 se presenta dicha información. Para su análisis se aplicó el criterio de evaluación italiano de valoración de la calidad de un ensilaje en función del NMP de esporos de clostridios gasógenos.

Tabla 3

Evaluación de clostridios gasógenos en silajes (campaña 1996-1997)
(Taverna y col., 1997)

NMP/g de silaje	Porcentaje (%) por rango del NMP/g de silaje						
	Grano húmedo de maíz (bolsa)	Grano húmedo de sorgo (bolsa)	Maíz (puente)	Maíz (puente)	Sorgo (puente)	Sorgo (puente)	Pastura (bolsa)
>100 (óptimo)	100	75	20	25	8	20	14
100 a 1.000 (bueno)	0	25	13	37	25	70	43
1.000 a 10.000 (malo)	0	0	20	25	25	10	43
>10.000 (pésimo)	0	0	47	13	42	0	0

Para corroborar la información anterior se realizó otro relevamiento de forrajes conservados (campaña 1997-1998) provenientes de la cuenca central santafesina y del NE de la provincia de Córdoba (Gaggiotti, 2000). En la Tabla 4 se presentan los resultados.

Tabla 4

Porcentaje de muestras de forrajes conservados (campaña 1997-1998) según niveles de contaminación por esporos de clostridios gasógenos teniendo en cuenta los criterios de evaluación francés e italiano

Rango (NMP/g)	Valoración italiana	Valoración francesa	% de muestras
<100	Óptimo	Muy bueno	7
100 a 1.000	Bueno	Bueno	46
1.001 a 5.000	Malo	Mediocre	29
5.001 a 10.000	Malo	Malo	0
>10.000	Pésimo	Muy malo	18

Los silajes de grano húmedo presentaron los menores niveles de contaminación (100 % de las muestras de maíz y 75 % de las de sorgo con menos de 100 esporos/g). Los silajes de alfalfa fueron los que presentaron mayor porcentaje de muestras (15 %) con más de 10.000 esporos/g. Un alto porcentaje de los silos puente (30 %) se ubicó en el rango pésimo o muy malo mientras que sólo el 17 % de las bolsas superó los 10.000 esporos/g. El pH ($r = 0,97$, $p < 0,01$) y el % N-NH₃/NT ($r = 0,82$, $p < 0,01$) fueron los parámetros que mejor se correlacionaron con el NMP de esporos. El análisis de la información indicó que hubo diferencias entre especies y entre sistemas de almacenaje. La alta correlación de los valores de pH y N-NH₃/NT con el nivel de esporos en el forraje evidenció la importancia del proceso de confección del silo para minimizar la presencia de los mismos.

Contaminación por clostridios gasógenos en leche cruda de la zona

En un estudio realizado hace algunos años (Gaggiotti, 2000) se evaluó el nivel de contaminación por esporos de clostridios gasógenos en leche cruda proveniente de la cuenca lechera central de Argentina, incluyendo 32 distritos de la provincia de Santa Fe y 10 pedanías de la provincia de Córdoba. El muestreo se prolongó desde mayo de 1997 a junio de 1998. La región muestreada posee una producción diaria de 3,5 millones de litros de leche y la unidad de muestreo fue la cisterna de transporte de leche, correspondiendo cada una de éstas a un recorrido de recolección (Tabla 5).

Tabla 5
Principales características de la población relevada

Ítems	Caracterización
Tamaño de muestra	37 cisternas de recolección
Volumen promedio de las cisternas	7.600 litros
Número promedio de tambos por cisterna	5 tambos
Producción promedio diaria por tambo	1.520 litros (variando de 500 a 8.000 litros)

El promedio del recuento total de organismos aerobios mesófilos en leche resultó de $2,4 \times 10^5$ UFC/mL, con un valor máximo de $3,6 \times 10^6$ UFC/mL y un valor mínimo de 10^3 UFC/mL. El 57,7 % de las cisternas tuvo un recuento inferior a 10^5 UFC/mL y el 15,7 % superó las 3×10^5 UFC/mL. Si lo referimos al volumen de leche recolectado, un 57,0 % tuvo un recuento inferior a 10^5 UFC/mL y un 15,7 % un recuento superior a 3×10^5 UFC/mL. Estos valores permitieron establecer que un 84,3 % de las cisternas evaluadas y de la leche recolectada fue de excelente calidad higiénica. Es importante recordar que los muestreos fueron realizados a nivel de planchada de recibo de fábrica y representaron, consecuentemente, la calidad real de ingreso al proceso de industrialización.

El valor medio del NMP de esporos de clostridios gasógenos, excluyendo fermentadores de lactato fue de 198/100mL y el del NMP total (incluyendo los fermentadores de lactato) fue de 548/100mL. El análisis estadístico de la comparación del log NMP de clostridios gasógenos sin incluir (Bergère y Hermier, 1970; Bushnell, 1984) e incluyendo a los fermentadores de lactato (Bergère y Hermier, 1970; Crawford, 1987) indicó diferencias significativas al 6 %. El coeficiente de variación para los dos parámetros fue muy alto (351 % y 190 % respectivamente). Ello se debió a la gran diversidad de valores que oscilaron, para ambos, entre <3 a 11.000 esporos/100 mL.

Como *Clostridium tyrobutyricum* es el principal agente que causa el hincharse tardío en quesos y utiliza como sustrato el lactato, el análisis de la información se realizó teniendo en cuenta el NMP de esporos de clostridios gasógenos que incluyen a aquellos fermentadores de lactato.

En las Figuras 3 y 4 se muestra la distribución porcentual por rango del NMP, según los criterios de evaluación italiano y francés (Bottazzi, 1983; Baraton, 1985; Coussi, 1988) de las cisternas evaluadas y en las Figuras 5 y 6 se presenta la misma información pero referida al volumen total de leche recolectada por esas cisternas.

Figura 3

Distribución (% de cisternas) por rango del NMP (según criterio de evaluación italiano) de esporos de clostridios gasógenos (incluyendo fermentadores de lactato) en leche proveniente de 5 empresas lácteas

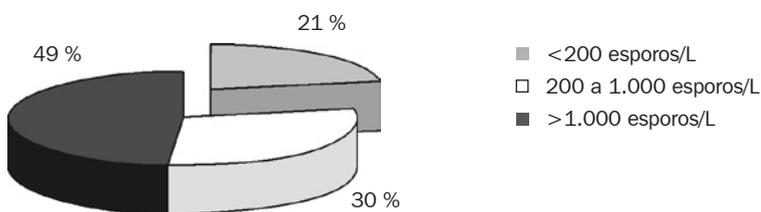


Figura 4

Distribución (% de cisternas) por rango del NMP (según criterio de evaluación francés) de esporos de clostridios gasógenos (incluyendo fermentadores de lactato) en leche proveniente de 5 empresas lácteas

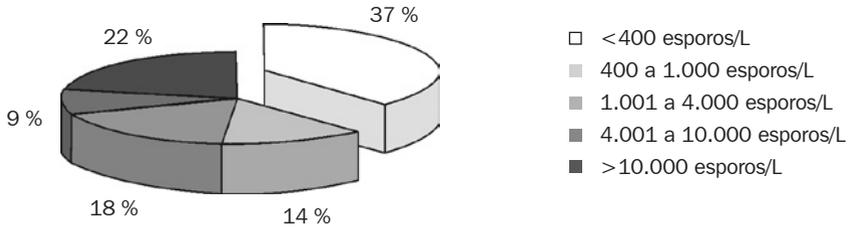


Figura 5

Distribución (% del volumen total de leche) por rango del NMP (según criterio de evaluación italiano) de esporos de clostridios gasógenos (incluyendo los fermentadores de lactato) en leche proveniente de 5 empresas lácteas

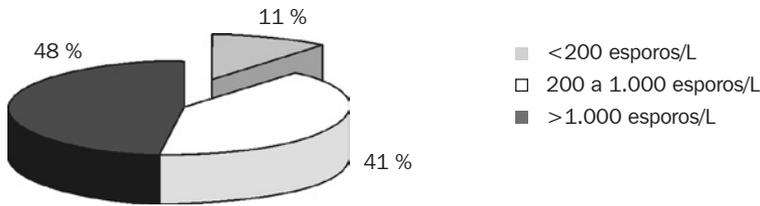
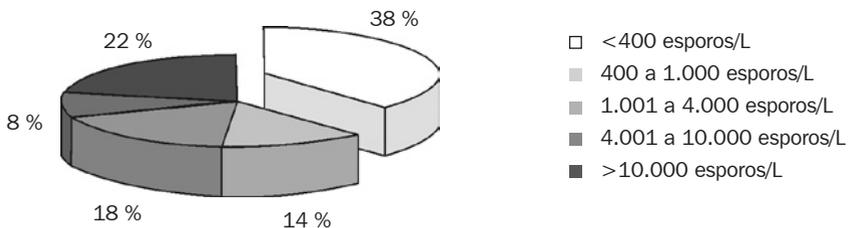


Figura 6

Distribución (% del volumen total de leche) por rango NMP (según criterio de evaluación francés) de esporos de clostridios gasógenos (incluyendo los fermentadores de lactato) en leche proveniente de 5 empresas lácteas



El análisis de la información indicó que un alto porcentaje de las cisternas (49 % según criterio de evaluación italiano y 31 %, considerando leche muy contaminada y leche de calidad pésima, según criterio de evaluación francés) y del volumen de leche (48 % y 30 % para ambos criterios respectivamente) presentó niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos fermentadores y no fermentadores de lactato, peligrosos para la elaboración de quesos de pasta dura y corteza sólida.

Por otra parte, no existió un período del año en el que el NMP de esporos de clostridios gasógenos fuera mayor como era de esperar si sólo se asocia la contaminación con clostridios con la alimentación con ensilaje (fines de otoño y todo el invierno). Se podría inferir que las condiciones climáticas del período de muestreo (precipitaciones mayores y temperaturas media mensual inferiores a la media histórica en los meses de verano) contribuyeron a una mayor contaminación con esporos de clostridios gasógenos asociada con la higiene de la ubre y de la sala de ordeño. Estudios realizados en Italia encontraron que la contaminación con esporos de clostridios es mayor en el otoño, disminuye en el invierno y es mínima en primavera y verano (Páez y col., 1999). Un relevamiento de explotaciones lecheras realizado en Francia (Coulon y Lilas, 1988) indica que la contaminación aumenta de noviembre (36 % de las explotaciones con >1.000 esporos/L) a febrero (68 % de las explotaciones con >1.000 esporos/L) y disminuye ligeramente hasta fin del invierno (56 %, con >1.000 en el mes de abril). Las explotaciones que mayores niveles de contaminación tuvieron fueron las que consumían ensilaje de pasturas (reygrás, trébol, alfalfa) y no de gramíneas (maíz) y que la higiene en la sala de ordeño era pobre. El silaje de pasturas siempre presentó niveles de contaminación más elevados con esporos de clostridios que el de maíz (Coulon y Lilas, 1988).

Influencia de la alimentación y de la preparación de la ubre, previo al ordeño, sobre la contaminación de la leche con esporos de clostridios gasógenos

En la EEA Rafaela del INTA se realizaron diversos ensayos para evaluar la influencia de la alimentación y de la preparación de la ubre previo al ordeño sobre la contaminación de la leche con esporos de clostridios gasógenos.

El objetivo de uno de los ensayos fue determinar la influencia del tipo de almacenaje del alimento (silo convencional - silo embolsado) y el método de higiene preordeño en la concentración de clostridios gasógenos presentes en el forraje, en la leche y en las heces. Se evaluaron los siguientes tratamientos o combinaciones de alimento y método de higiene: P-L = pastoreo de alfalfa (P) y lavado de pezones (L); P-LS = ídem al anterior pero lavado y secado de

pezones con papeles descartables (LS); M-L = silaje embolsado de maíz (SM) y L; M-LS = ídem al anterior pero con LS; S-L = silaje puente de sorgo granífero (SS) y L y S-LS = ídem al anterior pero LS. En todos los casos se suplementó a los animales con balanceado comercial durante el ordeño. Se efectuó además un análisis de correlación entre el NMP de esporos en leche y en heces. El NMP/g de esporos en los alimentos utilizados fue estadísticamente diferente ($p < 0,05$): 12, 67, 481 y 6.489 para el balanceado, la pastura y los silajes maíz y sorgo, respectivamente. En la Tabla 6 se informan los valores promedio del NMP esporos/L de leche cruda para cada tratamiento evaluado.

Tabla 6

Valores promedio del NMP esporos/L de leche cruda para cada tratamiento evaluado

Método higiene preordeño	NMP/L de leche cruda			
	Pastura (tratamiento)	Silo bolsa (tratamiento)	Silo puente (tratamiento)	Pastura (tratamiento)
Lavado de pezones	370 (P-L)	1.034 (M-L)	3.071 (S-L)	1.130 (a)
Lavado y secado de pezones	128 (P-LS)	338 (M-LS)	567 (S-LS)	316 (b)
Promedio	234 (c)	618 (b)	1.395 (a)	

() letras distintas en sentido horizontal, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El análisis estadístico indicó diferencias ($p < 0,05$) entre los valores de NMP/L de leche cruda para los distintos alimentos y métodos de higiene preordeño evaluados. Por el contrario, la interacción no fue estadísticamente significativa. Los niveles hallados en los tratamientos M-L y S-L (superiores a 1.000 esporos/L), indicaron que la leche estuvo demasiado contaminada para la elaboración de quesos de pasta dura. Por el contrario, los valores hallados en S-LS ubicaron a la leche obtenida como poco contaminada (rango de 400-1.000 esporos/L) mientras que los otros tres tratamientos correspondieron a una leche de calidad excelente. En cuanto a la cantidad de esporos de clostridios gasógenos presentes en las heces, se encontraron diferencias ($p < 0,05$) en las provenientes de los animales afectados a los tres tipos de forrajes utilizados: 6.030, 41.885 y 196.542 NMP/g para la pastura y los silajes de maíz y sorgo, respectivamente. El análisis de correlación indicó un valor elevado ($r = 0,85$; $p < 0,001$) entre el NMP en heces y en leche obtenidos de vacas afectadas al método de

higiene preordeño sin secado (L). En las condiciones en las que se desarrolló este ensayo, la leche de vacas alimentadas con el silo puente presentó mayor nivel de contaminación que las de silo bolsa, aunque la higiene de los pezones (lavado+secado) es fundamental para minimizar el nivel en leche.

Como la comparación entre sistemas preordeño sobre la presencia de clostridios gasógenos detectó diferencias significativas, para verificarlo se evaluó el efecto de distintas rutinas de preparación de la ubre, previo al ordeño, sobre la presencia de clostridios gasógenos. Se evaluaron 3 sistemas: lavado de pezones con agua sin secado (L), lavado de pezones y secado (L y S) y lavado y secado de pezones con máquina (LM). La máquina es un innovador sistema tecnológico para lavado y secado de ubres de bovino (MESUL, SRL). La experiencia fue repetida en 3 períodos: en el primer período las vacas consumieron una pastura de alfalfa, pastoreo directo y concentrado energético durante el ordeño y en el segundo y tercero consumieron silaje y heno en un corral con piso de tierra y concentrado energético en el ordeño. Las condiciones climáticas para los 3 períodos fueron diferentes, sobre todo con respecto a la humedad relativa media diaria y al total de precipitaciones (78,1; 85,4 y 82 % de HR y 0,3; 56 y 17 mm de precipitaciones para el primero, segundo y tercer período respectivamente) En la Tabla 7 se presentan los valores promedio del NMP de clostridios gasógenos por tratamientos obtenidos en cada período.

Tabla 7

Recuento de clostridios gasógenos (NMP/100mL) en leche cruda (valor promedio), según el tratamiento y período considerado

Período	Tratamiento empleado para la limpieza de los pezones		
	Lavado (L)	Lavado y secado (Ly S)	Máquina (LM)
Primero	8	4	4
Segundo	165 (a)	107 (a)	62 (b)
Tercero	96 (a)	63 (b)	35 (b)
Promedio general	89	58	34

() letras distintas en sentido horizontal, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los resultados permiten destacar el comportamiento del tratamiento LM. Este logró los menores valores del NMP en los dos períodos más críticos de contaminación con esporos de clostridios gasógenos (segundo y tercer período). El nivel de contaminación sufrió un incremento de aproximadamente 10 veces cuando las vacas consumieron silaje y heno en un corral con respecto al de leche de vacas alimentadas con pastura. Estos resultados indican que la alimentación con silaje es problemática pues aumenta el número de esporos en leche, pero poniendo de manifiesto que a iguales condiciones de manejo de la alimentación, la higiene de la ubre es fundamental. Especial cuidado se debe tener en la higiene cuando se presentan días con humedad relativa media alta o lluvia.

Conclusiones

Los resultados encontrados en las experiencias realizadas en la EEA INTA Rafaela indicaron que en un sistema de alimentación a campo, no estabulado, la higiene preordeño es fundamental para minimizar el nivel de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en la leche. Aplicar correctamente la técnica de ensilado es fundamental para minimizar la presencia de estos esporos.

Referencias bibliográficas

- Alais, C. (1985).** *Ciencia de la leche*. Principios de técnica lechera. Editorial Reverté, 873 p.
- Baraton, Y. (1985).** *La contamination du lait par les spores butyriques*. Le Point Sur. Edite par L'Institut Technique de L'Elevage Bovin, 32 p.
- Bergère, J.; Hermier, J. (1970).** Spore properties of clostridia occurring in cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 33, pp. 167-179.
- Bergere, J.L. (1969).** La bactofugation du lait et l'élimination des spores de *Clostridium tyrobutyricum*. *Le Lait*, pp. 507-519.
- Bertilsson, J.; Lingvall, P.; Gyllenswärd, M. (1996).** Factors affecting the contamination of bulk milk with clostridia spores. In: Proceeding of Symposium on bacteriological quality of raw milk. Wolfpassing, Austria, pp. 33-35.
- Bester, B.H.; Lombard, S.H. (1990).** Influence of lysozyme on select ed bacteria associated with Gouda cheese. *Journal of Food Protection*, vol. 53, pp. 306-311.
- Bottazzi, V. (1983).** Clostridi e fermentazioni butirriche dei formaggi. *L'industria del latte*, vol. 3, pp. 3-25.
- Bottazzi, V. (1984).** Il controllo del gonfiore tardivo nei formaggi: possibilita e limiti dei mezzi oggi disponibili. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, vol. 35, pp. 399-417.
- Bragadir, G. (1983).** La lotta contra i difetti di origine butirrica. *L'industria del latte*, vol. 3, pp. 35-42.
- Bushnell, R.B. (1984).** The importance of hygienic procedures in controlling mastitis. The Veterinary Clinics of North America. *Large Animal Practice*, vol. 6 (2), pp. 361-370.
- Carini, S. (1983).** I clostridri butirici causa del gonfiore tardivo nei formaggi. *L'industria del latte* XIX, n° 3, pp. 27-33.
- Carini, S. (1995).** Il Grana: formalina e lisozima. *L'industria del latte* XXXI, n° 1, fasc. 3, pp. 31-41.
- Chamba, J.F. (1980).** Contamination en spores butyriques des fourrages des bouses et des laits avec different regimes hivernaux. Institut technique du Gruyere. Institut technique de l'elevage bovin, p. 42.
- Corrot, G. (1984).** Methodes de traite et contamination butyrique des laits. Institut technique de l'elevage bovin, p. 47.
- Coulon, J.B.; Lilas, J.P. (1988).** Composition chimique et contamination butyrique du lait: facteurs de varition dans le département de la Huate-Loire. INRA Productions Animals, vol. 1 (3), pp. 201-207.
- Coussi G. (1988).** Butyriques et fermentation butyrique. Dossiers Techniques Veterinaires (juillet), pp. 75-96.
- Crawford, R.J.M. (1987).** The use of lysozyme in the prevention of late blowing in cheese. Bull N° 216, The International Dairy Federation, Brussels, p. 16.
- Dasgupta, A.P.; Hull, R.R. (1989).** Late blowing of Swiss cheese: incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 44, pp. 82-87.
- Demarquilly, C. (1998).** Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. INRA Productions Animals, vol. 11, pp. 359-364.
- Emaldi, G.C.; Toppino, P.; Bossi, M.G.; Carini, S.; Lodi, R.; Vezzoni, A.; Nizzola, I.; Alberini, B. (1977).** La presenza di sporigeni anaerobi nei foraggi e nelle feci di bovine da latte. *L'industria del latte*, n° 1, pp. 47-8.
- Gaggiotti, M.C. (2000).** Niveles de contaminación por clostridios gasógenos en alimentos para el ganado bovino (forrajes conservados) y en leche cruda destinada a industrialización. Tesis para la obtención del Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Universidad

Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina).

Gambuzzi, E.; Zehner, R. y Chomicz, J. Análisis de sistemas de producción lecheros 2001-2003. http://www.inta.gov.ar/rafaela/grupos_trabajo/economia/index.htm.

Giraffa, G.; Mucchetti, G.; Neviani, E. (1984). Defetti di origine microbiologica nei formaggi fusi. *Il Latte*, vol. IX, pp. 778-786.

Henry, A. (1977). Facteurs influençant la contamination du lait par les spores butyriques. *Revue Laitière Française*, n° 35.081, pp. 8.183.

Ingham, S.C.; Hassler, J.R.; Tsai, Y. and Ingham, B. (1998). Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolet from milk. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 43, pp. 173-183.

Kleter, G.; Lammers, W.L.; Vos, E.A. (1984). The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in wey and cheese. 2. Experiments in cheese. *Netherland Milk Dairy Journal*, vol. 38, pp. 31-41.

Klijn, N.; Bowie, C.; Dommies, J.; Hoolwerf, J.D.; van der Waals, C.B.; Weerkamp, A.H. and Nieuwenhof, F.F.J. (1994). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* and related species using sugar fermentation, organic acid formation and DNA probes based on specific 16SrRNA sequences. *Systematic Applied Microbiology*, vol. 17, pp. 249-256.

Klijn, N.; Nieuwenhof, F.F.J.; Hoolwerf, J.D.; van der Waals, C.B. and Weerkamp, A.H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, pp. 2.919-2.924.

Lodi, R.; Carini, S. (1980). Inquinamento del latte da clostridi ed inibizione del loro sviluppo mediante uso di lisozima. *Annali di Microbiologia*, vol. 30, pp. 103-106.

Loessner, M.J.; Maier, S.K.; Schiwiek, P. and Scherer, S. (1997). Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. *Journal of Food Protection*, vol. 60 (5), pp. 493-498.

Matteuzzi, D.; Trovati, L.D.; Biavati, B. and Zani, G. (1977). Clostridia from Grana cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 43, pp. 375-82.

McDonald, P.; Henderson, N.; Heron, S. (1991). *The biochemistry of silage* (second edition). Chalcombe Publications, p. 340.

MESUL SRL. LAVA -TEAT plus. *Manual de especificaciones técnicas y uso* (traducción): p. 26.

Ottogalli, G.; Galli A.; Laria, L. Camasschella, P. (1983). Azione del cloridrato di lisozima (AFILACT) sui batteri lattici dei siero - innesti per grana. *L'industria del latte*, n° 3, pp. 43-48.

Páez, R.; Taverna, M.; Chávez, M. y Charlón, V. (1999). Evaluación de la higiene de la ordeñadora mediante la técnica de la bioluminiscencia de ATP. *Publicación Técnica N° 60 ISSN 0485 – 9057- Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Macroregión Pampeana Norte, INTA*, p. 7.

Pecorari, M.; Fossa, E. (1980). Contenuti in grasso, caseina e spore di clostridi butirrici nel latte di caldaia riflessi sulla tecnologia del Parmigiano-Reggiano. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, vol. 31 (1), pp. 1-18.

Saywell, B.A.; McGee, M.A. and Veitch C.M. (1977). The incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in a factory milk supply. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology*, vol. 12, pp. 274-275.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. On line <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>; <http://www.alimentos.argentinos.gov.ar>.

Susani, T.; Neviani, E.; Carminati, D.; Giraffa, G. (1995). Inibizione in latte di *Clostridium tyrobutyricum* e *Propionibacterium* spp. de batteriocine prodotte de enterococchi. *L'industria del latte* XXI, n° 1, fasc. 1, pp. 3-15.

Taverna, M.A.; Abrigo, O. (1991). Caracterización y análisis de las instalaciones de ordeño difundidas en la cuenca lechera central del país. *Publicación Miscelánea n° 57. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela*, p. 10.

Taverna, M.; Gaggiotti, M. y Aguirre, N. (1997). Cuidado con los butíricos. *Infortambo* n° 96, pp. 84-86.

Thuault, D.; Beliard, E.; Le Guerin, J.; Bourgeois, C.M. (1991). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 1.145 -1.150.

Sección 2

Quesos probióticos

Elias Metchnikoff (1845-1916), en su estudio de los microorganismos intestinales sugirió que esta microflora produce toxinas que resultan en autointoxicaciones crónicas. Los tejidos dañados por estas toxinas son atacados por macrófagos activados (autoinmunidad) acelerando consecuentemente el envejecimiento. Estimó, a su vez, que la implantación de bacterias lácticas en el tracto intestinal podría reducir la reacción patológica y así aumentar la expectativa de vida.

A pesar de que la primera documentación de Metchnikoff (*The prolongation of life*) data de 1907 (Naidu y col., 1999), recién en 1965 Lilly y Stilwell introdujeron el término *probiótico* para describir sustancias producidas por un microorganismo que estimulaban el crecimiento de otro (Ouwehand y col., 1999).

Desde entonces el significado de este término ha sufrido varias modificaciones (Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Ziemer y Gibson, 1998; Fooks y col., 1999; Lee y col., 1999; Naidu y col., 1999; Sanders y Huis in't Veld, 1999) siendo la más aceptada actualmente la establecida por FAO-WHO (2001), y respaldada por la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, que mejor describe la idea y el objetivo de los probióticos, tal como se los conoce hoy: "microorganismos vivos que confieren un efecto benéfico a la salud del hospedador cuando son administrados en cantidades adecuadas".

Para facilitar al lector el seguimiento de esta sección se denominará bacterias probióticas a las especies de *Bifidobacterium*, a las del grupo *Lactobacillus casei* y a *Lactobacillus acidophilus*. Con el nombre bacterias lácticas o cultivos iniciadores se estará haciendo referencia a cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis*, más allá de que, para estas bacterias se reconocen también propiedades probióticas y, a pesar de ser también algunas de las primeras, bacterias lácticas. Con relación a las bifidobacterias, los criterios están divididos en cuanto a considerarlas o no bacterias lácticas. Mientras que algunos autores las consideran como tal debido a que son empleadas generalmente junto con bacterias lácticas, otros sostienen lo contrario basados en su posición filogenética y en el hecho de que el producto principal de su metabolismo sea ácido acético y no ácido láctico.

Capítulo 1

Bacterias probióticas utilizadas

Celso G. Vinderola

El interés por la adición de cultivos probióticos a quesos es bastante reciente, registrándose la mayor parte de las investigaciones desde la segunda mitad de la década pasada. Hasta ese momento sólo los yogures y otras leches fermentadas habían sido usados tradicionalmente como vehículos para este tipo de microorganismos. No obstante, los frecuentes informes de importantes pérdidas de viabilidad en este tipo de productos debido, principalmente, a la elevada acidez de los mismos, generaron esfuerzos por encontrar otro tipo de alimento capaz de cumplir con el objetivo de hacer llegar altos números de cultivos de bacterias probióticas al consumidor. En la Tabla 1 se pueden observar los microorganismos más comúnmente usados hasta el momento así como los tipos de quesos a los que fueron agregados. Los más empleados fueron diferentes especies de bifidobacterias, seguidas de especies del grupo *Lactobacillus casei*, y *Lactobacillus acidophilus*. La incorporación de microorganismos probióticos a quesos parece ser una alternativa prometedora al problema de la sobrevida hasta el momento del consumo debido a que los mayores valores de pH de estos productos (con relación a las leches fermentadas), la existencia de una matriz más cerrada y compacta (que permite un menor ingreso de oxígeno) y el mayor contenido de grasa, ejercerían un efecto protector sobre las cepas probióticas adicionadas (Stanton y col., 1998).

Tabla 1

Especies bacterianas más comúnmente empleadas como cultivos adjuntos en la elaboración de quesos probióticos

Microorganismo	Tipo de queso/origen	Referencia
<i>L. casei</i>	Cheddar (USA)	Furtado y col., 1993
<i>B. bifidum</i>	Cheddar (USA)	Dinakar y Mistry, 1994
<i>L. acidophilus</i> y <i>B. infantis</i>	Gouda (Portugal)	Gomes y col., 1995
<i>B. infantis</i>	Cottage (Canadá)	Blanchette y col., 1996
<i>B. bifidum</i> y <i>B. adolescentis</i>	White Brined (Iran)	Ghodusi y Robinson (1996a)
<i>B. lactis</i> y <i>L. acidophilus</i>	de cabra (Portugal)	Gomes y Malcata, 1998
<i>L. paracasei</i>	Cheddar (Irlanda)	Gardiner y col., 1998
<i>B. bifidum</i>	Kariesh (Egipto)	Zeinab y Fathy, 1998
<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> y <i>B. longum</i>	Crescenza (Italia)	Gobbetti y col., 1998
<i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. angulatum</i> o <i>B. infantis</i>	Cottage (Irlanda)	O’Riordan y Fitzgerald, 1998
<i>Enterococcus faecium</i>	Cheddar (Irlanda)	Gardiner y col., 1999
<i>L. paracasei</i> y <i>L. plantarum</i>	Cheddar (Irlanda)	Lynch y col., 1999
<i>B. infantis</i>	tipo Cheddar (Canadá)	Daigle y col., 1999
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> y <i>L. paracasei</i>	Fresco (Argentina)	Vinderola y col., 2000a
<i>B. bifidum</i> y <i>B. longum</i>	Canestrato Pugliese (Italia)	Corbo y col., 2001

Capítulo 2

Métodos moleculares para la identificación de cepas y estudio de la diversidad genética bacteriana

Celso G. Vinderola y Jorge A. Reinheimer

Métodos aplicados a la identificación de cepas

En los últimos años los avances en la microbiología molecular han esclarecido algunos aspectos que se mostraban históricamente problemáticos. La disponibilidad de herramientas moleculares ha permitido identificar más precisamente a las cepas bacterianas, disminuyendo la confusión acerca de sus identidades (Klaenhammer y Kullen, 1999).

El género *Lactobacillus* es fenotípicamente muy heterogéneo y la identificación de sus cepas se ha basado tradicionalmente en ensayos fisiológicos y bioquímicos. Estas técnicas demandan una gran cantidad de tiempo y los resultados obtenidos son generalmente ambiguos o poco confiables debido a que muchas especies responden de manera similar ante distintas condiciones de cultivo o ensayos bioquímicos. No sólo la identificación de especies del género *Lactobacillus* a través de las técnicas tradicionales presenta inconvenientes, para bifidobacterias la situación es similar (Matsuki y col., 1999). El uso de técnicas que permiten la secuenciación del ARN ribosomal y los estudios basados en la hibridación ADN:ADN ha permitido mejorar considerablemente los estudios taxonómicos en bacterias lácticas (Daud Khaled y col., 1997). Actualmente se dispone de una amplia variedad de métodos genotípicos para la identificación de bacterias lácticas, los que se usan solos o combinados (Andrighetto y

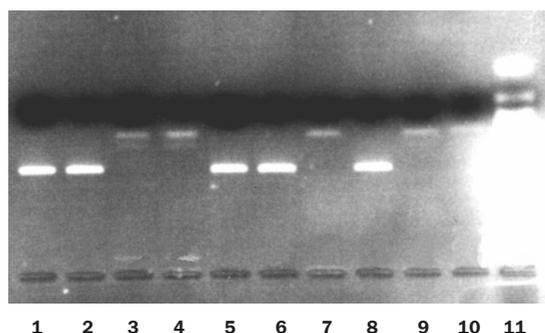
col., 1998, Cibik y col., 2000) con otros métodos moleculares e incluso con técnicas tradicionales, para lograr así una identificación más segura. Entre los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) se pueden mencionar el uso de sondas específicas de especies, el análisis por restricción del ADN ribosomal (ADNr) amplificado (ARDRA), la secuenciación (principalmente de la región 16S del ADN ribosomal) y la RAPD (random amplification of polymorphic DNA), que si bien se usa esencialmente para el estudio de la diversidad genética, también fue propuesta para la identificación de aislamientos, como se detallará más adelante.

Una sonda específica de especie es un fragmento de ácido nucleico de cadena simple que se une (hibrida) específicamente con una región complementaria de un ácido nucleico específico, el cual puede ser una cadena de ARN o una cadena simple de ADN (Schleifer y col., 1995), para luego ser amplificada a través de una reacción PCR. La región amplificada puede ser detectada posteriormente en un gel de electroforesis. Estas sondas se emplean de a pares: mientras una sonda es específica de la especie que se quiere identificar, la otra puede ser una sonda más general o específica sólo del género al cual pertenece la sonda o incluso una sonda universal. Se dispone actualmente de una amplia variedad de sondas específicas que son complementarias de regiones de 16S o 23S del ARN ribosomal (ARNr) para distintas especies de bacterias lácticas y probióticas (Schleifer y col., 1995, Matsuki y col., 1999). Estas zonas fueron elegidas como blancos para la identificación debido a que están altamente conservadas en las distintas especies. Algunos investigadores prefieren trabajar con las regiones de 16S o 23S del ARNr, pero no directamente sobre la molécula de ARN ribosomal sino sobre la codificación de la misma en la molécula de ADN, es decir, la región de 16S o 23S del ADNr, ya que se obtienen mejores resultados (mayor pureza) tanto en la amplificación como en la secuenciación de las mismas. El uso de sondas específicas de especie se hace imprescindible cuando se quiere diferenciar entre especies altamente emparentadas que conforman grupos y que no pueden ser diferenciadas por los métodos tradicionales. Por ejemplo, las especies del grupo *Lactobacillus acidophilus* (integrado por *Lactobacillus acidophilus* sensu stricto, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus johnsonii*) sólo pueden separarse mediante el uso de este tipo de metodologías (Schleifer y col., 1995). El uso de sondas específicas de especie cuenta con amplios antecedentes exitosos en la bibliografía en lo que hace a la identificación de especies de interés en sistemas microbianos complejos. Mannu y col. (2000) emplearon sondas específicas para la mayoría de los lactobacilos termófilos presentes en el queso italiano Fiore Sardo, lo que les permitió caracterizar la evolución de las distintas especies durante la maduración del mismo. Pu y col. (1998) desarrollaron sondas específicas de las cinco especies reconocidas de *Lactococcus* (incluyendo las dos

subespecies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) presentes en una amplia variedad de quesos. En el estudio de Andrighetto y col. (1998) se combinó el uso de sondas específicas con la determinación de huellas dactilares mediante PCR (una técnica similar a la RAPD), el ARDRA y la hibridación Dot-blot para identificar cepas de lactobacilos aisladas de quesos duros y semiduros (Grana, Provolone, Asiago). Se dispone también de sondas específicas para la identificación de especies de *Bifidobacterium*, pero éstas han sido empleadas principalmente en el estudio de la distribución del género en la flora intestinal humana (Matsuki y col., 1999, Satokari y col., 2001). La Fig. 1 muestra los resultados del empleo de una sonda específica de especie (*Lactobacillus paracasei*) en la identificación de cepas comerciales y de colección, del género *Lactobacillus*.

Figura 1

Identificación de cepas de la especie *Lactobacillus casei* mediante el empleo de sondas específicas de especie



Calle 1: cepa LB, **2:** cepa BRA, **3:** cepa A15, **4:** cepa A16, **5:** cepa A13, **6:** cepa A14, **7:** *Bifidobacterium longum* A1 (control negativo), **8:** *L. casei* CNRZ 1308 (control positivo), **9:** *Lactobacillus* N3, **10:** *Lactobacillus* 1, **11:** marcador de peso molecular. Las bandas no alineadas con el control positivo corresponden a lo que se denomina "bandas fantasmas".

El análisis por restricción del ADN ribosomal (ADNr) amplificado (ARDRA) tiene un excelente potencial para la discriminación de microorganismos a nivel de especie. Esta técnica consiste en la amplificación, mediante un par de sondas, de una región (de 900 a 1.500 pares de bases) del ADN ribosomal correspondiente a la región de 16S ADNr, seguida de la digestión de la zona amplificada con enzimas de restricción. Los fragmentos así obtenidos son

separados en gel de agarosa, y visualizados y fotografiados bajo luz UV. Roy y Sirois (2000) observaron que los perfiles de la región amplificada y digerida con tres enzimas de restricción obtenidos por esta técnica para *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium lactis* eran idénticos, lo que confirma el hecho de que a veces son necesarias varias técnicas para una correcta identificación de cepas. Por su parte, Giraffa y col. (1998) emplearon esta técnica para diferenciar exitosamente las subespecies de *Lactobacillus delbrueckii* (*lactis*, *bulgaricus* y *delbrueckii*) entre sí y de *Lactobacillus acidophilus* y de *Lactobacillus helveticus*; sin embargo, hubo cepas que no pudieron ser identificadas por esta técnica. Por otro lado, Roy y col. (2001) fueron capaces de diferenciar claramente las especies de los grupos *Lactobacillus acidophilus* (*Lactobacillus acidophilus* sensu stricto, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus johnsonii*) y *Lactobacillus casei* (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*) mediante el empleo de tres enzimas de restricción una vez amplificada una zona de 1.000 pares de bases de la región de 16S del ADNr con una sonda universal y otra específica de *Lactobacillus*.

El gen 16S ADNr está constituido por aproximadamente 1.500 pares de bases y se encuentra presente generalmente en varias copias en cada célula. Este gen posee tanto secuencias variables como otras altamente conservadas (Woese, 1987). En los últimos años, el uso extensivo de análisis basados en las secuencias de los genes ribosomales ha permitido una creación relativamente rápida de grandes bases de datos internacionales que poseen las secuencias de muchas especies conocidas, tales como la EMBL (European Molecular Biological Laboratory), Ribosomal Data Project (<http://www.cme.msu.edu/RDP>) o GenBank, accesibles a través de Internet. No obstante, tampoco esta técnica puede garantizar absolutamente la identidad de una cepa; por ejemplo, dos cepas de *Bacillus* spp. demostraron pertenecer a especies distintas por medio de experimentos de apareamiento de ADN y por sus características fenotípicas aun cuando compartían una similitud del 99,5 % en su 16S ADNr (Fox y col., 1992). Una de las metodologías más difundidas para la secuenciación de esta región se basa en la amplificación de la misma con un par de sondas, la purificación y finalmente el secuenciado. Para esta última etapa se debe hacer previamente otra amplificación mediante una reacción PCR donde, además de las bases nucleotídicas tradicionales para la extensión de la cadena por medio de la acción de la Taq polimerasa, están presentes también bases nucleotídicas marcadas con agentes cromógenos que detienen la reacción de alargamiento de la cadena al ser incorporadas a la misma. Esta mezcla de cadenas de bases nucleotídicas de distinta longitud que terminan con un agente cromógeno es separada en una columna capilar. Estos cromógenos (un color para cada base nucleotídica) son detectados y registrados como bases particulares (adenina,

timina, guanina o citosina). La secuencia de bases nucleotídicas que se obtiene se compara con las secuencias de especies de referencia que se almacenan en bases de datos. Esta técnica también cuenta con amplios antecedentes en su utilización como parte de estudios de identificación de bacterias lácticas y probióticas. Cibik y col. (2000) amplificaron casi la totalidad del gen 16S ARNr en su estudio de la diversidad genética de *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc citreum* aislados de quesos tradicionales franceses. Giraffa y col. (2000) secuenciaron también el gen 16S ARNr para la identificación de cepas de *Lactobacillus helveticus* aisladas de queso tipo Swiss y de quesos italianos de maduración prolongada como el Emmental, Grana y Provolone.

Los ensayos de RAPD implican una amplificación por PCR de porciones del ADN genómico utilizando sondas de secuencia arbitraria de 9-10 bases nucleotídicas. Los productos amplificados (de distintos pesos moleculares) se separan en gel de agarosa y se visualizan y fotografían bajo luz UV una vez teñidos con bromuro de etidio. Esta técnica permite la detección de polimorfismo en organismos altamente relacionados, el cual resulta de diferencias en las secuencias que inhiben la hibridación de la sonda o interfieren con la amplificación; por lo tanto, estas diferencias hacen que se amplifiquen fragmentos para un individuo o cepa pero no para otro (Micheli y Bova, 1997). La sensibilidad y especificidad de esta técnica radica en el hecho de que se toma a todo el genoma como base para generar los perfiles genéticos (Vincent y col., 1998). La técnica de RAPD-PCR es un método molecular usado tradicionalmente para el estudio de la diversidad genética de cepas de una misma especie. No obstante, ha sido propuesta en los últimos tiempos como una herramienta útil para la identificación de aislamientos bacterianos. Estudios recientes proponen esta técnica para la obtención de huellas dactilares del genoma que permitan distinguir especies de *Bifidobacterium* basándose en la similitud de sus perfiles RAPD usando 5 sondas, con los perfiles de cepas de referencia (Vincent y col., 1998). En este sentido, se la puede utilizar también para la identificación de cepas del grupo *Lactobacillus acidophilus* (Roy y col., 2001). No obstante, la construcción de una base de datos que permita la comparación de los perfiles RAPD de cepas de referencia con la cepa incógnita (Klein y col., 1998) es un trabajo dificultoso, debido a que los resultados de las técnicas de PCR son aún muy variables y los patrones de polimorfismo del ADN, para identificar cepas desconocidas, son difíciles de reproducir para llevar a cabo comparaciones a través de bases de datos (Klaenhammer, 1998). Además, si se debe investigar la identidad de una cepa desconocida, se debe incluir siempre en el análisis un conjunto de cepas de identidad conocida como patrones internos. Roy y col. (2000) concluyeron que trabajando con 5 sondas de RAPD-PCR en 5 reacciones PCR individuales fue posible identificar exitosamente una cepa como perteneciente o no a alguna de las especies del complejo *Lactobacillus acidophilus*.

Métodos aplicados al estudio de la diversidad genética

Las metodologías para el estudio de la diversidad genética (polimorfismo) basadas en la amplificación del genoma con sondas arbitrarias son básicamente tres: AP-PCR (arbitrarily primed PCR), RAPD (random amplified polymorphic DNA) y DAF (DNA amplification fingerprinting). Estas técnicas difieren en la longitud de las sondas usadas y en las condiciones de amplificación, separación y visualización del ADN amplificado (Tabla 1), además de generar huellas del genoma de diferente complejidad, siendo las más sencillas las generadas por RAPD y las menos, aquellas obtenidas por DAF. No obstante la disponibilidad de estas técnicas, fue la RAPD la que se posicionó como la más empleada para el estudio de la diversidad genética de bacterias lácticas y probióticas, a juzgar por el número de trabajos científicos en que ha sido empleada. Las causas pueden deberse a que la manipulación de geles de poliacrilamida supone riesgos para la salud que no ofrecen los de agarosa, aunque se debe ser muy cuidadoso al manipular geles embebidos en bromuro de etidio. Por otro lado, la RAPD es más simple y rápida y menos costosa que la AP-PCR y la DAF, aunque genera perfiles con menor cantidad de bandas (Micheli y col., 1997).

Tabla 1

Características de algunas técnicas moleculares para el estudio de la diversidad genética

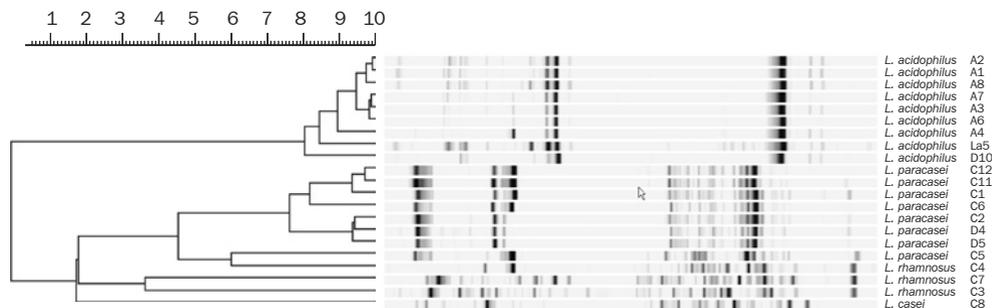
	AP-PCR	RAPD	DAF
Sondas usadas (nº bases)	20	8-10	5-8
Resolución en gel de	poliacrilamida	agarosa	poliacrilamida
Detección por	autoradiografía (incorporación de un agente radiactivo)	tinción con Br etidio y fotografía bajo UV	tinción con Ag

Rossi y col. (1998) también emplearon el análisis con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel convencional (CGE-REA) para el estudio de la diversidad genética de cepas de bacterias propiónicas aisladas, en su mayoría, de quesos típicos italianos. La técnica CGE-REA consiste en la digestión del ADN total con una enzima de restricción (*SmaI*) y la separación de los

fragmentos en gel de agarosa luego de 15 h de migración. Estos autores concluyeron en que ambas técnicas son apropiadas para la distinción de especies de propionibacterias; no obstante, fue más fácil inferir resultados a partir de una primera impresión visual de los perfiles obtenidos por RAPD. Mannu y col. (2000) emplearon la RAPD, en combinación con el perfil de plásmidos y la electroforesis de campo pulsátil (PFGE), para el estudio de cepas de enterococos aisladas del queso italiano Pecorino Sardo. Estos autores encontraron discrepancias entre los grupos de cepas determinados por RAPD y el análisis de perfil de plásmidos: cepas con igual perfil RAPD tenían distintos perfiles de plásmidos, concluyendo que es imposible confiar en una sola técnica para estudiar un sistema microbiano y sólo una combinación de distintas técnicas moleculares es capaz de ofrecer un panorama completo de la ecología microbiana de un producto en particular. Mangin y col. (1999) emplearon tres sondas en tres reacciones separadas de RAPD-PCR para el estudio de la diversidad genética de cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de leche cruda destinada a la elaboración de quesos Camembert en el norte de Francia (Normandía). Cibik y col. (1998) estudiaron la diversidad molecular de *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc citreum* aislados de quesos franceses tradicionales mediante RAPD, secuenciación de la región 16S ADN_r y a través de la comparación de fragmentos amplificados de la misma. Determinaron que no se formaron grupos o clusters que comprendan únicamente cepas de un mismo origen. Las cepas de una fuente podían ser encontradas en grupos correspondientes a otras fuentes, lo que indica que cepas de una misma especie genéticamente distinguibles entre sí pueden exhibir capacidades de adaptación similares, que les permitiría desarrollar juntas en un ecosistema caseario en particular. Estipularon además, que la secuenciación parcial o total del 16S ADN_r puede usarse para confirmar la identificación de las cepas una vez clasificadas usando el método de RAPD. En este estadio se pueden elegir sólo algunas cepas que sean representativas de los grupos establecidos mediante la RAPD y secuenciar sólo éstas. La asociación de tres técnicas moleculares da una amplia información respecto de la tipificación de cepas. Diversos trabajos llevados a cabo en los últimos años entre investigadores del INLAIN (FIQ-UNL) y la Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée (INRA, Francia) aplicaron exitosamente la técnica RAPD-PCR al estudio de la diversidad genética entre cepas argentinas de *Lactobacillus helveticus* (Quiberoni y col., 1998), mutantes espontáneos fago resistentes de *Lactobacillus helveticus* (Quiberoni y col., 1999) y *Streptococcus thermophilus* (Binetti, 2001), y cepas comerciales de bacterias probióticas utilizadas en la Argentina (Vinderola, 2002) (Fig. 2).

Figura 2

Dendrograma obtenido por comparación (Programa Gel Compar, Applied Maths, Bélgica) y reagrupamiento (Método UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) de los perfiles RAPD-PCR de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. casei* comerciales y de colección



La electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE), junto con la RAPD, son los métodos más ampliamente utilizados para discriminar entre cepas de una misma especie. Esta metodología emplea el ADN genómico, el cual es digerido con enzimas de restricción y los fragmentos así obtenidos son separados en gel de agarosa mediante etapas sucesivas de pulsos eléctricos de distinta intensidad (en tiempo del pulso, amperaje y tiempo total de cada combinación duración del pulso/amperaje). La electroforesis en campo pulsátil permite separar grandes fragmentos de ADN lineal y, a diferencia de la electroforesis tradicional, que sólo tiene en cuenta el tamaño de las moléculas para separarlas, se basa en los principios fisicoquímicos de la molécula de ADN (tamaño y carga). Al ser sometida a un campo eléctrico, el ADN se orienta de forma paralela al mismo antes de comenzar la migración, siendo la intensidad de esta orientación proporcional al tamaño de la molécula. Se aplica entonces alternativamente un campo eléctrico en direcciones diferentes, a fin de obligar a las moléculas a reorientarse con cada cambio de la dirección del campo. Las moléculas más grandes se reorientan más lentamente que las pequeñas y estos cambios sucesivos de dirección del campo conducen a una separación de las moléculas según su tamaño y carga. Los parámetros que gobiernan la capacidad resolutoria de esta técnica son los tiempos de conmutación y el ángulo entre los campos. Este método de tipificación cepa-específico ha sido

usado frecuentemente como herramienta epidemiológica; para propósitos taxonómicos el poder discriminatorio es muy grande como para ser usado a nivel de especies. Sin embargo, fue utilizado para obtener perfiles típicos de todas las especies del grupo *Lactobacillus acidophilus* (Klein y col., 1998). El método es muy confiable para el aseguramiento de la calidad ya que permite la comparación de la identidad de una cepa aislada del stock original del proveedor con la identidad de aquella aislada del producto final. Una desventaja es la cantidad de tiempo que consume un análisis de este tipo (de 4 a 5 días).

Capítulo 3

Caracterización tecnológica, biológica y probiótica de cepas

Celso G. Vinderola y Jorge A. Reinheimer

Gran parte de la evidencia sobre los efectos saludables de cultivos y alimentos probióticos se basa en informes anecdóticos y estudios pobremente controlados, haciendo que sea difícil sacar conclusiones y más aun hacer recomendaciones. Sin embargo, en los últimos años se ha estado acumulando evidencia confiable (Reid, 1999) gracias a experimentos bien diseñados que indican que existe un conjunto de cepas de bacterias probióticas suficientemente caracterizadas que han demostrado tener efectos benéficos para la salud (Salminen y col., 1998, Ouwehand y col. 1999). Entre los efectos bien estudiados y documentados se incluyen (Reid, 1999, Dunne y col., 2001, Sanders y Klaenhammer, 2001):

- mejora de la digestión de la lactosa;
- estimulación del sistema inmune y,
- control del crecimiento de la microflora indeseable.

Sobre estos aspectos se darán más detalles al abordar los criterios probióticos de selección de cepas.

Los probióticos se emplean con diferentes propósitos y se suponen que sean activos en diferentes partes del cuerpo (Havenaar y Huis in't Veld, 1992). En el caso particular de los probióticos que se van a adicionar a productos lácteos, deben cumplir una serie de requisitos, aunque no es razonable esperar que una sola cepa cumpla con todos los efectos benéficos deseables.

La mayoría de las cepas probióticas disponibles comercialmente no han sido seleccionadas teniendo en cuenta ninguna actividad específica. A lo sumo, sólo su identidad ha sido confirmada, correspondiendo a alguna de las especies denominadas probióticas (Gilliland, 1998, Sanders y Huis in't Veld, 1999).

A pesar de que hace varios años que se vienen usando, la base científica del concepto de probióticos es pobre, debido principalmente a dos razones, agravadas por los altos costos de los ensayos clínicos:

1- la falta de conocimiento acerca de la complejidad del ambiente intestinal y la dificultad de reconocer especies potencialmente benéficas y

2- una cierta confusión acerca de la identidad, viabilidad y actividad de las cepas (Klaenhammer y Kullen, 1999).

Según Gilliland (1998), el primer factor a considerar en la selección de cepas es que las mismas ejerzan efectos benéficos en la salud. En segundo lugar, las cepas deben retener sus propiedades durante la producción, distribución y almacenamiento del producto usado como vehículo para llegar al consumidor. Por último, si además se busca que la cepa crezca y/o se establezca en el intestino, es necesario tener en cuenta su resistencia a las barreras biológicas que presenta la digestión. No obstante, si se tiene en cuenta la trayectoria que sigue un cultivo probiótico adicionado a un queso (elaboración y almacenamiento del producto, consumo y llegada al ámbito intestinal, desde donde ejercerá sus efectos benéficos), el orden de los criterios de selección debería ser el que se muestra en la Tabla 1.

Además de los criterios de selección, existe una serie de pautas recientemente establecidas (Dunne y col., 1999) que deben tenerse en cuenta al momento de seleccionar cepas:

- no son aceptables las extrapolaciones de datos, aun entre cepas altamente emparentadas;
- en los ensayos sólo deben usarse cepas, productos y poblaciones bien definidas;
- todos los estudios en humanos deben ser realizados en poblaciones elegidas al azar, a doble ciego y con control de placebos;
- los resultados deben ser confirmados por investigadores y
- los estudios deben publicarse preferentemente en revistas con proceso de evaluación.

Tabla 1

Criterios de selección de cepas probióticas para su uso en productos lácteos fermentados

1. Criterios químicos y tecnológicos

- propagación económica
- viabilidad durante la propagación
- resistencia a antibióticos
- crecimiento en leche
- interacciones con otras especies
- resistencia al procesamiento y almacenamiento del producto

2. Criterios biológicos

- resistencia a la lisozima
- resistencia a la acidez estomacal
- resistencia a los ácidos biliares
- resistencia al fenol

3. Criterios probióticos

- ser de origen humano
 - poseer nivel GRAS (generally regarded as safe)
 - producción de sustancias antimicrobianas
 - actividad de β -galactosidasa
 - propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas
 - estimulación del sistema inmune
 - deconjugación de ácidos biliares
 - efecto hipocolesterolémico
 - colonización del intestino
 - co-agregación
 - producción de vitaminas
 - producción de exopolisacáridos
-

Criterios químicos y tecnológicos

Propagación económica

Los microorganismos probióticos se manejan industrialmente en forma de concentrados congelados o liofilizados. Para esto, el microorganismo debe ser capaz de crecer hasta altas densidades celulares en un medio no costoso (leche o medio con base suero) (Charteris y col., 1998a). Para bifidobacterias se han desarrollado medios de cultivo en base suero que no son caros pero que necesitan la adición de cisteína y extracto de levadura para lograr niveles celulares satisfactorios (Modler y Villa-García, 1993). Para *Lactobacillus* se han formulado medios económicos adicionados de complejos nutritivos de origen vegetal o animal (Demirci y col., 1998). Debido a la autoinhibición del cultivo en crecimiento producido por la generación de ácido láctico, una estrategia para mejorar el rendimiento de la propagación de los cultivos es la adición de sales alcalinizantes insolubles que se disuelven a medida de que el ácido es liberado (Henning, 1998).

Viabilidad durante la propagación

Durante el proceso de producción a escala industrial las bacterias están sujetas a diversas presiones tecnológicas que pueden considerarse como factores de stress oxidativo (durante la propagación), mecánico (durante la concentración), osmótico, térmico y químico (durante la liofilización o congelamiento) (Pirovano, 2000). La sobrevivencia durante el congelamiento depende de la cepa empleada, las condiciones de cultivo, la edad del cultivo en el momento de su cosecha, la naturaleza del medio crioprotector y las condiciones del procesamiento. Durante la centrifugación del cultivo, la formación de un pellet firme o suave puede traer importantes consecuencias en el momento de su uso a nivel industrial. La producción de un pellet poco firme indica de por sí la dificultad de lograr una buena recuperación de las células a partir del medio de cultivo y la inclusión de más medio de cultivo en su interior, lo que puede impartir un “flavor “desagradable al producto final (Relly y Gilliland, 1999). Algunos de los factores de estrés involucrados son temperaturas, pH y actividad acuosa bajos. Estos factores provocan pérdidas en la viabilidad, daños en la membrana y en la pared, inhibición del transporte y retención de nutrientes y cambios morfológicos (Baati y col., 2000).

Resistencia a antibióticos

La sensibilidad de las especies probióticas a los antibióticos comúnmente usados en los tratamientos de infecciones en humanos hace que sea segura su presencia en el ambiente intestinal ya que, de darse una transferencia de material genético a bacterias patógenas no se estarían transfiriendo genes de resistencia a antibióticos a bacterias indeseables (Charteris y col., 1998b). De cualquier manera, ha sido determinado que la transferencia genética en lactobacilos probióticos es un fenómeno presente en pocas cepas y con muy baja frecuencia (Klaenhammer, 1998). En general, las bacterias lácticas no parecen ser capaces de transferir resistencia a antibióticos (Donohue y col., 1998). Sin embargo, hay evidencia de que *in vivo* los factores del huésped hacen incrementar las tasas de transferencia de genes respecto de las determinadas *in vitro* (Netherwood y col., 1999). Existe otro aspecto de la resistencia a antibióticos por parte de los cultivos probióticos que debe tenerse en cuenta al momento de la selección de cepas: la contaminación de leche destinada a quesería, aun con niveles mínimos de antibióticos (por ejemplo los empleados en el tratamiento de mastitis animal), puede afectar el crecimiento y viabilidad de los cultivos presentes (Ryser, 1998).

Crecimiento en leche

La fermentación de la leche, especialmente con bacterias intestinales como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* está siendo aplicada para el desarrollo de nuevos productos lácteos, y el ejemplo más conocido el de la “leche acidófila”. Sin embargo, son varios los factores que dificultan la expansión del mercado de estos productos, a saber: el lento crecimiento de estas bacterias en leche, especialmente si no están presentes factores estimulantes del mismo (Klaver y col., 1993), la dificultad del mantenimiento de altos niveles de células viables y las características de aroma y sabor desagradables que el desarrollo en leche de algunas de estas bacterias le imparte al producto (Banina y col., 1998). En este sentido, un crecimiento rápido en leche, actividades acidificantes y proteolíticas adecuadas, una aceptable resistencia a la acidez desarrollada y al oxígeno disuelto y una satisfactoria sobrevida en el producto son factores que determinan la posibilidad de utilizar una cepa para el desarrollo de un producto lácteo fermentado por ella misma (Misra y Kuila, 1991, Hughes y Hoover, 1995). Además, el crecimiento de bifidobacterias en leche es todo un desafío en términos de obtener altos recuentos de células viables sin comprometer la calidad del producto, debido a la producción de ácido acético (Modler y Villa-García, 1993).

Interacciones con otras especies

Para la elaboración de productos probióticos fermentados es necesario además controlar la compatibilidad de las cepas probióticas con las del cultivo iniciador, particularmente si *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* esta presente, ya que se demostró que puede afectar la viabilidad de las bifidobacterias y *Lactobacillus acidophilus* (Charteris y col., 1998a). Por otro lado, *Bifidobacterium bifidum* necesita de otras bacterias lácticas para crecer, pero que no acidifiquen demasiado. En general, se deben tener en cuenta los posibles efectos antagónicos o sinérgicos que puedan presentarse entre las bacterias que integran la formulación microbiológica global del producto (Kailasapathy y Rybka, 1997). En este sentido, no deben verificarse efectos inhibitorios de las bacterias de los cultivos iniciadores hacia las bacterias probióticas, ni tampoco de estas últimas entre sí. Un estudio reciente (Vinderola y col., 2002a) indicó una amplia variedad de comportamientos (ausencia de interacciones, estimulaciones en el crecimiento, retrasos en el desarrollo e inhibiciones totales o parciales del crecimiento) al estudiar el efecto de sobrenadantes libres de células de una cepa sobre otras pertenecientes a especies de bacterias lácticas y probióticas.

Resistencia al procesamiento y almacenamiento del producto

El microorganismo probiótico seleccionado debe ser robusto con relación al proceso con el cual se elabora el producto que se utilizará como vehículo para el mismo. Estudios previos demostraron a su vez que el tipo de producto condiciona la viabilidad de estos microorganismos (Vinderola y col., 2000b). Esto puede implicar la tolerancia a pH bajos, resistencia a bacteriofagos y a los preservantes comúnmente usados (Charteris y col., 1998a). La tolerancia al oxígeno y al ácido presentes son determinantes, principalmente para las bacterias probióticas, para estimar su capacidad de uso en la elaboración de un producto lácteo (Hughes y Hoover, 1995). Entre los varios factores implicados en la elaboración de quesos, el contenido de sales de los mismos (factor no presente en leches fermentadas) puede afectar negativamente la viabilidad de los cultivos probióticos presentes (Gomes y col., 1998). Otros factores que deberían considerarse son la influencia de los compuestos de aroma, colorantes y conservantes empleados en muchos casos en los productos comerciales, que para muchas cepas de bacterias lácticas como probióticas, demostraron efectos inhibitorios (Vinderola y col., 2002b). Hay factores involucrados en la producción industrial de la cepa que determinan la estabilidad de la misma en las etapas posteriores: medio de cultivo empleado, forma de concentración, uso de protectores, condiciones de liofilización o congelación (Sanders y Huis in't Veld, 1999).

Criterios biológicos

Resistencia a la lisozima

La lisozima, presente en la cavidad oral e intestinos, es capaz de lisar ciertas especies de bacterias (Kimoto y col., 2000). Aunque las bacterias lácticas no estarían comprometidas, la variabilidad de propiedades entre cepas es grande. Las especies del grupo *Lactobacillus casei* han demostrado resistencia a las concentraciones fisiológicas de lisozima (Xanthopoulos y col., 2000) así como algunas cepas de lactococos (Kimoto y col., 2000).

Resistencia a la acidez estomacal

Antes de llegar al intestino las bacterias probióticas deben sobrevivir al tránsito a través del estómago, donde la secreción de ácido gástrico constituye una defensa primaria contra la mayoría de los microorganismos ingeridos. Si bien las primeras experiencias, que usaban soluciones de HCl a pH 2,0 y 3,4, constituyeron una aproximación al estudio de este fenómeno, los resultados son más precisos si se usan aspirados gástricos humanos (Dunne y col., 1999), ya que el primer método no tiene en cuenta los efectos protectivos que pudieran ejercer los otros constituyentes de las secreciones ácidas. No obstante, el segundo método es de uso restringido por la limitada disponibilidad del material. Se debe tener en cuenta, además, el efecto protector que podría ejercer el producto utilizado como vehículo para las bacterias probióticas (Charteris y col., 1998a).

Resistencia a los ácidos biliares

Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado a partir del colesterol y son vertidos por la vesícula biliar en el duodeno en su forma conjugada, es decir ligados con unidades de glicina o taurina, para ayudar a la emulsificación, digestión y absorción de grasas, vitaminas hidrofóbicas, colesterol y otros compuestos hidrofóbicos (Tannock, 1998) a nivel intestinal. Tanto los ácidos biliares conjugados como los deconjugados presentan actividad antibacteriana, aunque estos últimos son más inhibitorios (Dunne y col., 1999). El mecanismo por el cual las sales biliares ejercen un efecto inhibitorio puede ser lisis celular (Marteau y col., 1997) o permeabilización de la membrana celular (Mustapha y col., 1997).

Resistencia al fenol

Esta propiedad es un parámetro poco estudiado y su importancia radica en que los fenoles pueden ser formados por la deaminación, por parte de las bacterias intestinales, de algunos aminoácidos aromáticos derivados de la dieta o de las proteínas producidas endógenamente (Xanthopoulos y col., 2000).

Criterios probióticos

Ser de origen humano

Esto es deseable debido al principio de especificidad de especies. Se conocen algunas propiedades que son especie-específicas, incluyendo la capacidad de adherencia y colonización del tejido intestinal y la capacidad de producir una respuesta inmune (Salminen y col., 1998).

Poseer nivel GRAS

A pesar de que la seguridad de las bacterias lácticas tradicionalmente usadas nunca fue cuestionada, el uso reciente de aislamientos intestinales puso en tela de juicio su seguridad. Estos nuevos aislamientos no comparten la probada condición de seguridad alimentaria de aquéllas. Sin embargo, su presencia en productos lácteos en las últimas décadas no ha dado ninguna señal de compromiso de la salud (Sanders y Huis in't Veld, 1999). En 1994, un grupo de trabajo europeo organizado por la LABIP (Plataforma Industrial de Bacterias lácticas) determinó que, con excepción de *Enterococcus*, el riesgo de infección de esta nueva generación de probióticos es muy bajo (Collins y col., 1998). Es evidente que las cepas a usar deben ser inofensivas para el huésped, no debiendo ser patogénicas a nivel local ni general ni provocar reacciones alérgicas, mutagénicas o carcinogénicas, tanto por parte de la célula en sí como por sus productos de fermentación o componentes celulares (Havennar y Huis in't Veld, 1992).

Producción de sustancias antimicrobianas

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus casei* y algunas especies de bifidobacterias demostraron tener la capacidad de inhibir ciertos microorganismos indeseables que pueden encontrarse en el tracto intestinal, como por ejemplo

Salmonella, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* (Lee y col., 1999, Vinderola y Reinheimer, 2003) Se presume que la acción inhibitoria no se debe sólo a la producción de ácidos (láctico, acético) sino además a sustancias tipo antibiótico o bacteriocinas. Otro mecanismo de acción puede ser la exclusión competitiva, por la cual las bacterias probióticas ocuparían los sitios de ligado a la pared intestinal, previniendo la adherencia y crecimiento de patógenos (Gilliland, 1998). Se ha relacionado también el consumo de leches fermentadas con la mejora de cuadros de diarrea infantil ocasionada por rotavirus, diarrea inducida por tratamientos con antibióticos, diarrea del viajero, constipación, encefalopatía hepática y gastritis por *Helicobacter pylori*, entre otros (Salminen y col., 1998), además de prevenir la vaginitis recurrente en mujeres (Chandan, 1999) y el síndrome del intestino irritable (IDF, 1999).

Actividad de β -galactosidasa

La mejora de los síntomas de la intolerancia a la lactosa por parte de productos lácteos fermentados es uno de los pocos efectos probióticos realmente bien documentados, por lo que constituye un importante criterio de selección de cepas.

La falta de niveles adecuados de β -galactosidasa en el intestino delgado para hidrolizar eficientemente la lactosa origina cuadros clínicos conocidos como intolerancia a la misma. Si la lactosa llega al intestino grueso, sufre una fermentación descontrolada que resulta en dolores abdominales, flatulencia y diarrea. No obstante, existe la posibilidad de proveer esta enzima en la dieta o ingerir productos con menor contenido de lactosa, como las leches fermentadas (Salminen y col. 1998). Se ha demostrado que la presencia de cultivos iniciadores viables en el yogur puede afectar benéficamente a los que sufren de estos síntomas. Las células protegen la β -galactosidasa durante el paso por el estómago para que esté activa en el intestino delgado, donde la bilis permeabiliza la célula y permite que el sustrato ingrese a la misma para ser hidrolizado. En el caso de *Lactobacillus acidophilus*, que a diferencia de los cultivos iniciadores puede crecer y sobrevivir en el intestino, se cree que ocurre un mecanismo similar: la bilis aumentaría la permeabilidad celular (Gilliland, 1998) sin llegar a la lisis. Existen estudios que demostraron que las bacterias del yogur (susceptibles a la acidez estomacal) son más efectivas para aliviar los síntomas de maldigestión de la lactosa que los lactobacilos de origen intestinal (Sanders y Klaenhammer, 2001). Tanto la β -galactosidasa de las bacterias del yogur como la de las bacterias probióticas es liberada si se produce la lisis celular a nivel intestinal en la región terminal del íleon, simultáneamente a la llegada de la lactosa a la misma. Por lo tanto, la selección de cepas basadas no

sólo en una buena actividad de lactasa sino también en una escasa resistencia al tránsito estomacal y a las sales biliares puede ser esencial para asegurar una más eficiente digestión *in vivo* de la lactosa (Charteris y col., 1998a).

Propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas

Se han obtenido ciertos resultados en el control de cáncer de colon tanto con microorganismos capaces de sobrevivir en el tracto intestinal como con productos elaborados por cultivos de los que no se espera que posean dicha capacidad. Los mecanismos propuestos son la inhibición directa de la formación del tumor, la inhibición de enzimas (azoreductasa, glucuronidasa, nitroreductasa) que transforman compuestos precarcinógenos en carcinógenos o una acción indirecta: la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables que puedan generar cáncer en el intestino grueso (Gilliland, 1998, Salminen y col., 1998, Naidu y col., 1999). Al presente no hay evidencia en humanos de la supresión de cáncer de colon por el consumo de leches fermentadas. Los datos de los estudios epidemiológicos no sostienen los resultados encontrados *in vitro* (Charteris y col., 1998a).

Estimulación del sistema inmune

La activación del sistema inmune y secretorio por parte de las bacterias lácticas requiere de varias interacciones complejas entre los integrantes del ecosistema intestinal (microflora, células epiteliales, células inmunes) (Perdigón y col., 2001). Se sugiere que las bacterias probióticas activarían de algún modo los macrófagos, los cuales destruirían microorganismos patógenos. Esta estimulación del sistema inmune incrementa las defensas del huésped (Gilliland, 1998). Otros mecanismos sugeridos son la producción de anticuerpos (locales y sistémicos) y el incremento de los niveles de interferón γ (Gill, 1998, Fooks y col., 1999). Los efectos benéficos potenciales de las bacterias lácticas con relación a la estimulación del sistema inmune incluyen la protección contra infecciones entéricas, su uso como vacunas orales, inmunopotenciación en casos de malnutrición y la prevención de tumores inducidos químicamente (Perdigón y col., 1995).

La inmunomodulación ha sido observada tanto en sujetos sanos como enfermos. La forma en que se logra la estimulación no es la misma para todas las especies de bacterias lácticas (Perdigón y col., 1999) y los mecanismos que gobiernan estos efectos no están totalmente esclarecidos, pero se supone que implican la traslocación de una parte de las células ingeridas en el intestino

delgado, además de una activación no específica de fagocitos (Charteris y col., 1998a).

Deconjugación de ácidos biliares

El significado *in vivo* de esta propiedad no está totalmente esclarecido (Charteris y col., 1998a). Se asoció su presencia con una mejor resistencia por parte de las bacterias probióticas a la bilis, que es un fuerte detergente natural (De Smet y col., 1995), lo que les permitiría llegar viables al intestino. Las hidrolasas de las sales biliares actuarían como proteínas detergentes que protegerían a las células probióticas de la acción perjudicial de la bilis intestinal. Se sostiene además la posibilidad de disminuir los niveles de colesterol, ya que los ácidos biliares deconjugados son menos solubles que los conjugados (la solubilidad disminuye con el pH) y se eliminarían con la materia fecal, debiendo emplearse colesterol en la síntesis de nuevos ácidos biliares deconjugados (Walker y Gilliland, 1993). Por otro lado, se piensa que las sales deconjugadas dañan las células epiteliales del colon y estarían implicadas en la formación de cálculos biliares (Charteris y col., 1998a). Además, una excesiva actividad de deconjugación de sales biliares en el intestino delgado podría llevar a una mala absorción de lípidos y vitaminas liposolubles y, si la concentración de ácidos biliares deconjugados es alta se aumentarían las posibilidades de desarrollar cáncer de colon (Tanaka y col., 1999).

Efecto hipocolesterolémico

Algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* pueden asimilar o incorporar colesterol a sus membranas durante su crecimiento *in vitro* en condiciones anaeróbicas y presencia de bilis, condiciones que se pueden encontrar en el intestino. Un tercer mecanismo está relacionado, como ya se dijo, con la capacidad de deconjugación de ácidos biliares de ciertas cepas probióticas. El organismo empleará colesterol para sintetizar los ácidos biliares que fueron deconjugados y eliminados con las heces (Gilliland, 1998).

Las leches fermentadas podrían reducir el colesterol sérico mediante la reducción de la absorción gastrointestinal del colesterol exógeno y endógeno o inhibiendo su síntesis en el hígado. Sin embargo, la reducción en humanos fue observada en estudios con ingestas excesivamente altas (680 a 5.000 mL/día) de leches fermentadas (Charteris y col., 1998a).

Adherencia al epitelio intestinal

La adhesión a las células epiteliales y/o a la mucosa sería el paso inicial para la colonización del tracto intestinal por parte de lactobacilos y bifidobacterias. Se han descrito, además, dos mecanismos generales de adhesión: no específicos (gobernados por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas) y específicos (interacción ligando-receptor mediante polisacáridos exocelulares, proteínas y/o ácidos lipoteicoicos) (Charteris y col., 1998a). Por otro lado, se indicó que la viabilidad de las células probióticas puede ser crucial para la incorporación de sus antígenos a través de las placas de Peyer. Esto podría deberse a la mayor habilidad de los microorganismos viables, respecto de los no viables, para unirse a las células M (Ouwehand y col., 1999).

La mucosa intestinal posee características hidrofílicas, mientras que las zonas donde existen placas de Peyer, que presentan una menor capa de mucosa intestinal, presentan un mayor carácter hidrofóbico. La importancia del carácter hidrófobo de una cepa como factor de selección reside en que permitiría la fijación de las bacterias probióticas a las placas de Peyer y su posterior traslocación al interior de las células epiteliales, donde estimularían el sistema inmune (Perdigón, 2001). Cuando los antígenos presentes en el lumen (luz del intestino) interactúan con las placas de Peyer puede originarse una estimulación de las células T y B, el establecimiento de una cadena de citoquinas y la secreción de anticuerpos al tracto gastrointestinal (Dunne y col., 1999). Las células que no sean capaces de ingresar a las placas de Peyer podrían ejercer algún tipo de acción estimuladora del sistema inmune desde la mucosa intestinal, pero serán más susceptibles al arrastre debido a los movimientos peristálticos (Perdigón, 2001).

Es muy difícil establecer una cepa de bacteria láctica en el intestino de adultos sanos mediante administración oral. Sin embargo, algunas cepas demostraron persistir en este ambiente luego de haber cesado la administración. Por otra parte, se sostiene que sólo en recién nacidos existe la posibilidad de colonizar exitosamente el tracto intestinal con las cepas deseadas debido a que éste es prácticamente estéril y su sistema inmune, inmaduro (Charteris y col., 1998a).

Coagregación

Un ejemplo bien documentado de las interacciones bacterianas es el fenómeno de agregación entre células que pertenecen a la misma cepa (autoagregación) o a diferentes especies (coagregación) (Kmet y col., 1995). La capacidad de agregación se relaciona con la adhesión: es el ligado de un microorganismo a

otro (Ouwehand y col., 1999). Se piensa que esta propiedad mejora la eliminación (por arrastre) y/o destrucción de patógenos en el tracto gastrointestinal (Charteris y col., 1998a), ya que puede resultar favorecido el que las sustancias antibacterianas producidas por los microorganismos probióticos sean efectivas contra bacterias patógenas con las cuales se puedan coagregar.

Producción de vitaminas

Muchas bacterias lácticas alteran el contenido de vitamina B de la leche al desarrollar en ella. Algunas vitaminas del complejo B son consumidas y otras, producidas, como por ejemplo vitamina B12 y ácido fólico (Naidu y col., 1999). En general, una leche fermentada tiene un mayor y más óptimo contenido de vitaminas que la leche de partida. Por ejemplo, se sabe que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* consume ácido fólico mientras que éste es producido durante el desarrollo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* (IDF, 1999).

Producción de exopolisacáridos

A nivel industrial, el interés en la producción de exopolisacáridos (EPS) por parte de un cultivo radica en la posibilidad de aumentar la viscosidad del producto, mejorar su textura y la sensación de suavidad en la boca en el momento de la degustación (Roberts y col., 1995). La presencia de polisacáridos exocelulares en bacterias probióticas se ha relacionado con una mejor adhesión al epitelio y una mejora en la resistencia a la inmunidad específica y no específica del huésped (Charteris y col., 1998a). Existen otros estudios que adjudican a los EPS la capacidad de actuar como fracciones del alimento no digeribles (fibras) y hasta se los asoció con una cierta actividad antitumoral (Torino y col., 2000).

Capítulo 4

Medios de cultivo y métodos moleculares para la enumeración y control de bacterias probióticas en la elaboración y maduración de quesos

Celso G. Vinderola y Jorge A. Reinheimer

Los productos lácteos fermentados se aceptan como vehículos adecuados a través de los cuales los consumidores pueden recibir elevadas concentraciones de bacterias probióticas (Samona y Robinson, 1994, Gomes y col. 1995, Nighswonger y col., 1996, Stanton y col., 1998). El nivel mínimo aconsejado de células viables de bacterias probióticas en productos lácteos consumidos regularmente es variable, de 10^5 UFC/g (Shah y col., 1995) a 10^6 UFC/g (Samona y Robinson, 1994, Arroyo y col., 1994, Rybka y Kailasapathy, 1995, Pagano 1998) y la ingesta semanal aconsejada va de 300 a 400 g ó mL (Samona y Robinson, 1994). Otros autores consideran que para que los alimentos probióticos sean funcionales, la ingesta diaria debería ser de 10^9 a 10^{10} células (Sanders y Huis in't Veld, 1999), lo que se lograría con el consumo diario de al menos 100 mL ó g de un producto que contenga entre 10^7 y 10^8 UFC/mL ó g, aunque hasta el momento los niveles límites de probióticos no han sido claramente establecidos (Charteris y col., 1998a). No obstante, estos valores parecen ser más adecuados para lograr niveles de células viables que sean tecnológica y económicamente factibles que para lograr un efecto probiótico en el consumidor (Roy, 2001). Para poder determinar estos recuentos es necesario disponer de métodos de rutina rápidos y confiables, primordiales para el monitoreo de los cambios en la microflora durante el almacenamiento hasta la fecha de vencimiento del producto (Arroyo y col.,

1994, Gilliland, 1998). Los medios de cultivo para los recuentos no deben ser complejos ni consumir demasiado tiempo en su preparación y, además ofrecer una buena recuperación celular de los microorganismos (Lim y col., 1995). Si bien existen recomendaciones oficiales para el recuento de *Lactobacillus acidophilus* (IDF, 1995) y bifidobacterias (IDF, 1990) (no así para cepas del grupo *Lactobacillus casei*), la gran cantidad de medios de cultivo propuestos por estas reglamentaciones y por otros autores sugiere que no habría un medio universalmente aceptado para el recuento de una especie probiótica (Roy, 2001). Esto provoca dificultad en el control de calidad (Rybka y Kailasapathy, 1996) y en el establecimiento de normas oficiales, lo que lleva a una situación de verdadera confusión a nivel de industrias y de organizaciones de regulación en el establecimiento de métodos apropiados para el control de células viables en productos lácteos probióticos. Por ejemplo, la nueva legislación del Mercosur para leches fermentadas reconoce el agregado de bifidobacterias pero no determina de qué forma se debe llevar a cabo el recuento de las mismas (Fepale, 1996). Más allá de cuál sea el principio probiótico activo, células viables o una sustancia activa probiótica, actualmente los productos probióticos se estandarizan basándose en los recuentos de células viables, con la presunción de que es éste el factor determinante de la funcionalidad de los mismos (Sanders y Huis in't Veld, 1999).

Numerosos medios de cultivo han sido propuestos para el recuento de especies de bacterias probióticas, aisladas o combinadas en cultivos comerciales o en productos (Shah, 1997, Shah, 2000, Roy, 2001). Para la enumeración de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en presencia de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, los medios de cultivo propuestos mostraron resultados variables (Dave y Shah, 1996), especialmente cuando se usan medios desarrollados y validados con cepas distintas de las que se pretende luego enumerar. Además, si está presente *Lactobacillus casei*, el recuento selectivo o diferencial de cada una de las bacterias del complejo microbiano que representaría un producto con cinco especies distintas (por ejemplo: yogur adicionado de bifidobacterias, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*) se torna muy difícil de llevar a cabo debido a varios factores: la falta de recuperación celular de una o varias especies (Lankaputhra y Shah, 1996), la selectividad del medio (Lim y col., 1995, Pacher y Kneifel, 1996) y/o la falta de diferenciación entre colonias de distintas especies (Kneifel y Pacher, 1993, Ghodussi y Robinson, 1996b, Nighswonger y col. 1996).

Para la enumeración de la microflora de yogures adicionados de bacterias probióticas, Onggo y Flete (1993) así como Ghodussi y Robinson (1996a) propusieron la enumeración de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* mediante el uso de medios de cultivo generales, como TPPY y RCPB. Hull

y Roberts (1984) lograron el recuento diferencial de *Lactobacillus acidophilus* mediante el uso de maltosa como único azúcar fermentescible, mientras que Lankaputhra y Shah (1996) y Dave y Shah (1996) lo hicieron empleando salicina como sustrato selectivo. Otros antecedentes de medios de cultivo para *Lactobacillus acidophilus*, aunque más complicados en su preparación, incluyen el uso de sustratos cromógenos (Kneifel y Pacher, 1993). Por su parte, Ingham (1999) logró lo mismo mediante el empleo de agar APT adicionado de acetato de sodio y ácido acético glacial, pero no tuvo éxito en el recuento selectivo de bifidobacterias usando el agar RCA (reinforced clostridial agar) adicionado de ácido nalidíxico, polimixina B, ácido iodoacético, TTC y kanamicina. Sin embargo, Payne y col. (1999) desarrollaron exitosamente un medio económico y con base comercial para el recuento selectivo de bifidobacterias, mientras que Rada y Koc (2000), con el mismo objetivo, desarrollaron otro medio de fácil preparación que contenía mupirocina como agente selectivo. La enumeración selectiva de bifidobacterias empleando una gran variedad de agentes tiene amplios antecedentes (Beerens, 1990, Lapierre y col., 1992, Arroyo y col., 1994, Lim y col., 1995, Pacher y Kneifel, 1996, Nebra y Blanch, 1999). No obstante, los resultados son muchas veces contradictorios. La Federación Internacional de Lechería (IDF, 1990) recomendó el uso del agar NPNL para el recuento de bifidobacterias. Chou (1992) y Dave y Shah (1996) encontraron resultados satisfactorios en el recuento de bifidobacterias empleando este medio; sin embargo, fue desaconsejado posteriormente en un boletín del mismo organismo (IDF, 1992) por no ofrecer una recuperación satisfactoria. Dos amplias revisiones del tema de la enumeración selectiva de bifidobacterias en leches fermentadas (Shah, 1997, Roy, 2001) mostraron la gran variedad de sustancias que han sido empleadas solas o en combinación con tal objetivo (factores bifidogénicos, ácido nalidíxico, kanamicina, polimixina B, cloruro de litio, paromomicina, penicilina G, diclocacilina, azúcares poco comunes, azida de sodio, tinta China, propionato de sodio, N-acetilglucosamina, linolato, iodoacetato, TTC, etc.), con una amplia variabilidad de resultados y diversidad de comportamientos según las cepas empleadas. No obstante la gran cantidad de medios de cultivo propuestos y, a pesar de las varias tentativas llevadas a cabo por la IDF, no existe al día de hoy un método estándar para la enumeración de bifidobacterias sino solamente el consejo de la utilización de cloruro de litio y propionato de sodio como agentes inhibidores (Bonaparte y col., 2001, Roy, 2001).

La Federación Internacional de Lechería redactó documentos relacionados con el recuento de bifidobacterias (IDF, 1990) y *Lactobacillus acidophilus* en productos lácteos fermentados, pero aún no estableció nada para el caso de que se desee enumerar también cepas del grupo *Lactobacillus casei*, lo que además cuenta con escasísimos antecedentes (Shah, 2000). Ravula y Shah (1998) propusieron al agar LC para el recuento selectivo de *Lactobacillus casei* en yogures y

leches fermentadas. Sin embargo, el medio basal que usaron no está disponible comercialmente y debe prepararse a partir de los componentes individuales. Recientemente se ha informado como satisfactorio el uso combinado de agar MRS-Bilis y MRS-LP para el recuento de bacterias probióticas, incluidas las cepas del grupo *L. casei*, en productos lácteos fermentados argentinos (Vinderola y Reinheimer, 2000). El medio basal empleado es la versión comercial del agar MRS, logrando así la enumeración de cepas del grupo *Lactobacillus casei* más bifidobacterias (agar MRS-LP) ó *Lactobacillus casei* más *Lactobacillus acidophilus* (agar MRS-Bilis) ya que ambos inhiben el crecimiento de los cultivos iniciadores. En caso de que se pretenda la enumeración exclusiva de cepas del grupo *Lactobacillus casei* se debería emplear el agar MRS-LP en aerobiosis (la mezcla de cloruro de litio y propionato de sodio inhibe el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* mientras que la aerobiosis hace lo mismo con las bifidobacterias). Por otro lado, para un producto con un contenido de células del grupo *Lactobacillus casei* muy superior al de *Lactobacillus acidophilus*, el recuento de este último podría verse complicado debido a la invasión de las placas de recuento por parte del primero. Para este caso, la Federación Internacional de Lechería está poniendo a punto una técnica que emplea clindamicina como agente inhibidor del crecimiento de los cultivos iniciadores, bifidobacterias, *Lactobacillus reuteri* y de las especies del grupo *Lactobacillus casei* (excepto *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*).

Debido a que los estudios mencionados se llevaron a cabo con cepas diferentes, que los agentes selectivos o diferenciales son de muy distinta naturaleza (azúcares, antibióticos, ácidos, agentes cromógenos), que la enumeración de las mismas se llevó a cabo a partir de productos de muy distintas características y que la extrapolación de datos, aun entre cepas altamente relacionadas, no es aceptable (Dunne y col., 1999), surge la necesidad de contar con una serie de medios de cultivo que sean eficaces en la enumeración selectiva y/o diferencial de las bacterias lácticas y probióticas empleadas en productos lácteos locales. En este sentido, en la Tabla 4 se observa una serie de medios de cultivo que demostraron ser adecuados para tal fin (Vinderola y Reinheimer, 1999 y 2000). En agar LBDA, *Streptococcus thermophilus* se puede reconocer por formar colonias redondas blancas y pequeñas, mientras que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* desarrolla en forma de colonias irregulares y blancas. A pesar de que *Lactobacillus acidophilus* es capaz de crecer en LBDA, así como las cepas del grupo *Lactobacillus casei*, los niveles de células viables de estos microorganismos se encuentran generalmente por debajo de los de cultivos iniciadores en productos lácteos fermentados. De este modo, si se siembran las diluciones más altas del producto será posible enumerar las bacterias lácticas sin interferencia de las probióticas. No obstante, si se encontraran niveles de células viables similares de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, sería asimismo posible llevar adelante un recuento diferencial en algunos casos, de acuerdo con los diferentes aspectos de las colonias: redondas blancas (*Streptococcus thermophilus*), irregulares blancas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), redondas verdes con halo amarillo (*Lactobacillus acidophilus*) y redondas verdes pequeñas (*Lactobacillus casei*) bajo condiciones aeróbicas de incubación. *Lactobacillus acidophilus* se puede reconocer por dar colonias irregulares blancas en agar MRS-Bilis mientras que las cepas del grupo *Lactobacillus casei* forman colonias redondas cremosas grandes. Las bifidobacterias se reconocen en agar MRS-LP por sus colonias redondas pequeñas, mientras que las cepas del grupo *Lactobacillus casei* desarrollan formando colonias redondas cremosas grandes en el mismo medio. En la Fig. 1 se pueden observar los aspectos de colonias de bifidobacterias, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei* al desarrollar en los medios de cultivo mencionados a partir de recuentos realizados en queso Fresco diet.

Tabla 1

Medios de cultivo propuestos para la enumeración de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacterias, cepas del grupo *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en productos lácteos fermentados (3 d, 37 °C)

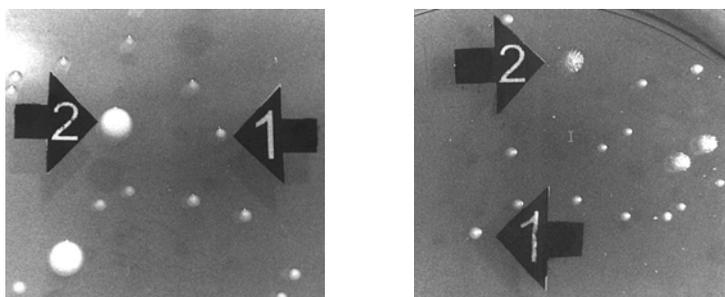
Microorganismo	Medio (agar) ¹	Incubación (37 °C) en
<i>L. acidophilus</i>	MRS-T	aerobiosis
	MRS-Bilis	aerobiosis
	MRS-G	aerobiosis
Bifidobacterias	MRS-LP	anaerobiosis GasPak
	MRS-G	anaerobiosis GasPak
Cepas del grupo <i>L. casei</i>	MRS-LP	aerobiosis
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Leche	aerobiosis
	LBDA	aerobiosis
<i>S. thermophilus</i>	MRS-G	aerobiosis
	Leche	aerobiosis
	LBDA	aerobiosis

T: trehalosa, G: galactosa, LP: cloruro de litio y propionato de sodio, LBDA: agar para diferenciación de bacterias lácticas.
¹ Para el detalle de la composición de los medios de cultivo véase Vinderola y Reinheimer (1999).

El uso de herramientas de biología molecular para el estudio de bacterias lácticas y probióticas ha sido eficientemente aplicado a la identificación y estudio de la diversidad genética de especies del complejo microbiano intestinal (Matsuki y col., 1999, Xanthopoulos y col., 1999, Satokari y col., 2001), quesos (Cibik y col., 2000, Giraffa y col., 2000) o leches fermentadas (Vincent y col., 1998, Roy y Sirois, 2000) así como al reordenamiento de cepas en colecciones microbianas (Tailliez y col., 1996, Daud Khaled y col., 1997). No obstante, aún no se desarrollaron demasiados métodos de rutina que permitan el empleo de esas herramientas de alta precisión para cuantificar dichos cultivos en productos lácteos fermentados.

Figura 1

Colonias de bifidobacterias (1) y *Lactobacillus paracasei* (2) al desarrollar en agar MRS-LP (izquierda) en anaerobiosis (sistema GasPak, Oxoid) y colonias de *Lactobacillus paracasei* (1) y *Lactobacillus acidophilus* (2) al desarrollar en agar MRS-Bilis (derecha) en aerobiosis (37 °C, 4 días de incubación) en un recuento en superficie a partir de queso Fresco diet



Tailliez (1998) diseñó una técnica mediante la cual se puede identificar y enumerar células según su especie, sin aislarlas del producto donde se encuentren. Esto permite el estudio dinámico de los ecosistemas bacterianos y la evaluación del estado fisiológico de las células en su medioambiente. Para esto se utilizan sondas de secuencias nucleotídicas (de 15 a 20 pares de bases) que son marcadas por un agente fluorescente como la rodamina (rojo), la fluoresceína (verde) o la cumarina (azul). Estas sondas son capaces de fijarse en regiones más o menos variables del ARN ribosomal. El método permite identificar células a nivel de especie o a niveles taxonómicos superiores, es

decir, eligiendo secuencias características de un género y no de una especie en particular. Si se conoce una secuencia nucleotídica exclusiva del género *Bifidobacterium* se puede desarrollar una sonda específica de este género que permitirá la detección, por ejemplo en un producto, del total de bifidobacterias sin distinguir la especie. La primera etapa en este proceso es la digestión del medio lácteo con triton (detergente) y tripsina y una posterior filtración para recuperar las células. Se fijan luego las células mediante un tratamiento con paraformaldehído a fin de evitar su degradación. Se las permeabiliza mediante un tratamiento con lisozima para facilitar la entrada de las sondas. Estas se hibridan al ARN ribosomal y las que no lo hacen (al no encontrar los sitios específicos de ligado) son eliminadas en una etapa de lavado. Las células marcadas son luego visualizadas por microscopía de epifluorescencia con un objetivo de poco aumento. Los resultados de recuentos encontrados por esta técnica se correlacionan perfectamente con los recuentos en placas. Esta técnica permite también estudiar sistemas microbianos donde se encuentren presentes distintas cepas de una misma especie si se logra diseñar una sonda específica para cada cepa, lo que no se puede hacer a través de las técnicas de recuento tradicionales. No obstante, la necesidad de contar con equipamiento de alta complejidad limita su uso, por el momento, a los laboratorios superiores de investigación.

Una metodología que combina la técnica tradicional de recuentos en superficie con herramientas de biología molecular para el estudio de la evolución de *Lactobacillus* (incluidas especies probióticas) durante la maduración de quesos, es la informada por Mannu y col. (2000, 2002). En estos trabajos se propone sembrar las muestras de queso en diferentes medios de cultivo, y aislar la raíz cuadrada del número de colonias desarrolladas. Para la identificación de las mismas se emplean sondas especie específicas mediante reacciones de PCR realizadas directamente sobre las colonias purificadas que son permeabilizadas mediante el empleo de microondas, lo que agiliza de modo importante la operatoria ya que los procedimientos de extracción de ADN pueden insumir mucho tiempo al tratarse de un elevado número de cepas. Mediante esta combinación de técnicas tradicionales de recuento y de herramientas de biología molecular se pueden estudiar complejos microbianos donde se encuentren presentes especies o cepas que no se pueden diferenciar mediante los recuentos en superficies tradicionales. Este tipo de técnica combinada fue también aplicado al estudio del monitoreo de una cepa probiótica de *Lactobacillus paracasei* tanto en el alimento que le sirve como vehículo (salchichas en este caso) como en la materia fecal obtenida luego de alimentar a una serie de individuos con este producto (Bunte y col., 2000). Cada uno de los tipos de colonias que aparecieron en los recuentos se sometieron a reacciones PCR con sondas especies específicas tanto de la cepa de interés como de la especie

Lactobacillus paracasei. No obstante, es importante la implementación de un sistema riguroso de análisis estadístico de los resultados debido a que no todas las colonias que aparecen en las placas se someten al análisis por PCR, por lo que, a partir de los resultados de identificación obtenidos con un número reducido de colonias, se debe inferir la identidad de las restantes.

En el trabajo de Lick y Heller (1998) se plantea el estudio de la correlación de los recuentos en superficie para bacterias iniciadoras de yogur con la amplificación de secuencias específicas en las distintas diluciones decimales que se hagan a partir de extractos de ADN total de muestras del producto. En el caso de *Streptococcus thermophilus* se observó que los recuentos obtenidos en placa eran un orden de magnitud mayores que las estimaciones determinadas amplificando diluciones sucesivas de los extractos de ADN total con una sonda específica de la cepa empleada. Se determinó así que son necesarias al menos 10 UFC para obtener una amplificación detectable. No obstante, esta técnica permitió estimar el orden de magnitud mínimo de un determinado microorganismo en un producto sin tener que esperar los días que implican la incubación y pudiéndose estimar la presencia de una cepa (si se dispone de la sonda específica para la misma) entre otras altamente relacionadas.

Con este panorama se puede ver que las técnicas de biología molecular aplicadas a la enumeración de bacterias en distintos ecosistemas están aún en las primeras etapas de desarrollo. Aunque prometedoras y capaces de permitir estudios que no son posibles con las técnicas tradicionales, se deben ajustar las condiciones de trabajo y se puede vislumbrar, desde ya, una posible cepa dependencia de las mismas debido a factores intrínsecos que influyen el número de blancos a amplificar como el estado de desarrollo, características especie- y cepa-específicas o el largo de la cadena.

Capítulo 5

Quesos probióticos. Antecedentes y viabilidad bacteriana

Celso G. Vinderola

La incorporación de cultivos intestinales probióticos a quesos implica enfrentar a estos cultivos con condiciones que pueden influir negativamente en su viabilidad. Entre éstas, la aerobiosis del proceso, los procedimientos de calentamiento en el caso de quesos de pasta dura o semi-dura, la presencia de cultivos iniciadores de rápido crecimiento o el pH relativamente bajo de la cuajada, aunque en todos los casos menos ácido que el de las leches fermentadas (Gobbetti y col., 1998). No obstante, se han llevado a cabo intentos exitosos de agregado de cultivos probióticos a quesos típicos de distintas partes del mundo, que se comentan a continuación.

Un queso muy popular entre los consumidores anglosajones es el Cheddar. Este queso de larga maduración fue tomado como modelo por Dinakar y Mistry (1994) con el objeto de incorporarle bifidobacterias. En el proceso, se inoculó leche pasteurizada con cultivos iniciadores mesófilos a 31 °C y se dejó madurar por 45 min. Posteriormente se agregó cuajo de ternero y la cuajada formada a los 30 min se cortó en dados de 0,65 cm. Luego de 15 min, la temperatura de la cuajada se elevó a 37-38 °C en 30 min y se mantuvo por otros 30 min. El suero fue drenado y la cuajada, chedarizada (proceso durante el cual se conforma una torre de cortes de cuajada que permite la acidificación de la masa y el drenado del suero) hasta pH 5,2 antes del molido de la misma. La cuajada fue posteriormente salada (2 %), inoculada con células libres o inmovilizadas en carragenanos de *Bifidobacterium bifidum* y colocada en moldes. Los moldes se prensaron durante toda una noche y la cuajada prensada

se envasó posteriormente al vacío. Los quesos así preparados se maduraron por 6 meses a 6-7 °C. Los resultados de este estudio demostraron una muy satisfactoria viabilidad del cultivo de bifidobacterias durante la maduración en cualquiera de las dos formas agregadas, no modificando además el sabor, textura y apariencia del producto tradicional. Otro intento de agregado de bacterias probióticas a queso Cheddar es el llevado a cabo por Gardiner y col. (1998), siendo en este caso la especie elegida *Lactobacillus paracasei*. Los autores concluyeron que este tipo de queso resultó muy adecuado para asegurar su viabilidad durante los 8 meses de maduración del producto. Además, el agregado de un adjunto probiótico en el mismo momento que el cultivo iniciador no modifica la tecnología casearia del producto tradicional. Otros estudios notaron no sólo una adecuada viabilidad de las cepas de lactobacilos probióticos o enterococos (Gardiner y col., 1999) empleadas sino además una influencia positiva sobre los atributos de aroma y sabor del queso Cheddar (Lynch y col., 1999).

Por su parte, Daigle y col. (1999) estudiaron la viabilidad de una cepa de colección de *Bifidobacterium infantis*, que había sido desarrollada previamente en crema, en un queso tipo Cheddar. Para la producción de esta crema fermentada por bifidobacterias se descremó leche cruda la que fue luego microfiltrada. Para la obtención de la crema se mezclaron: la crema de la leche cruda (40 % de grasa), el retentado de la microfiltración y leche descremada hasta tener una concentración final de proteínas del 5,2 % y 14 % de grasa. Esta crema se calentó a 55 °C y se homogeneizó para ser posteriormente pasteurizada (85 °C por 15 s). Luego se fermentó ligeramente (hasta pH 6,5) con distintos inóculos (5×10^7 y 1×10^8 UFC/g) de la cepa de *Bifidobacterium infantis* a 37 °C por 2 ó 5 h y se conservó en frío hasta su uso para la elaboración del queso tipo Cheddar. La leche para la elaboración del queso se preparó agregando a leche descremada microfiltrada, la crema previamente elaborada hasta una relación proteína/grasa de 1. Se ajustó luego el contenido de proteínas de la leche para quesería a 4 %. La leche así acondicionada se inoculó con un cultivo iniciador mesófilo (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) y con coagulante bovino. Cuando el coágulo adquirió la firmeza deseada, se cortó la cuajada en forma horizontal y vertical. Se elevó la temperatura a 39 °C en 30 min y se mantuvo a la misma temperatura por un tiempo adicional equivalente. Luego de escurrir el suero, la cuajada se cortó en trozos de 25 a 40 cm los cuales se invirtieron cada 20 min, a una temperatura de 32 °C. Luego de 1 h, las piezas fueron apiladas al doble de su altura. Cuando se llegó a pH 5,4, la cuajada fue molida y salada al 2,6 % del rendimiento teórico y colocada en moldes, los que se mantuvieron bajo presión (35 psi) durante una noche. Luego, los quesos fueron envasados al vacío y conservados a 4 °C por 12 semanas. Los autores observaron que las bifidobacterias se mantuvieron en niveles superio-

res a los 10^6 UFC/g, con una caída en el nivel de células viables menor a 1 orden logarítmico, por al menos 12 semanas, lo que los llevó a concluir que los quesos prensados tipo Cheddar constituyen otro alimento que asegura una adecuada viabilidad de bacterias probióticas.

Gomes y col. (1995) estudiaron la sobrevivencia de *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus acidophilus* en queso Gouda durante 9 semanas de maduración. Para la elaboración de este producto se emplearon leche pasteurizada, NaNO_3 , CaCl_2 , hidrolizado de leche, cultivos probióticos e iniciadores en forma de concentrados congelados, en distintas proporciones, y coagulante bovino. El volumen del suero drenado luego de la coagulación fue del 50 % del volumen inicial de leche. La elaboración de este tipo de queso implica un período de floculación de entre 17 y 23 min seguido de un período de coagulación de entre 24 y 34 min según la variedad considerada, ambos a una temperatura de 32 °C. Posteriormente, la temperatura se elevó a 36 °C para dar lugar a la etapa de agitación de la cuajada por aproximadamente 40 min, para luego dejarse estacionar a 25 °C por 90 min. Finalmente, los tiempos de salados (entre 30 y 87 min) dependieron de la variedad de queso producida. Los recuentos de *Lactobacillus acidophilus* decrecieron aproximadamente 2 órdenes logarítmicos; no obstante, los valores finales estuvieron por arriba de 7 órdenes logarítmicos durante el período de maduración. Por su parte, las bifidobacterias disminuyeron su población en menos de 1 orden logarítmico, hasta llegar a niveles de células viables mayores a 8 órdenes logarítmicos. Los autores concluyeron que el queso Gouda es también un vehículo adecuado para bacterias probióticas.

El queso Cottage es un producto muy popular en los países anglosajones, principalmente Estados Unidos. Su popularidad radica en el bajo contenido en grasa y la ausencia de postacidificación por parte de bacterias lácticas, como consecuencia del cocido de la cuajada. Blanchette y col. (1996) estudiaron la adición a este queso de una crema fermentada con bifidobacterias para originar así un producto con nuevas características dietéticas, organolépticas y texturales. Para la obtención de esta crema fermentada con bifidobacterias, se mezcló crema (40 % grasa) con leche entera (concentración final de grasa de 14 %). Este preparado fue calentado a 55 °C, homogeneizado y pasteurizado a 65 °C por 30 min. Posteriormente se fermentó (37 °C) hasta pH 6,0; 5,5; 5,0 y 4,5 con una cepa de colección de *Bifidobacterium infantis*. Para la elaboración del queso Cottage se obtuvo una cuajada a 32 °C luego de la fermentación de leche descremada con un cultivo iniciador para este tipo de queso. A los 15 min de la inoculación se agregó CaCl_2 y luego de 1,5 h de la adición del cultivo iniciador, se agregó cuajo de ternero y la cuajada se cortó cuando llegó a pH 4,7. El cocido y agitado tuvo lugar 15 min luego del corte de la cuajada a una velocidad de calentamiento tal de llegar a 50-55 °C en

1,5 h. Se drenó el suero y la cuajada se lavó con agua a 21 °C. Un segundo lavado tuvo lugar con agua a 5 °C. Finalmente la cuajada se saló (0,6 %) y se mezcló con la crema hasta una concentración final de grasa en el producto de 4,5 %. Si bien al comienzo de la experiencia los niveles de células viables de la cepa de bifidobacteria empleada se encontraban cercanos a los 7 órdenes logarítmicos, luego de 8 días de almacenamiento refrigerado, los mismos se ubicaban por debajo de los 4 órdenes logarítmicos en todas las condiciones de pH ensayadas y ya a los 28 días, los recuentos eran menores a 1 orden logarítmico. No obstante, la actividad de β -galactosidasa fue importante en todos los casos. Otro intento de agregado de bifidobacterias a queso Cottage, y con mayor éxito, es el informado por O'Riordan y Fitzgerald (1998) quienes estudiaron la viabilidad de *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium angulatum* y *Bifidobacterium infantis*, luego de la inoculación por separado a un nivel de aproximadamente 7 órdenes log, en este producto. La viabilidad luego de 14 d de almacenamiento a 4 °C demostró ser cepa dependiente, con disminuciones en la viabilidad celular de 0,5 a 3 órdenes logarítmicos, según la cepa empleada.

El consumo de queso White Brined está ampliamente difundido en los Balcanes y en países de Europa del este donde las condiciones climáticas y económicas son adecuadas para este tipo de producto. Ghodduzi y Robinson (1996) llevaron a cabo experiencias donde se elaboraron quesos White Brined con cultivos iniciadores de yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) o mesófilos (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) y cultivos de *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium adolescentis*. Estos autores determinaron que *Bifidobacterium adolescentis* no logró sobrevivir en niveles satisfactorios tanto en presencia de cultivos iniciadores de yogur como de quesos. No obstante, *Bifidobacterium bifidum* ofreció una adecuada viabilidad incluso hasta después de los 60 d de la elaboración del producto, con ambos tipos de cultivos iniciadores.

El queijo de cabra es un queso semiduro y ligeramente prensado, típico de Portugal, donde se produce a escala industrial. En el estudio llevado a cabo por Gomes y Malcata (1998) el protocolo tradicional de elaboración se modificó ligeramente para permitir la incorporación de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus*. Brevemente, el proceso de elaboración de este queso probiótico consistió en adicionar a leche de cabra pasteurizada y enfriada a 32 °C, un cultivo mixto iniciador (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*), CaCl_2 , concentrados de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* y cuajo de ternero. El coágulo formado en 25 min fue cortado en dados de 0,95 cm. La temperatura se elevó luego a 38 °C en 20 min. El suero (50 % del volumen total) fue reemplazado

por agua tibia. La mezcla de cuajada y suero resultante se mantuvo a 38 °C por otros 20 min. Luego del segundo drenado del suero, la cuajada se colocó en moldes y se mantuvo a 40 °C durante el prensado (2 kg durante 4 h durante las cuales los quesos se invirtieron 5 veces) y estacionado (3h) para ser luego colocados en salmuera durante distintos tiempos, con el objetivo de lograr un contenido de sal del 2 al 6 %. Los quesos se maduraron a 6 °C durante 70 d en un ambiente de 92 % de humedad relativa. El tamaño final de los mismos era de 12,5 cm de diámetro por 6 cm de altura, con un peso de 1,48 kg en promedio. La viabilidad de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* fue variable según las características químicas de cada queso. No obstante, luego de los 70 d de maduración, el número de células viables era mayor a 7 órdenes logarítmicos en todos los casos.

Kariesh, el queso más popular y de menor costo de Egipto, elaborado con leche de búfala, también fue objeto de estudio en la búsqueda de nuevos productos capaces de vehiculizar bacterias probióticas. Para esto, previo a la elaboración del queso, se preparó un inóculo de bifidobacterias, tratando leche descremada con β -galactosidasa. Posteriormente se adicionó extracto de levadura y de soja, se trató a 90 °C por 10 min y se fermentó durante 24 h con la cepa de *Bifidobacterium bifidum*. Para la elaboración del queso, se inoculó pasteurizada con la leche de búfala descremada y preparación de *Bifidobacterium bifidum* anteriormente descrita y se fermentó durante 24 h a 37 °C. Luego, se escurrió el suero en contenedores perforados y se hizo pasar una solución de NaCl 2 %. El queso así preparado se maduró a 7 °C durante 10 días durante los cuales se estudió la viabilidad de la bifidobacteria. Se observó que a los 10 días de almacenamiento refrigerado los niveles de ésta eran de aproximadamente 8 órdenes logarítmicos, concluyéndose que el queso Kariesh es otro vehículo adecuado para el suministro de bacterias probióticas.

El Crescenza es un queso blando sin cáscara típico de la Lombardía italiana y, debido a su amplia difusión en el mercado italiano ha sido objeto de estudio como posible vehículo de bifidobacterias (Gobbetti y col., 1998). Para su elaboración se empleó leche de vaca entera, la cual se pasteurizó (74 °C 30 s) y enfrió a 35 °C. *Streptococcus thermophilus* fue usado como cultivo starter el cual se agregó, junto a las bifidobacterias, hasta una concentración de 6 órdenes logarítmicos. Se agregó además cuajo de ternero líquido (25 mL/100 kg). La cuajada obtenida luego de 25 min se cortó en trozos de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm. Luego de 60 min, la cuajada se cortó a hasta un tamaño final de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm y se mantuvo a a 35 °C por 150 min, siendo salada por inmersión en solución de NaCl 16-18 % por 1 h a 15 °C. El queso fue madurado durante 10 d a 3-5 °C y almacenado posteriormente a 6 °C durante 4 días (período correspondiente al almacenamiento comercial de este tipo de queso). El peso promedio de estos quesos fue de 2,5 kg con un

diámetro de 20 cm por 15 cm de altura. Se demostró que tanto *Bifidobacterium bifidum* como *Bifidobacterium longum* ofrecieron altos recuentos durante los 14 d de maduración y conservación.

El Fresco Diet es un queso elaborado en la provincia de Santa Fe (Argentina) cuyas características lo asemejan bastante al queso Cremoso argentino. Se estudió la capacidad de este queso para vehiculizar bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La elaboración de este producto implicó la estandarización de leche cruda hasta un porcentaje de grasa de 1,8 % para ser luego pasteurizada a través de un proceso HTST (18 s a 74 °C). Posteriormente se agregaron simultáneamente cultivos congelados de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*. La leche así inoculada fue ultrafiltrada hasta una concentración de sólidos totales del 40 % y el retentado se maduró a 42° C por 3 h. La cuajada se saló (0,9 %), cortó y se envasó al vacío. La maduración del queso se llevó a cabo a 5° C por 12 días. Todos los cultivos probióticos demostraron una viabilidad muy satisfactoria (mayor a 10⁸ UFC/g) incluso hasta los 60 días posteriores a su elaboración (Vinderola y col., 2000a).

Otro queso ampliamente difundido en Italia que ha sido objeto de estudio como posible portador de bacterias probióticas es el Canestrato Pugliese (Corbo y col., 2001). Las condiciones de elaboración de este queso de pasta dura debieron modificarse para no comprometer la viabilidad de los cultivos probióticos. Mientras el protocolo tradicional indica el calentamiento de la cuajada en suero caliente (80 °C por 30 s), en este caso se redujo a 50 °C durante 2 min. Además, la cuajada fue mantenida a 40 °C por aproximadamente sólo 5 h para limitar la acidificación por parte del cultivo iniciador. La producción del queso Canestrato Pugliese probiótico consistió en la inoculación, a 37 °C, de leche de oveja con *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium longum*, a un nivel de aproximadamente 7 órdenes logarítmicos en todos los casos, dejándose 40 min a esa temperatura. Posteriormente se agregó cuajo bovino, produciéndose la coagulación de la leche luego de 25 min a la misma temperatura. La cuajada se cortó a un tamaño de 0,5 -1 cm y se calentó, en presencia del suero, a 50 °C durante 2 min. Se dejó drenar el suero, se colocó la cuajada en moldes y se prensaron los quesos, los que se dejaron a 40 °C por 5 h. Finalmente, los quesos se salaron en superficie y se llevaron a la cámara de maduración por 86 días (12 °C y 90 % de humedad relativa ambiente). Los autores encontraron una mejor sobrevida de *Bifidobacterium bifidum* que de *Bifidobacterium longum*, estando el primero en valores cercanos a los 6 órdenes logarítmicos a los 90 días de maduración, concluyendo que, con ligeras modificaciones de la tecnología casearia tradicional se puede obtener un producto con un alto contenido de células viables de bifidobacterias.

Recientemente fue también investigada la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en el Tallaga, un queso egipcio de bajo contenido de sal (El-Zayat y Osman, 2001). En este estudio, el queso se elaboró con leche fresca de búfala, estandarizada al 4 % de grasa, pasteurizada (63 °C-30 min) y adicionada de CaCl₂ (0,02 %) y NaCl (2,5 %). Se elaboraron quesos probióticos con cada uno de los cultivos mencionados y con ambos, los que se envasaron en bolsas plásticas conteniendo suero hervido y maduraron 28 días a 3 °C. Luego de este período, los quesos mostraron, en promedio, un 56 % de humedad y 20 % de grasa, y un pH comprendido entre 5,1 y 5,7. Los lactobacilos y bifidobacterias redujeron sus niveles en 0,5 y 0,25 órdenes log, respectivamente, durante la maduración resultando sus recuentos siempre superiores a 10⁶ UFC/g, demostrándose así una satisfactoria viabilidad de las bacterias probióticas en el producto.

Las distintas experiencias en las que se evaluó la factibilidad de agregar cultivos probióticos a procesos casearios tradicionales arrojaron resultados alentadores en cuanto a la viabilidad de este tipo de microorganismos y, en general, no implicaron grandes modificaciones en los procesos ni afectaron las propiedades organolépticas de los productos. Estos alimentos se muestran más adecuados que las leches fermentadas para la vehiculización de bacterias probióticas debido a que, principalmente por su menor acidez, garantizan un medio ambiente menos hostil para estos microorganismos.

Capítulo 6

Influencia de los cultivos probióticos en la maduración y características sensoriales

Carlos A. Zalazar

Si bien los cultivos adjuntos de bacterias probióticas han sido ampliamente estudiados en sus características microbiológicas, forma de adición a los quesos, métodos de recuento en productos lácteos y supervivencia durante la elaboración y maduración de quesos, no lo han sido en lo atinente a su influencia sobre la maduración y los atributos organolépticos.

En este sentido hay trabajos recientes que presentan resultados interesantes referidos a la maduración y características finales de los quesos Crescenza (Gobetti y col. 1998), Cheddar (Lynch y col. 1999), Canestrato Pugliese (Corbo y col. 2001) y Tallaga, (El Zayat y Osman, 2001).

En lo que respecta al queso Crescenza, se compararon los elaborados con la incorporación de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium longum* con testigos convencionales sin el agregado de probióticos. Si bien no se hallaron diferencias en los niveles de proteólisis primaria para ambos tipos de quesos, los elaborados con la adición de bacterias probióticas presentaron un mayor nivel de nitrógeno soluble a pH 4,6 y actividades aminopeptidásicas, iminopeptidásicas y di y tripeptidásicas más elevadas. Por otra parte, en los quesos con bifidobacterias se detectó lactosa sólo en trazas y una concentración de ácidos láctico y acético ligeramente superior a la de los quesos convencionales. La actividad de α y β galactosidasa detectada en los quesos probióticos fue mayor que la de los testigos. Las evaluaciones sensoriales en cambio, no mostraron diferencias entre ambos tipos de quesos.

Los estudios llevados a cabo sobre queso Cheddar se hicieron sobre la base del agregado de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* y *Lactobacillus plantarum* a dos tipos de quesos experimentales, los que fueron comparados con testigos convencionales elaborados en forma simultánea. En lo referente al nivel de proteólisis primaria, no se hallaron diferencias entre los testigo y los experimentales, pero estos últimos, principalmente el elaborado con *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, mostraron un nivel considerablemente más alto de aminoácidos libres durante su período de maduración. El análisis sensorial de los quesos practicado a los 3, 6 y 9 meses de maduración, mostró algunas diferencias significativas entre los controles y experimentales con respecto a algunos importantes atributos. El análisis de los datos sensoriales llevado a cabo por componentes principales indicó claras diferencias para aroma y sabor, en el sentido de que los quesos con los cultivos probióticos adjuntos estarían sugiriendo una aceleración en la maduración, ya que recibieron mayor puntaje para estos atributos que los controles.

En este trabajo se concluye finalmente que los cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos, aun teniendo una relativamente baja influencia sobre el proceso de proteólisis durante la maduración de queso Cheddar, poseen la capacidad de incidir significativamente sobre los atributos de aroma y sabor. Los efectos sobre la intensidad del aroma, del sabor, del amargo y del gusto a crema de leche estarían sugiriendo una capacidad de acelerar la maduración a cargo de las bacterias probióticas. Los dos tipos de cultivo adjunto utilizados afectaron los atributos sensoriales en la misma forma.

En lo relativo al queso duro italiano Canestrato Pugliese, de leche de oveja, fue elaborado con la adición de las bacterias probióticas *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*, aisladas o en combinación, que fueron comparados con quesos tradicionales. La composición química general no mostró diferencias significativas y sólo una ligeramente más alta concentración de ácido acético se verificó en los quesos con probióticos. Por el contrario, las actividades α y β galactosidásicas fueron marcadamente más pronunciadas en los quesos con probióticos y en ellos la lactosa fue completamente hidrolizada. Los trazados electroforéticos en Urea-PAGE de las fracciones nitrogenadas solubles e insolubles a pH 4,6 no mostraron diferencias para los dos tipos de quesos, pero en cambio, el análisis por HPLC en fase reversa de la fracción nitrogenada soluble a pH 4,6 mostró un perfil más complejo para los quesos con probióticos, indicando una proteólisis secundaria algo diferente. Esto estuvo de acuerdo con el mayor valor de la relación de nitrógeno soluble a pH 4,6 a nitrógeno total y con la mayor actividad amino, imino y dipeptidásica hallada en todos los quesos probióticos, especialmente los quesos con *Bifidobacterium bifidum*. Con respecto a los contenidos de aminoácidos y ácidos grasos libres, no se hallaron diferencias entre los quesos testigo y experimentales.

Las evaluaciones sensoriales no mostraron diferencias significativas entre los quesos probióticos y los convencionales, conservando todos los atributos de ojos pequeños y uniformemente distribuidos, color ligeramente amarillento, consistencia elástica, salados y moderadamente picantes.

Se concluyó finalmente que los quesos con bacterias probióticas no se vieron afectados en las características microbiológicas, químicas y sensoriales, propias del queso Canestrato Pugliese tradicional.

Los estudios llevados a cabo sobre el Tallaga, un queso blando egipcio cuyo consumo se ha incrementado marcadamente en ese país durante la última década, se realizaron inoculando cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* aisladas o combinadas. En este caso los resultados indicaron un mayor aumento durante la maduración de la fracción de nitrógeno soluble y un mayor decrecimiento del pH para los quesos con probióticos. Los caracteres organolépticos, en cambio, no mostraron diferencias significativas entre los distintos tipos de quesos.

Como corolario de todos estos trabajos puede establecerse que en general el agregado de bacterias probióticas no influye sobre el nivel de proteólisis primaria de las caseínas, pero sí sobre la extensión de la proteólisis secundaria. Este último efecto se pone en evidencia por el mayor nivel de nitrógeno soluble a pH 4,6 de los quesos con probióticos, como consecuencia de las mayores actividades amino, imino, di y tri peptidásicas halladas en ellos. Esta situación es sin duda el origen de los sabores y aromas más acentuados que se encontraron en algunas experiencias, haciendo sugerir a sus autores la posibilidad de una aceleración en la maduración de los quesos experimentales. También hay una total coincidencia al afirmar que los quesos con bacterias probióticas presentaron un menor contenido de lactosa residual y un mayor nivel de ácidos acético y láctico, producto del mayor nivel de actividad α y β galactosidásicas provenientes de estas bacterias.

Se entiende, finalmente, que el agregado de bacterias probióticas no altera el perfil normal de maduración en forma significativa y que los cambios encontrados en las características organolépticas no son suficientes como para cambiar la fisonomía típica de los quesos.

Referencias bibliográficas

Estas referencias corresponden a toda la sección.

- Andrighetto, C.; de Dea, P.; Lombardi, A.; Neviani, E.; Rossetti, L.; Giraffa, G. (1998).** Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Research in Microbiology*, vol. 149, pp. 631-643.
- Arroyo, L.; Cotton, L.N. y Martin, J.H. (1994).** Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. *Cultured Dairy Products Journal*, vol. 29 (2), pp. 20-24.
- Baati, L.; Fabre-Gea, C.; Auriol, D. y Blanc, P.J. (2000).** Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 59, pp. 241-247.
- Banina, A.; Vukasinovic, M.; Brankovic, S.; Fira, D.; Kojic, M. y Topisirovic, L. (1998).** Characterization of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 84, pp. 593-599.
- Beerens, H. (1990).** An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 11, pp. 155-157.
- Binetti, A. (2001).** Bacteriófagos autóctonos de *Streptococcus thermophilus*: aislamiento, caracterización y obtención de mutantes fago resistentes. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Ingeniería Química, UNL.
- Blanchette, L.; Roy, D. y Gauthier, S.F. (1995).** Production of cultured cottage cheese dressing by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 1.421-1.429.
- Blum, S.; Alvarez, S.; Haller, D.; Pérez P. y Schiffrin, E. (1999).** Intestinal microflora and the interaction with immunocompetent cells, *Antoine van Leeuwenhoek*, vol. 76, pp. 199-205.
- Bunte, C.; Hertel, C. y Hammes, W. (2000).** Monitoring and survival of *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 in food and the human intestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 23, pp. 260-266.
- Chandan, R.C. (1999).** Enhancing market value of milk by adding cultures. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 2.245-2.256.
- Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. y Collins, J.K. (1998a).** Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*, vol. 51 (4), pp. 123-136.
- Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. y Collins, J.K. (1998b).** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, vol. 61 (12), pp. 1.636-1.643.
- Cibik, R.; Lepage, E. y Tailliez, P. (2000).** Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 23, pp. 267-278.
- Cocconcelli, P.S.; Parisi, M.G.; Senini, L. y Bottazzi, V. (1997).** Use of RAPD and S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 25, pp. 8-12.
- Collins, J.K.; Thornton, G. y Sullivan, G.O. (1998).** Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 487-490.
- Corbo, M.R.; Albenzio, M.; de Angelis, M.; Sevi, A. y Cobbetti, M. (2001).** Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese

- supplemented with bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 551-561.
- Daigle, A.; Roy, D.; Bélanger, G. y Vuilleumard, J.C. (1999).** Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 1.081-1.091.
- Daud Khaled, A.K.; Neilan, B.A.; Henriksson, A. y Conway, P.L. (1997).** Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 153, pp. 191-197.
- Dave, R.I. y Shah, N.P. (1996).** Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 1.529-1.536.
- De Smet, I.; Van Hoorde, L.; Vande Woestyne, M.; Cristianes, H. y Verstraete, W. (1995).** Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 79, pp. 292-301.
- Demirci, A.; Pometo, A.L.; Lee, B. y Hinz, P.N. (1998).** Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46 (11), pp. 4.771-4.774.
- Dinakar, P. y Mistry, V.V. (1994).** Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 2854-2864.
- Donohue, D.C.; Salminen, S. y Marteau, P. (1998).** Safety of probiotic bacteria. En: *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*, Salminen, S. y von Wright, A. (ed). Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 379-380.
- Drake, M.; Small, C.L.; Spence, K.D. y Swanson, B.G. (1996).** Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, vol. 59 (10), pp. 1.031-1.036.
- Dunne, C.; Murphy, L.; Flynn, S.; O'Mahony, L.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Morrissey, D.; Thornton, G.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; Quigley, E.M.M.; O'Sullivan, G.C.; Shanahan, F. y Collins, K. (1999).** Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials, *Antoine van Leeuwenhoek*, vol. 76, pp. 279-292.
- El-Zayat, A.I. y Osman, M.M. (2001).** The use of probiotics in Tallaga cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, vol. 29, pp. 99-106.
- FAO/WHO (2001).** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report (http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
- Fepale (Federación Panamericana de Lechería) (1996).** Reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de leches fermentadas.
- Fooks, L.J.; Fuller, R. y Gibson, G.R. (1999).** Pre-biotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, vol. 9, pp. 53-61.
- Fox, G.E.; Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, P. Jr. (1992).** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 42, pp. 166-170.
- Furtado, M.M.; Partridge, J.A. y Ustunol, Z. (1993).** Ripening characteristics of reduced fat Cheddar cheese using heat-shocked and live *Lactobacillus casei* as adjunct culture. Abstract D28. *Journal of Dairy Science*, vol. 76 (Suppl. 1), pp. 101.
- Gardiner, G.; Ross, R.P.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G. y Stanton, C. (1998).** Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, June, pp. 2.192-2.199.
- Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (1999).** Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 1.379-1.387.
- Ghodussi, H.B. y Robinson, R.K. (1996a).** The test of time. *Dairy Industry International*, vol. 61, pp. 25-28.
- Ghodussi, H.B. y Robinson, R.K. (1996b).** Enumeration of starter cultures in fermented milks. *Journal of Dairy Research*, vol. 63, pp. 151-158.
- Gill, H.S. (1998).** Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 535-544.
- Gilliland, S.E. (1978).** Beneficial inter-relationships

- between certain micro-organisms and humans: candidate micro-organisms for use as dietary adjuncts. *Journal of Food Protection*, vol. 42, pp. 164-167.
- Giraffa, G.; de Vecchi, P. y Rossetti, L. (1998).** Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 85, pp. 918-924.
- Giraffa, G.; Gatti, M.; Rossetti, L.; Senini, L. y Neviani, E. (2000).** Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66 (4), pp. 1.259-1.265.
- Gobbetti, M.; Corsetti, A.; Smacchi, E.; Zocchetti, A. y De Angelis, M. (1998).** Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 37-47.
- Gomes A.M.P. y Malcata, F.X. (1998).** Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 1.492-1.507.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., Klaver, F.A.M. y Grande, H.J. (1995).** Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk Dairy Journal*, vol. 49, pp. 71-95.
- Gomes, A.M.P.; Teixeira, M.G.M. y Malcata, F.X. (1998).** Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 22, pp. 221-240.
- Havennar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1992).** Probiotics: a general view. En: The lactic acid bacteria in health and disease, Wood, B.J.B (ed). Elsevier Applied Science, London, England, pp. 151-170.
- Henning, D.R. (1998).** Fermented by-products. En: Applied dairy microbiology, Marth, E.H. and Steel, J.L. (ed) Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 251-262.
- Holzappel, W.H.; Haberer, P.; Snel, J.; Schillinger, U. y Huis in't Veld, J.H.J. (1998).** Overview of gut microflora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 41, pp. 85-101.
- Hughes, D.B. y Hoover, D.G. (1995).** Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 268-276.
- IDF (International Dairy Federation) (1990).** Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. Bulletin of the International Dairy Federation N° 252/1990.
- IDF (International Dairy Federation) (1995).** Bulletin N° 306/1995. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*.
- IDF (International Dairy Federation) (1999).** Cultured and culture-containing dairy products in health. Commission F - Dairy Science, Nutrition and Education. Annual Sessions in Athens (Greece), 15-18 September 1999.
- Kailasapathy, K. y Rybka, S. (1997).** *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. - their therapeutic potential and survival in yogurt. *The Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 52, pp. 28-33.
- Kimoto, H.; Ohmomo, S.; Nomura, M.; Kobayashi, M. y Okamoto, T. (2000).** In vitro studies on probiotic properties of lactococci. *Milchwissenschaft*, vol. 55 (5), pp. 245-249.
- Klaenhammer, T.R. (1998).** Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 497-505.
- Klaenhammer, T.R. y Kullen, M.J. (1999).** Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, pp. 45-57.
- Klaver, F.A.M., Kingma, F. y Weerkamp, A.H. (1993).** Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 47, pp. 151-164.
- Kmet, V.; Callegari, M.L.; Bottazzi, V. y Morelli, L. (1995).** Aggregation-promoting factor in pig intestinal *Lactobacillus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 21, pp. 351-353.
- Kneifel, W. y Pacher, B. (1993).** An X-glu based agar medium for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt-related milk products. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 277-291.
- Lankaputhra, W.E.V. y Shah, N.P. (1996).** A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft*, vol. 51 (8), pp. 446-451.
- Lapierre, L., Undeland, P. y Cox, L.J. (1992).** Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of*

- Dairy Science*, vol. 75 (5), pp. 1.192-1.196.
- Lee, Y.K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S.L. (1999).** *Handbook of probiotics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Lick, S. y Heller, K.J. (1998).** Quantitation by PCR of yoghurt starters in a model yoghurt produced with a genetically modified *Streptococcus thermophilus*. *Milchwissenschaft*, vol. 53 (12), pp. 671-675.
- Lim, K.S.; Huh, C.S. y Baek, Y.J. (1995).** A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 2.108-2.112.
- Lodi, R. y Carini, S. (1980).** Inquinamento del latte da clostridi ed inibizione del loro sviluppo mediante uso di lisozima. *Annals of Microbiology*, vol. 30, pp. 103-105.
- Lynch, C.M.; Muir, D.D.; Banks, J.M.; McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F. (1999).** Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 1.618-1.628.
- Mangin, I.; Corroier, D.; Reinhardt, A. y Gueguen, M. (1999).** Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 86, pp. 514-520.
- Mannu, L.; Comunian, R. y Scintu, M.F. (2000).** Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 383-389.
- Mannu, L.; Riu, G.; Comunian, R.; Fozzi, M.C. y Scintu, M.F. (2002).** A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewe's milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, vol. 12, pp. 17-26.
- Marteau, P.; Minekus, M.; Havennar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1997).** Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 1.031-1.037.
- Matsuki, T.; Watanabe, K.; Tanaka, R.; Fukuda, M. y Oyaizu, H. (1999).** Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65 (10), pp. 4.506-4.512.
- Mattila-Sandholm, T.; Matto, J. y Saarela, M. (1999).** Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, vol. 9, pp. 25-35.
- Micheli, M.R. y Bova, R. (1997).** Overview. In: Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Micheli, M.R. y Bova, E. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania.
- Micheli, M.R., Bova, R. y D'Ambrosio, E. (1997).** Random amplified polymorphic DNA assay. Chapter VIII. In: Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Micheli, M.R. y Bova, E. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Misra, A.K. y Kuila, R.K. (1991).** The selection of bifidobacteria for the manufacture of fermented milks. *The Australian Journal of Dairy Technology*, May, 24-26.
- Modler, H.W. y Villa-García, L. (1993).** The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey-based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity. *Cultured Dairy Products Journal*, February, 4-8.
- Murad, H.A., Sadek, Z.I. y Fathy, F.A. (1998).** Production of bifidus Kariesh cheese. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, vol. 94 (12), pp. 409-412.
- Mustapha, A.; Jiang, T. y Savaiano, D.A. (1997).** Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 1.537-1.545.
- Naidu, A.S.; Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. (1999).** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 38 (1), pp. 13-126.
- Netherwood, T., Bowden, R., Harrosin, P. O'Donnell, A.G., Parker, D.S. y Gilbert, H.J. (1999).** Gene transfer in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65 (11), pp. 5.139-5.141.
- Nighswonger, B.D.; Brashears, M.M. y Gilliland, S.E. (1996).** Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products

- during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 212-219.
- O' Riordan, K. y Fitzgerald, G.F. (1998).** Evaluation of bifidobacteria for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in Cottage cheese at refrigeration temperature. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 85, pp. 103-114.
- Ouwehand, A.C.; Kirjavainen, P.V.; Shortt, C. y Salminen, S. (1999).** Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, vol. 9, pp. 43-52.
- Pacher, B. y Kneifel, W. (1996).** Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *International Dairy Journal*, vol. 6, pp. 43-64.
- Pagano, J.C. (1998).** Nueva legislación del Mercosur para leches fermentadas. *Industria Lechera*, vol. 713, pp. 8-13.
- Perdigón, G. (2001).** Comunicación personal. Probióticos y microbiología de alimentos. Curso de posgrado, 29 y 30 de marzo de 2001, Santa Fe.
- Perdigón, G.; Alvarez, S.; Rachid, M.; Agüero, G. y Gobato, N. (1995).** Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 1597-1606.
- Perdigón, G.; Fuller, R. y Raya, R. (2001).** Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Current Issues Intestinal Microbiology*, vol. 2 (1), pp. 27-42.
- Perdigón, G.; Vintini, E.; Alvarez, S.; Medina, M. y Medici, M. (1999).** Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 82 (6), pp. 1.108-1.114.
- Pirovano, F. (2000).** I microrganismi della salute: dalla selezione alla produzione. *L' Industria del Latte*, vol. 36, pp. 89-95.
- Pu, Z.Y.; Dobos, M.; Limsowtin, G.K.Y. y Powell, I.B. (1998).** *Lactococcus* species identification using PCR. *The Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 53, pp. 116.
- Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Quéneé, P.; Suarez, V. y Reinheimer, J.A. (1998).** Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 85, pp. 591-596.
- Quiberoni, A.; Reinheimer, J.A. y Tailliez (1999).** Characterization of *Lactobacillus helveticus* phage resistant mutans by RAPD fingerprints and phenotypic parameters. *Food Research International*, vol. 31 (8), pp. 537-542.
- Rada, V. y Koc, J. (2000).** The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft*, vol. 55 (2), pp. 65-67.
- Ravula, R.R. y Shah, N.P. (1998).** Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milks. *Biotechnology Techniques*, vol. 12 (11), pp. 819-822.
- Reid, G. (1999).** The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65 (9), pp. 3.763-3.766.
- Relly, S.S. y Gilliland, S.E. (1999).** *Bifidobacterium longum* survival during frozen and refrigerated storage as related to pH during growth. *Journal of Food Science*, vol. 64 (4), pp. 714-717.
- Robbins, S.L.; Cotran, R.S. y Kumar, V. (1995).** El tracto gastrointestinal. En: Patología estructural y funcional. Schoen, F.J. (ed). Interamericana, McGraw Hill, España, pp. 837-918.
- Roberts, C.M.; Fett, W.F.; Osman, S.F.; Wijey, C.; O'Connor, J.V. y Hoover, D.G. (1995).** Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 78, pp. 463-468.
- Rossi, F.; Torriani, S. y Dellaglio, F. (1998).** Identification and clustering of dairy propionibacteria by RAPD-PCR and CGE-REA methods. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 85, pp. 956-964.
- Roy, D. (2001).** Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 69, pp. 167-182.
- Roy, D. y Sirois, S. (2000).** Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *Idh* gene. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 191, pp. 17-24.
- Roy, D.; Sirois, S. y Vincent, D. (2001).** Molecular discrimination of lactobacilli used as starters and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiology*, vol. 42, pp. 282-289.

- Rybka, S. y Kailasapathy, K. (1995).** The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 50, pp. 51-57.
- Rybka, S. y Kailasapathy, K. (1996).** Media for the enumeration of yogurt bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 6, pp. 839-850.
- Ryser, E.T. (1998).** Public health concerns. En: Applied dairy microbiology, Marth, E.H. and Steel, J.L. (ed) Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 263-404.
- Salminen, S.; Deighton, M.A.; Benno, Y. y Gorbach, S.L. (1998).** Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects, Salminen, S. y von Wright, A. (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 211-253.
- Samona, A. y Robinson, R.K. (1994).** Effect of yoghurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *Journal of the Society of Dairy Technology*, vol. 47, 2, pp. 58-60.
- Sanders, M.E. y Huis in't Veld, J.H. (1999).** Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues, *Antoine van Leeuwenhoek*, vol. 76, pp. 293-315.
- Satokari, R.M.; Vaughan, E.E.; Akkermans, A.D.L., Saarela, M. y de Vos, W. (2001).** Bifidobacterial diversity in human feces by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67 (2), pp. 504-512.
- Savage, D.C. (1992).** Growth phase, cellular hydrophobicity and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58 (6), pp. 1.992-1.995.
- Schleifer, K.H.; Eharman, M.; Beimfohr, E.; Brckmann, E.; Ludwig, W. y Amann, R. (1995).** Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 5, pp. 1.081-1.094.
- Shah, N.P. (2000).** Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, vol. 83 (4), pp. 894-907.
- Shah, N.P.; Laakaputhra, W.E.V.; Britz, M.L. y Kyle, W.S.A. (1995).** Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, vol. 5, pp. 515-521.
- Silvi, S.; Rumney, C.J. y Rowland, I.R. (1996).** An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 81, pp. 561-564.
- Stanton, C.; Gardiner, G.; Lynch, P.B.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (1998).** Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 491-496.
- Tailliez, P. (1998).** "Nuevos métodos para la selección de bacterias lácticas y el estudio de ecosistemas bacterianos complejos". VII Jornada Técnica Lactocasearia, Facultad de Ingeniería Química (UNL).
- Tailliez, P.; Quéneé, P. y Chopin, A. (1996).** Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ: application de la RAPD à un groupe de lactobacilles. *Lait*, vol. 76, pp. 147-158.
- Tanaka, H.; Doesburg, K.; Iwasaki, T. y Mierau, I. (1999).** Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 2.530-2.535.
- Tannock, G.W. (1998).** Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 527-533.
- Torino, M.I.; Mozzi, F.; Sesma, F. y Font de Valdez, G. (2000).** Effect of stirring on growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. *Milchwissenschaft*, vol. 55 (4), pp. 204-206.
- Vincent, D.; Roy, D.; Mondou, F. y Déry, C. (1998).** Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 43, pp. 185-193.
- Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (1999).** Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 9 (8), pp. 497-505 .
- Vinderola, C.G.; Prosello W.; Ghiberto D. y Reinheimer, J.A. (2000a).** Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 1.905-1.911.

- Vinderola, C.G.; Bailo, N. y Reinheimer, J.A. (2000b).** Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, vol. 33, pp. 97-102.
- Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (2000).** Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products, *International Dairy Journal*, vol. 10 (4), pp. 271-275.
- Vinderola, C.G.; Mocchiutti, P. y Reinheimer, J.A. (2002a).** Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 721-729.
- Vinderola, C.G.; Costa, G.A.; Regenhardt, S. y Reinheimer, J.A. (2002b).** Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 12, pp. 579-589.
- Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (2003).** Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barriers resistance. *International Dairy Journal*, vol. 36, pp. 895-904.
- Vinderola, C.G. (2002).** Cultivos probióticos intestinales adicionados a productos lácteos. Métodos para su cuantificación y estudios de los parámetros que condicionan su supervivencia. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Ingeniería Química, UNL.
- Walker, D.K. y Gilliland, S.E. (1993).** Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 956-961.
- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, vol. 51, pp. 221-271.
- Xanthopoulos, V.; Ztaliou, I.; Gaier, W.; Tzanetakis, N. y Litopoulou-Tzanetaki, E. (1999).** Differentiation of *Lactobacillus* isolates from infant faeces by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 87, pp. 743-749.
- Xanthopoulos, V.; Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N (2000).** Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology*, vol. 17, pp. 205-215.
- Ziemer, C.J. y Gibson, G.R. (1998).** An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 473-479.

Sección 3

Infecciones fágicas

La infección fágica de bacterias lácticas (BAL) usadas como cultivos iniciadores en la industria láctea fermentativa es una de las principales causas de fallas en su capacidad acidificante (Neve, 1996; Moineau, 1999). Este hecho determina una menor velocidad o, en casos extremos, la detención del proceso fermentativo, lo que deriva en severas consecuencias tecnológicas y comerciales (Limosowtin y col., 1996).

La leche cruda es considerada la principal fuente de ingreso de fagos a las plantas procesadoras, debido a que los mismos son liberados a partir de las cepas lisógenas presentes (Everson, 1991; Dinsmore, 1995). Los fermentos naturales o artesanales (suero fermentos y leche fermentos) contienen, asimismo, una alta concentración fágica. Estos fagos, liberados también por inducción espontánea, normalmente no alteran la actividad acidificante de esos fermentos ya que en su compleja microflora láctica ocurre una continua selección de cepas resistentes a los mismos (Giraffa, 1993; Neviani y Carini, 1994). El ingreso de fagos a las plantas constituye un problema difícil de manejar, ya que la diseminación de estas partículas virales en el ambiente industrial es muy rápida (Neve y col., 1989).

El perfeccionamiento de los métodos para disminuir el nivel de bacteriofagos en plantas elaboradoras de yogur y quesos se ha tornado imprescindible, a fin de minimizar los riesgos de pérdidas económicas. En la Argentina, el estudio de estrategias para controlar su presencia se ha abordado en los últimos años, a partir del reemplazo de los fermentos naturales, resistentes a fagos, por fermentos seleccionados importados con alta sensibilidad hacia los fagos autóctonos, principalmente para quesos blandos y semiblandos (Suárez y col., 2002).

Capítulo 1

Tratamientos térmicos y químicos para la inactivación de fagos

Viviana B. Suárez, Ana G. Binetti, Andrea Quiberoni,
Daniela Guglielmotti y María L. Capra

Es escasa la información existente relacionada con el estudio de la inactivación de bacteriofagos de bacterias lácticas utilizando métodos físicos y/o químicos. Los estudios realizados en países europeos están focalizados en fagos de especies mesófilas, mayormente utilizadas en esas regiones (Hunter y Whitehead, 1940; Nicholds y Wolf, 1945; Parker y Elliker, 1951; Bennet y Nelson, 1954; Wilkowske y col., 1954; Hiatt, 1964; Daoust y col., 1965; Zottola y Marth, 1996). En nuestro país, la BAL de mayor importancia tecnológica es *Streptococcus thermophilus*, especie termófila usada en la elaboración de yogur y una gran variedad de quesos de pasta blanda (Cremoso, Cuartirolo, Port Salut, Fresco) y semiblanda (Holanda, Fontina, Colonia, Edam y Pategrás) (Reinheimer y col., 1997). Este hecho hizo necesario focalizar el estudio de la metodología de control fundamentalmente sobre fagos de esta especie bacteriana. No obstante, actualmente existe la tendencia a utilizar fermentos mixtos que combinan BAL termófilas (*Streptococcus thermophilus*) con BAL mesófilas (pertenecientes al género *Lactococcus*). El aislamiento de fagos autóctonos específicos de *Lactococcus lactis* (de elaboraciones defectuosas de quesos) y de *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (de elaboraciones defectuosas de yogur) permitió completar en el Instituto de Lactología Industrial –INLAIN– (FIQ-UNL) un estudio sobre fagos autóctonos y relacionar los resultados obtenidos con los de trabajos previos, realizados en otros países.

La información obtenida y volcada en este capítulo se refiere a la termo

y quimio resistencia de fagos aislados en nuestro país y otros orígenes, para permitir diseñar tratamientos eficientes para el control de los mismos en procesos industriales.

Tratamientos térmicos

Los tratamientos de pasteurización normalmente utilizados en los procesos queseros son del orden de 63 °C - 30 min o 72 °C - 15 s, mientras que en la elaboración de yogur los calentamientos aplicados son más energéticos (90 °C - 5') (Tamine y Robinson, 1991; Spreer, 1995). El uso de temperaturas elevadas, combinado con factores como el empleo de fermentadores cerrados y una menor manipulación durante el proceso (equipamiento, utensilios y personal) hace que las plantas elaboradoras de yogur se vean menos afectadas por infecciones fágicas que las de quesos (Forde y Fitzgerald, 1999; Suárez y col., 2002).

En la Argentina, diversos estudios realizados en el INLAIN durante los últimos años determinaron la resistencia térmica de fagos específicos de *Lactobacillus helveticus* (Quiberoni y col., 1999), *Streptococcus thermophilus* (Binetti y Reinheimer, 2000), *Lactococcus lactis* (Suárez y Reinheimer, 2002), *Lactobacillus delbrueckii* (Quiberoni y col., 2003) y *Lactobacillus paracasei* (Capra y col., 2003), la mayoría de ellos aislados de procesos defectuosos de plantas ubicadas en diferentes puntos del país.

En la Tabla 1 se muestran los valores de T_{99} (tiempo necesario para inactivar el 99 % de la concentración inicial de partículas fágicas) para estos fagos de distintos géneros y especies de BAL, a temperaturas de pasteurización y utilizando leche descremada como medio de suspensión.

El tratamiento de pasteurización de baja temperatura (LHTT), en general, no resultó eficiente para una total inactivación de partículas virales en suspensiones de alto título ($> 10^6$ UFP/mL). Para fagos de *Streptococcus thermophilus*, un calentamiento de 63 °C - 30 min no fue un tratamiento suficiente para eliminar el 99 % de partículas fágicas para 4 de los 5 fagos estudiados. Más aun, en el caso de los fagos 021-5 y 031-D, 45 min de tratamiento no aseguraron la eliminación total de partículas fágicas (Fig.1).

Los resultados obtenidos para fagos de lactococos fueron variables. Los fagos 001 y QP4 demostraron resistir el proceso ($T_{99} > 45$ min). Por el contrario, los fagos 046 y QF12 resultaron más sensibles. ($T_{99} = 16,7$ min y $T_{99} = 2,7$ min, respectivamente). La destrucción total de partículas virales se logró solamente para el fago QF12, a los 15 min de tratamiento (Fig. 1).

Los fagos de *Lactobacillus helveticus* utilizados provienen de colecciones internacionales (American Type Culture Collection y CNRZ) y mostraron

resultados también variables. Los fagos hv y ATCC 15807-B1 exhibieron una baja resistencia térmica ($T_{99} < 13$ min). El primero de ellos resultó muy lábil y suspensiones en leche de elevado título se inactivaron completamente después de 15 min de exposición (Fig. 1). En cambio, los fagos pertenecientes a la colección CNRZ (0241 y 832-B1) mostraron una elevada resistencia a la temperatura ($T_{99} \geq 45$ min).

Para *Lactobacillus delbrueckii* se estudiaron 3 fagos autóctonos (YAB, BYM y IB3) y un fago de referencia (LL-H). Según los resultados que se muestran en la Tabla 1, el fago LL-H fue el más sensible a la temperatura. Los fagos autóctonos mostraron valores de $T_{99} > 45$ min, mientras que para el fago LL-H este valor fue de 15,8 min, a pesar de lo cual no se logró eliminar todas las partículas virales presentes con 45 min de calentamiento (Fig 1).

Se estudiaron dos fagos de colección de *Lactobacillus paracasei*, PL-1 (ATCC 27092-B1) y J-1 (ATCC 27139-B1). Ambos resultaron muy lábiles a la temperatura, obteniéndose valores de T_{99} de 2,5 min y 3,1 min (PL-1 y J-1, respectivamente) (Tabla 1). No obstante estos resultados, no se observó destrucción completa de partículas virales para el fago J-1 luego de 45 min de tratamiento (Fig.1).

Tabla 1

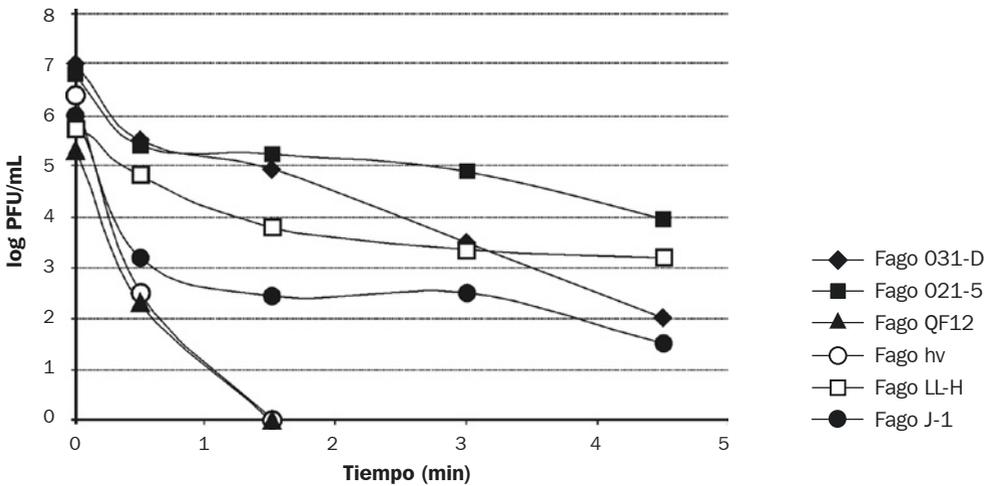
Resistencia térmica (T_{99} , min) de fagos de distintas especies de bacterias lácticas en leche descremada

Especie	Fago	Temperatura	
		63 °C	72 °C
<i>Streptococcus thermophilus</i>	021-4 ^a	> 45	3,5
	021-5 ^a	30,0	< 2,0
	0BJ ^a	> 45	12,0
	031-D ^a	12,0	< 2,0
	CYM ^a	> 45	12,0
<i>Lactococcus lactis</i>	001 ^a	> 45	20,0
	046 ^a	16,7	2,2
	QF12 ^a	2,7	< 2,0
	QP4 ^a	> 45	4,3
<i>Lactobacillus helveticus</i>	hv	2,2	< 2,0
	ATCC 15807-B1	12,8	< 2,0
	CNRZ 832-B1	> 45	21,1
	CNRZ 0241	45,0	8,9
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	BYM ^a	> 45	2,3
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	YAB ^a	> 45	< 2,0
	lb3 ^a	> 45	2,9
	LL-H	15,8	< 2,0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	PL-1	2,5	< 2,0
	J-1	3,1	< 2,0

^a fagos aislados en la Argentina

Figura 1

Cinéticas de inactivación térmica (63 °C), para fagos de bacterias lácticas, en leche descremada



A partir de estos resultados se puede inferir que la pasteurización de leche de baja temperatura (63 °C - 30 min) pudo ser resistida por los fagos de diferentes especies de BAL, no resultando eficiente como método de inactivación fágica segura en procesos de quesería.

La pasteurización de alta temperatura (72 °C - 15 s / HTST) resultó más eficiente que la de baja temperatura, aunque no lo suficiente en todos los casos estudiados para lograr una eliminación completa de los fagos presentes (Tabla 1).

Para fagos de *Streptococcus thermophilus*, los más sensibles resultaron el 021-5 y el 031-D, con valores de T_{99} menores de 2 min y una inactivación total de sus suspensiones luego de 5 y 30 min, respectivamente (Fig. 2).

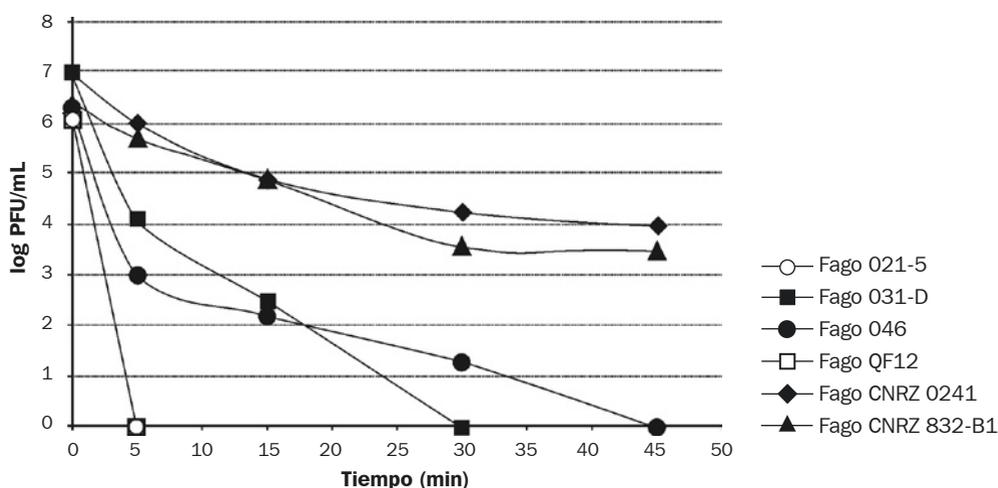
En cuanto a fagos de *Lactococcus lactis*, solamente las suspensiones en leche de los fagos 046 y QF12 fueron inactivadas luego de 45 y 5 min, respectivamente, a esta temperatura (Fig. 2). El fago 001 se mostró particularmente resistente (T_{99} = 20 min).

La resistencia de fagos específicos de *Lactobacillus helveticus* fue comparable con la demostrada para fagos de lactococos. Las suspensiones de los fagos hv y ATCC 15807-B1 se inactivaron totalmente con menos de 2 min de exposición a 72 °C. En cambio, los fagos pertenecientes a la colección CNRZ (0241 y 832-B1) mostraron una elevada resistencia a la temperatura ya que sus suspensiones no pudieron inactivarse completamente en 45 min (Fig. 2).

Los valores de T_{99} a 72°C encontrados para los fagos de *Lactobacillus delbrueckii* resultaron bajos (< 2,9 min) (Tabla 1), con una inactivación completa de la suspensión antes de los 45 min de calentamiento. Es interesante remarcar la importante influencia del aumento de la temperatura en el caso de bacteriofagos de *Lactobacillus delbrueckii*, ya que tratamientos de 63 °C fueron bien resistidos.

Figura 2

Cinéticas de inactivación térmica (72 °C), para fagos de bacterias lácticas, en leche descremada



Por último, para los bacteriofagos de *Lactobacillus paracasei*, los valores de T_{99} resultaron menores a 2 min en ambos casos (Tabla 1). Los dos fagos fueron notablemente sensibles a la temperatura, no detectándose partículas virales luego de 5 min de tratamiento.

Un calentamiento de 5 min a la temperatura normalmente empleada para leche destinada a elaboración de yogur (90 °C) inactivó la totalidad de las partículas virales presentes para todos los fagos ensayados de las diferentes especies, salvo el fago Ib3 para el cual se necesitaron 15 min.

Sozzi y Maret (1975) demostraron que el fago s265 de esta especie permanecía viable luego de 1 h a 65 °C, requiriéndose 1 h a 72 °C o 20 s a 90 °C para la eliminación total de las partículas fágicas. Otros estudios (Nicholds y Wolf, 1945; Zottola y Marth, 1996) demostraron una alta resistencia térmica para fagos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Estos fueron capaces de sobrevivir

a procesos normales de pasteurización, ya que exposiciones de 7 min a 77,8 °C no lograron destruirlos completamente. Para fagos de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, Daoust y col. (1965) reportaron que tratamientos de 65 °C durante 1,25 - 3 min fueron suficientes para lograr disminuciones de 3,5 a 4 órdenes logarítmicos en los recuentos. Auad y col. (1997) reportaron una muy alta sensibilidad a la temperatura para un fago temperado de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, cuya población inicial se redujo a 10; 0,1 y 0,01 % después de 60 min de tratamiento a 50 °C, 60 °C y 70 °C, respectivamente.

Es interesante señalar que la inactivación térmica de bacteriofagos de BAL no sigue una cinética de primer orden (Wilkowske y col., 1954; Zottola y Marth, 1996; Quiberoni y col., 1999; Binetti y Reinheimer, 2000) (Figs. 1 y 2) sino que puede separarse en dos o tres componentes lineares (Daoust y col., 1965). Durante los primeros estadios del tratamiento la concentración viral decrece rápidamente siguiendo una cinética de primer orden hasta una destrucción de aproximadamente el 90 % de las partículas (Hiatt, 1964). Posteriormente, la velocidad de destrucción se reduce hasta el final del período de tratamiento. La heterogeneidad inherente a los virus fue postulada por Wilkowske y col. (1954) como justificación a este comportamiento. La presencia de una pequeña proporción de fagos resistentes al calor provocaría la disminución de la velocidad en los segmentos finales de estas curvas. Por otro lado, el agrupamiento de las partículas virales podría ser un factor físico que explique también este comportamiento bimodal de la inactivación (Hiatt, 1964).

Tratamientos químicos

Los tratamientos con biocidas están recomendados para mantener un “status” higiénico adecuado de los ambientes industriales, equipos y utensilios. Sin embargo, la eficiencia de estos productos en la destrucción de fagos no es una propiedad a tener en cuenta aisladamente para su uso en la industria alimentaria. El criterio para seleccionar un biocida incluye también la facilidad en su aplicación, ausencia de influencia en el producto, inocuidad de sus residuos y rapidez de acción (Nicholds y Wolf, 1945; Schröder, 1984). Al igual que para los tratamientos térmicos, existen escasos estudios sobre la resistencia química de fagos, estando además focalizados sobre fagos de lactococos (Hunter y Whitehead, 1940; Parker y Elliker, 1951; Bennet y Nelson, 1954).

Los biocidas utilizados en los estudios llevados a cabo recientemente en el INLAIN sobre bacteriofagos fueron hipoclorito de sodio, etanol, isopropanol y ácido peracético. Estos biocidas se seleccionaron por su uso común para desinfección en plantas industriales y laboratorios.

En general, para fagos específicos de *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus*

thermophilus, el hipoclorito de sodio fue un biocida eficiente a bajas concentraciones (100 ppm) (Tabla 2), para una eliminación completa de las partículas virales presentes, al igual que para los fagos de *Lactococcus lactis* 001 y QF12. Sin embargo, para los fagos 046 y QP4 de esta especie se necesitaron para tal fin concentraciones de 300 ppm (45 min) y 200 ppm (30 min), respectivamente (Fig 3), con valores de T_{99} , para 100 ppm, de 32,7 y 8,5 min (Tabla 2), respectivamente. Los fagos de *Lactobacillus delbrueckii* mostraron ser más resistentes que los de las demás especies estudiadas. Para una completa inactivación de los fagos BYM, YAB y LL-H se necesitaron 400 ppm de hipoclorito de sodio y tiempos de entre 5 y 45 min (Fig. 3), aun con valores de $T_{99} \leq 2$ min (Tabla 2). Un caso particular fue el del fago Ib₃, que no se vio afectado con tratamientos de 45 min con 100 - 400 ppm de hipoclorito. Se necesitaron concentraciones de 1.200 y 1.400 ppm para lograr destruir todas las partículas fágicas presentes en 45 o 15 min, respectivamente (Fig. 3).

Los fagos de *Lactobacillus paracasei* mostraron una resistencia relativamente elevada, necesiándose una concentración de 800 ppm para inactivar todas las partículas virales presentes. Con una concentración de 700 ppm se observaron reducciones de 4,8 y 5,0 órdenes logarítmicos para los fagos PL-1 y J-1, respectivamente (Fig. 3).

En cuanto al etanol, las concentraciones más efectivas fueron 75 % y 100 %, dependiendo del fago estudiado. En el caso de fagos de *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus*, el etanol 75 % dio en general menores valores de T_{99} .

Para los primeros, las suspensiones de los fagos de la colección CNRZ (832-B1 y 0241) fueron inactivadas completamente con 5 min de exposición usando etanol 50 % (Tabla 2), mientras que los fagos hv y ATCC 15807-B1 fueron más sensibles a la concentración de 75 % (Fig. 4).

Tabla 2

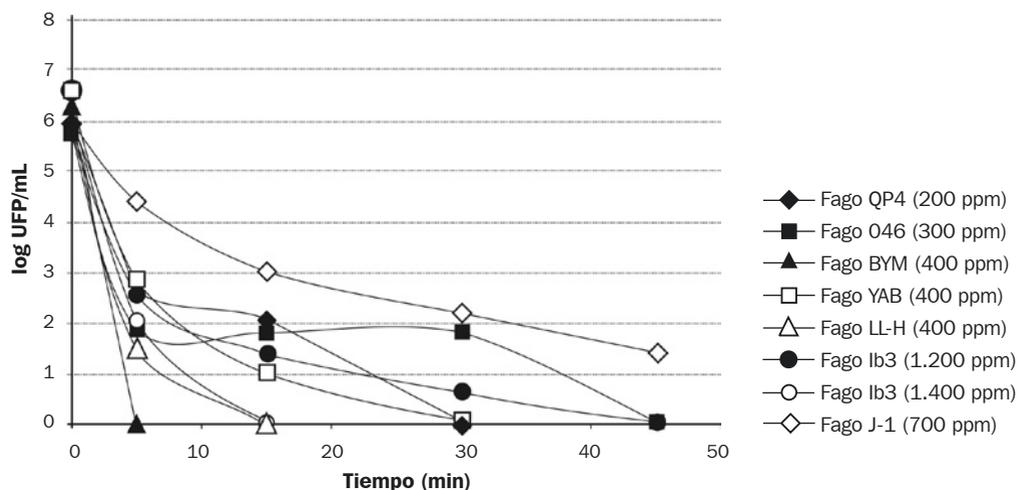
Resistencia al hipoclorito de sodio y a alcoholes (T₉₉, min) de fagos de distintas especies de bacterias lácticas

Especie	Fago	Biocida																	
		Hipoclorito de sodio (ppm)						Etanol (% v/v)						Isopropanol (% v/v)					
		100	200	300	10	50	75	100	10	50	75	100	10	50	100				
<i>Streptococcus thermophilus</i>	021-4 ^a	<5,0	-	-	>45	18,0	1,5	>45	>45	32,0	3,5	>45	>45	32,0	3,5				
	021-5 ^a	<5,0	-	-	>45	45,0	3,5	5,3	5,3	5,0	11,0	>45	5,0	5,0	11,0				
	0BJ ^a	<5,0	-	-	45	3,5	1,8	1,8	1,8	8,2	1,8	>45	>45	8,2	1,8				
	031-D ^a	<5,0	-	-	>45	2,1	2,1	3,5	3,5	3,0	5,0	>45	>45	3,0	5,0				
	CYM ^a	<5,0	-	-	>45	45,0	2,4	3,2	3,2	>45	7,9	>45	>45	>45	7,9				
<i>Lactococcus lactis</i>	001 ^a	<5,0	-	-	>45	>45	18,5	1,9	>45	45,0	3,8	>45	>45	45,0	3,8				
	046 ^a	32,7	<5,0	-	>45	>45	>45	24,3	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
	QF12 ^a	<5,0	-	-	>45	>45	4,9	3,6	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
	QP4 ^a	8,5	<5,0	-	>45	>45	1,3	3,8	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
<i>Lactobacillus helveticus</i>	hv	<5,0	-	-	>45	7,2	2,2	7,2	7,2	5,0	35	>45	5,0	5,0	35				
	ATCC 15807-B1	<5,0	-	-	>45	2,2	<2,0	2,8	2,8	5,0	2,8	>45	5,0	5,0	2,8				
	CNRZ 832-B1	<5,0	-	-	14,7	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	>45	<2,0	<2,0	<2,0				
	CNRZ 0241	<5,0	-	-	>45	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	>45	<2,0	<2,0	<2,0				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	BYM ^a	13,0	3,0	<2,0	>45	>45	8,4	2,5	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
	YAB ^a	8,7	6,5	2,8	>45	>45	7,6	<2,0	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	lb3 ^a	-	-	>45	>45	>45	>45	22,2	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
	LL-H	8,1	2,5	<2,0	>45	>45	7,4	4,8	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
<i>Lactobacillus paracasei</i>	PL-1	-	-	>45	>45	>45	9,7	10,3	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				
	J-1	-	-	>45	>45	>45	5,5	9,0	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>45				

^a Fagos aislados en la Argentina

Figura 3

Cinéticas de inactivación con hipoclorito de sodio para fagos de bacterias lácticas



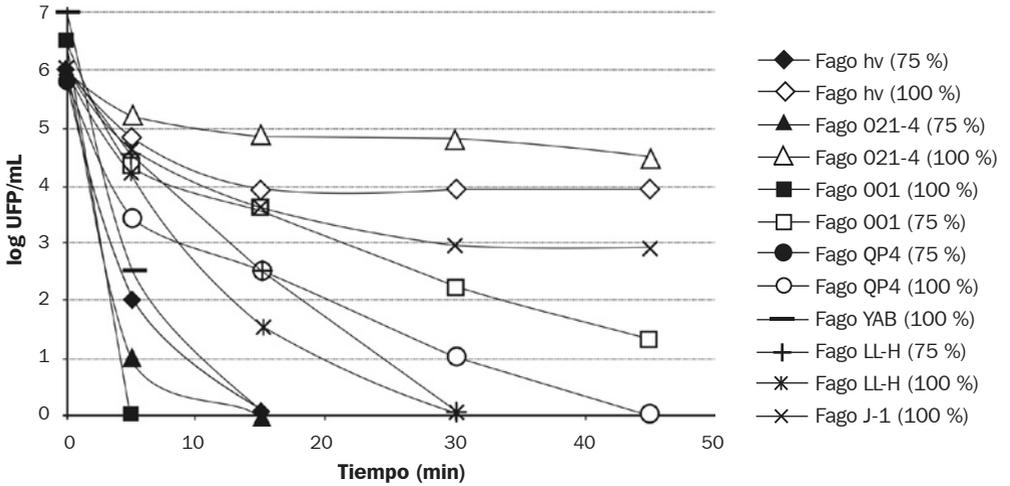
Los bacteriofagos de *Streptococcus thermophilus* mostraron, en general, menores valores de T_{99} para 75 % etanol ($\leq 3,5$ min) respecto del 100 %. Las suspensiones de los fagos 021-4, 031-D y CYM fueron inactivadas completamente con etanol al 75 y 100 % en tiempos que oscilaron entre 15 y 45 min. Un caso particular resultó el fago 021-4, cuya suspensión fue inactivada completamente en 15 min cuando se usó etanol al 75 %, mientras que el etanol 100 % solamente disminuyó en 1 orden logarítmico el recuento de partículas virales (Fig. 4).

Para los fagos de lactococos estudiados (excepto el fago QP4) el etanol 100 % fue la concentración ensayada más efectiva, revelando menores valores de T_{99} y siendo el fago 046 el más resistente (Tabla 2). Para los fagos 001 y QP4 se logró una rápida (< 5 min) inactivación completa de las suspensiones, con alcohol 100 % y 50 %, respectivamente (Fig. 4).

La concentración 100 % de etanol también produjo la más rápida inactivación de partículas fágicas para los cuatro fagos de *Lactobacillus delbrueckii* estudiados. El fago Ib₃ fue el más resistente ($T_{99} = 22,2$ min) y en 45 min de tratamiento disminuyó su recuento en 3 órdenes logarítmicos. El fago YAB resultó el más sensible ($T_{99} < 2,0$ min) y la destrucción total de su suspensión se alcanzó en 15 min. Una concentración del 75 % fue eficiente para una completa inactivación solamente en el caso del fago LL-H, luego de 30 min (Fig. 4).

Figura 4

Cinéticas de inactivación con etanol (% v/v) para fagos de bacterias lácticas



Las concentraciones de 75 % y 100 % resultaron de similar eficiencia para los dos fagos de *Lactobacillus paracasei* y en ningún caso se llegó a la destrucción total de las partículas fágicas presentes (Fig. 4).

Para los estudios mencionados, el alcohol isopropílico se utilizó en concentraciones del 10 %, 50 % y 100 %. Un 10 % del alcohol no produjo efectos sobre la inactivación viral. Las concentraciones del 50 % y 100 % fueron efectivas en el caso de fagos de *Lactobacillus helveticus*. Para el fago hv fue más eficiente la concentración del 50 % ($T_{99} = 5$ min), mientras que para el fago ATCC 15807-B1 lo fue el 100 % ($T_{99} = 35$ min). Para este último se logró una inactivación total a los 45 min de tratamiento (Fig. 5). Para los fagos de la colección CNRZ (832-B1 y 0241) las dos concentraciones resultaron igualmente eficaces ($T_{99} < 2,0$ min), lográndose una destrucción completa a los 5 min de tratamiento (Tabla 2).

Para fagos de *Streptococcus thermophilus* el isopropanol no fue un buen biocida, ya que la destrucción total de partículas fágicas en suspensiones de elevada concentración se logró solamente para el fago 031-D, con concentraciones de 50 % y 100 %, a los 15 min. Para los demás fagos (021-4, 021-5, 0BJ y CYM) las dos concentraciones tuvieron efectos similares, disminuyendo de 2 a 4 órdenes logarítmicos los recuentos de partículas viables (Fig. 5).

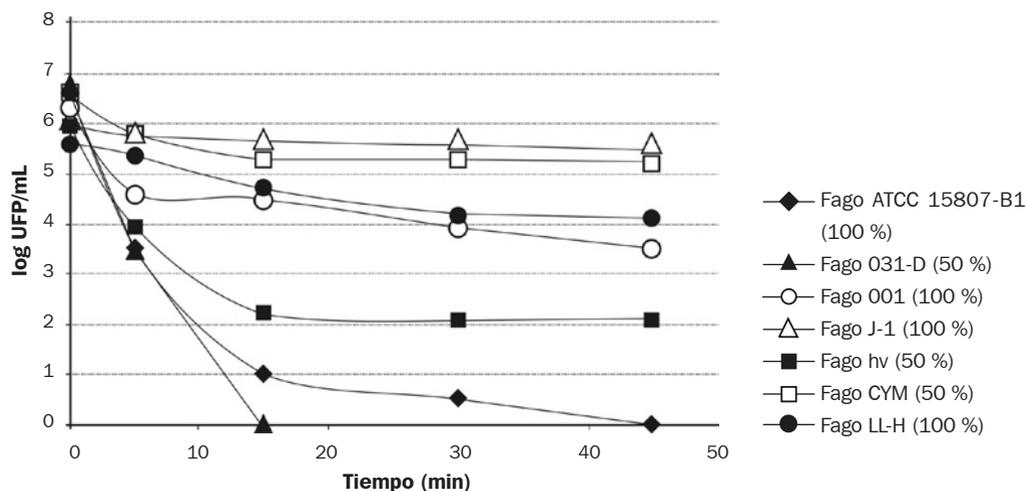
El alcohol isopropílico tuvo un bajo poder viridicida sobre los fagos de

lactococos estudiados. Los valores de T_{99} resultaron siempre mayores de 45 min (Tabla 2), excepto para el fago 001, que mostró un bajo valor de T_{99} (3.8 min) (Fig. 5) para la concentración del 100 %. Bajo ninguna condición se logró una total inactivación de las suspensiones virales.

Se observaron bajas reducciones en los recuentos cuando se utilizó isopropanol con fagos de *Lactobacillus delbrueckii* ($T_{99} > 45$ min) (Tabla 2). El más sensible resultó ser el fago LL-H, al experimentar una reducción de 1,5 órdenes logarítmicos en sus recuentos al ser tratado con 100 % de isopropanol (Fig. 5).

Figura 5

Cinéticas de inactivación con isopropanol (% v/v) para fagos de bacterias lácticas



Los fagos PL-1 y J-1 de *Lactobacillus paracasei* no se vieron prácticamente afectados por el isopropanol (Fig. 5). Los valores de T_{99} fueron siempre mayores a 45 min (Tabla 2).

El ácido peracético al 0,15 % produjo una rápida destrucción viral para todos los fagos usados, ya que suspensiones fágicas en alto título ($\cong 10^6$ UFP/mL) fueron completamente inactivadas antes de los 5 min de tratamiento.

Basado en los resultados obtenidos se puede asegurar que el ácido peracético fue el mejor agente viridicida. Trabajos previos (Maillard y col., 1996a; 1996b) demostraron que este agente (1 %) modifica la estructura del ADN del bacteriofago F116 (específico de *Pseudomonas aeruginosa*) y que una concentración de 0,1 % logra la reducción del 99,99 % de las partículas virales

presentes en 10 min de contacto. El hipoclorito de sodio fue eficiente en concentraciones de 100 - 300 ppm, salvo para un fago de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Ib3), para el que se necesitó una concentración de 1.200 ppm para inactivar completamente sus suspensiones. Hunter y Whitehead (1940) y Bennet y Nelson (1954) demostraron que concentraciones mayores a 500 ppm fueron necesarias para inactivar fagos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, pero utilizando leche y suero como medio de suspensión. Otro estudio reciente (Parada y Fabricio, 2001) sobre fagos de *Lactococcus lactis* demostró la necesidad de utilizar concentraciones entre 1.000 - 1.200 ppm de hipoclorito de sodio cuando el medio de suspensión fue leche, y 100 - 300 ppm para caldo M17. Según Maillard y col. (1998), el fago F116, activo sobre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, fue altamente sensible a bajas concentraciones (5 ppm y 75 ppm) de hipoclorito de sodio, logrando reducciones del título de al menos 4 órdenes logarítmicos en 30 s. El estudio principal sobre el uso de etanol es el realizado sobre el fago F116. En ese caso, tratamientos con 70 % y 100 % de etanol durante 30 min produjeron alteraciones en la cápside viral (Maillard y col., 1996a), pero no en el ADN del fago.

Referencias bibliográficas

- Auad, L.; Ruiz Holgado, A.; Forsman, P.; Alatossava, T. and Raya, R. (1997).** Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* temperate bacteriophage. *Journal of Dairy Science*, vol. 80 (11), pp. 2706-2712.
- Bennet, F. and Nelson, F. (1954).** Action of certain viricidal agents on lactic *Streptococcus* bacteriophage in liquids. *Journal of Dairy Science*, vol. 36, pp. 847-856.
- Binetti, A. and Reinheimer, J. (2000).** Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *Journal of Food Protection*, vol. 63, pp. 509-515.
- Capra, M.; Quiberoni, A. and Reinheimer, J. (2004).** Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 38, pp. 499-504.
- Daoust, D.; El-Bisi, H. and Litsky, W. (1965).** Thermal destruction kinetics of lactic streptococcal bacteriophage. *Applied Microbiology*, vol. 13, pp. 478-485.
- Dinsmore, P.K.; Klaenhammer, T.R. (1995).** Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. A review. *Molecular Biotechnology*, vol. 4, pp. 297-314.
- Everson, T.C. (1991).** Control of phages in the dairy plant. FIL-IDF Bulletin 263, chap. 3, pp. 4-11.
- Forde, A. and Fitzgerald, G. (1999).** "Bacteriophage defense systems in lactic acid bacteria", p. 89-113. In: Proceedings of the 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria: genetics, metabolism and applications. Kluwer Academic Publishers, Veldhoven, The Netherlands.
- Giraffa, G. (1993).** Fermeti lattici. Starter per formaggi freschi e molli: I batteri lattici termofili. *Latte*, vol. 18 (4), pp. 436-444.
- Hiatt, C. (1964).** Kinetics of the inactivation of viruses. *Bacteriological Reviews*, vol. 28, pp. 150-163.
- Hunter, G. and Whitehead, H. (1940).** The action of chemical disinfectants on bacteriophages for the lactic streptococci. *Journal of Dairy Research*, vol. 11, pp. 62-66.
- Limosowtin, G.K.Y.; Powel, I.B. and Parente, E. (1996).** Types of starters. In: T.M. Cogan, J.-P. Accolas (ed.), Dairy Starter Cultures, VCH Publishers, Inc., New York, pp. 101-129.
- Maillard, J-Y.; Beggs, T.; Day, M.; Hudson, R. and Russel, A. (1996a).** The effect of biocides on proteins of *Pseudomonas aeruginosa* PAO bacteriophage F116. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 80, pp. 291-295.
- Maillard, J-Y.; Beggs, T.; Day, M.; Hudson, R. and Russel, A. (1996b).** Damage to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteriophage F116 DNA by biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 80, pp. 540-544.
- Maillard, J-Y.; Hann, A.; Bauber, V. and Perrin, V. (1998).** Efficacy and mechanisms of action of sodium hypochlorite on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 phage F116. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 85, pp. 925-932.
- Moineau, S. (1999).** Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. In: W.N. Konings, O.P. Kuipers, J.H.J. Huis in't Veld (Ed.), Proceedings of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: genetics, metabolism and applications. Veldhoven, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers - Dordrech / Boston / London, pp. 377-382.
- Neve, H. (1996).** Bacteriophage. In: T.M. Cogan, J.-P. Accolas (ed.), Dairy Starter Cultures. VCH Publishers, Inc., New York, pp. 157-190.
- Neve, H.; Krusch, U.; Teuber, M. (1989).** Classifica-

- tion of virulent bacteriophages of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yoghurt and Swiss-type cheese. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 30, pp. 624-629.
- Neviani, E. and Carini, S. (1994).** Microbiology of Parmesan cheese. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 12, pp. 1-8.
- Nicholds, A. and Wolf, J. (1945).** The heat resistance of the bacteriophages of cheese starter with observations on the estimation of phages concentration. *Journal of Dairy Research*, vol. 14, pp. 93-100.
- Parada, J. y de Fabrizio, S. (2001).** Estabilidad de fagos de *Lactococcus lactis* frente al hipoclorito de sodio y durante el almacenamiento. *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 33, pp. 89-95.
- Parker, R. and Elliker, P. (1951).** Destruction of the lactic acid *Streptococcus* bacteriophage by hypochlorite and quaternary ammonium compounds. *Journal of Milk and Food Technology*, vol. 14, pp. 52-54.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. and Reinheimer, J. (2003).** Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 84, pp. 51-62.
- Quiberoni, A., Suárez, V. and Reinheimer, J. (1999).** Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *Journal of Food Protection*, vol. 62, pp. 894-898.
- Schröder, W. (1984).** Peracetic acid. Disinfectant for the foodstuff industry. Brauwelt International, vol. 1, pp. 115-120.
- Sozzi, T. and Maret, R. (1975).** Isolement et quelques caractéristiques des bacteriophages de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus helveticus* de ferments d'Emmental. *Lait*, vol. 545, pp. 269-278.
- Spreer, E. (1995).** Acidified milk products. In: Milk and dairy product technology, Ed. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 339-363.
- Suárez, V. and Reinheimer, J. (2002).** Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *Journal of Food Protection*, vol. 64 (10), pp. 1756-1759.
- Suárez, V.; Quiberoni, A.; Binetti, A.; Reinheimer, J. (2002).** Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *Journal of Food Protection*, vol. 65 (10), pp. 604.
- Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. (1991).** Fundamentos del proceso de elaboración del yogur. En: Yogur, ciencia y tecnología, Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 7-77.
- Wilkowske, H.; Nelson, F. and Parmelee, C. (1954).** Heat inactivation of bacteriophage strains active against lactic streptococci. *Applied Microbiology*, vol. 2, pp. 250-253.
- Zottola, E. and Marth, E. (1996).** Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*, vol. 49, pp. 1.338-1.342.

Capítulo 2

Metodologías para la detección de fagos en plantas industriales

Andrea Quiberoni y Jorge A. Reinheimer

Las consecuencias económicas de las infecciones fágicas hacen necesario controlar la presencia de bacteriofagos en ambientes industriales y laboratorios, con objeto de minimizar los ataques y lograr fermentaciones normales y productos de calidad elevada y uniforme. Para este control, distintos tipos de metodologías pueden utilizarse.

Los métodos microbiológicos tradicionales proveen información acerca de la sensibilidad de un cultivo pero sin discernir especies de fagos o grupos morfológicos. Además, son fácilmente aplicables en cualquier laboratorio medianamente equipado. Por su parte, las técnicas moleculares, tales como sondas de ADN, inmunoensayos o amplificación por PCR pueden detectar la naturaleza de los grupos fágicos pero no ciclos líticos activos. Estos métodos requieren equipamiento específico y son más aptos para laboratorios muy bien equipados o centros especializados.

A continuación se describen los métodos disponibles para la detección y enumeración de bacteriofagos en ambientes industriales.

Detección de bacteriofagos

El primer paso en el análisis es la preparación del filtrado de la muestra sospechosa de contener bacteriofagos (Fig. 1). La misma es tratada como sigue:

a- el pH debe ajustarse asépticamente a pH 4,5 - 4,7, para precipitar la caseína, empleando ácido láctico estéril (10 % v/v);

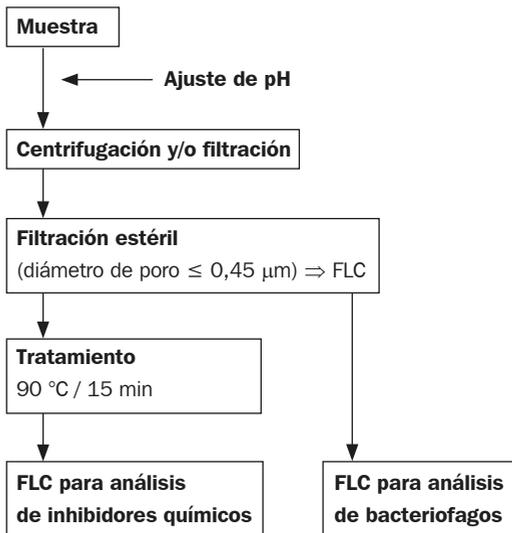
b- la muestra es posteriormente centrifugada a 5.000 g durante 20 min para eliminar el precipitado y las células bacterianas;

c- el sobrenadante es luego filtrado a través de membranas estériles (diámetro de poro $\leq 0,45 \mu\text{m}$) y almacenado en un recipiente también estéril. Este filtrado libre de células (FLC) es utilizado en los ensayos de detección y enumeración de bacteriofagos;

d- para diferenciar entre el efecto de bacteriofagos y otros agentes inhibidores, una alícuota del FLC es sometida a tratamiento térmico (15 min, 90 °C). Tal tratamiento inactiva los bacteriofagos pero no ejerce ningún efecto sobre otros posibles inhibidores, como antibióticos, lo que permite concluir si el origen de la inhibición eventual es de tipo lítica (por fagos) o química.

Figura 1

Preparación de muestras para detección de bacteriófagos



Las metodologías más antiguas y tradicionales para la detección de los fagos y que aún hoy se emplean extensivamente, se basan en la inhibición de las bacterias lácticas integrantes del starter, si aquellos están presentes (Hull, 1977).

En el método más conservador, la inhibición por parte de una muestra sospechosa de contener partículas fágicas es medida a través del descenso en la

producción de ácido láctico (comparada con un control libre de muestra) de un cultivo starter desarrollado en leche estéril o pasteurizada. Si la producción de ácido por parte del cultivo conteniendo el FLC de la muestra se reduce, se sospecha de la presencia de bacteriofagos. Este ensayo es conocido como Test de Actividad (Bulletin IDF 129, 1980).

Algunas modificaciones de este ensayo derivaron en los conocidos Test de Pearce (Pearce, 1969), donde se simula una elaboración quesera, o el Test Indicador, donde el retraso en el descenso del pH (producción de ácido láctico) es marcado por un retraso en el cambio de color del indicador empleado (púrpura de bromocresol, azul de metileno, resazurina) (Valles, 1955, Steenson y Klaenhammer, 1985).

El Test de Turbidez, por otra parte, se basa en observar la clarificación (lisis) de un cultivo de la bacteria láctica indicadora en medio líquido causada por la presencia de bacteriofagos en el FLC de la muestra, comparando con un control (cultivo de la bacteria sin adición de muestra). La lisis puede observarse visualmente o registrarse a través de lecturas de densidad óptica (Svensson y Christiansson, 1991).

Un ensayo que puede ser también semicuantitativo es el Spot Test. En su forma más simple permite indicar presencia o ausencia de bacteriofagos. Para ello, las cepas hospedadoras elegidas se mezclan con agar blando y se distribuyen sobre medio agarizado. Pequeñas gotas del FLC se aplican sobre las mismas. Durante la incubación, las células bacterianas se multiplicarán formando un tapiz turbio y confluyente en el agar. La presencia de fagos provocará la lisis de las células infectando las vecinas y formando así una zona clara sobre el tapiz (Svensson y Christiansson, 1991).

Todos estos métodos tradicionales son útiles y aseguran la detección solamente si se emplean cepas puras como indicadoras. En el caso de starters o cultivos comerciales multicepas, aun cuando una cepa sensible se lise, las acompañantes, eventualmente resistentes al fago presente, continuarán desarrollando, volviéndose dominantes y haciendo que la detección de éste no sea posible. En estos casos se hace necesario el aislamiento y purificación de las cepas que integran el cultivo starter empleado en la elaboración correspondiente. Para ello se realizan cultivos en medios agarizados (adecuados a las especies bacterianas en estudio) y posterior aislamiento y purificación de clones potencialmente diferentes. Estas cepas puras pueden ser después utilizadas como cepas hospedadoras en los ensayos detallados.

Un segundo tipo de métodos analíticos de detección, instrumentales en su mayoría, surgió con posterioridad, logrando reducir los tiempos de análisis y brindando la ventaja de un mayor número de muestras analizadas en menor tiempo. Estas técnicas se basan en inmunoensayos (Lembke y Teuber, 1979), determinación de cambios en la impedancia (Hose and Sozzi, 1983), de ATP

por bioluminiscencia (Champiat y col., 1988) o de la conductancia (Carminati y Neviani, 1991).

Los métodos basados en medición de conductancia o impedancia permiten detectar cambios en estos parámetros de la leche. Si ocurre una infección fágica, las células hospedadoras serán destruidas y decrecerá la cantidad de ácido láctico y otros metabolitos liberados en la leche, dando como resultado un cambio de los valores de impedancia o conductancia, que serán menores y/o se reducirán cuando se comparan con la evolución observada en un cultivo puro sin adición del FLC. Estos métodos permiten detectar serias fallas en el starter dentro de 2 - 2,5 horas de análisis, dando lugar a la toma rápida de decisiones para solucionar el problema: cambio del starter o desinfección.

Aunque fueron (específicamente la medición de la conductancia) aplicados con éxito para detectar fagos de *Streptococcus thermophilus*, resultando sensibles (pueden detectar hasta 10 UFP/mL) (unidades formadoras de placas/mL), rápidos y repetitivos (Carminati y Neviani, 1991), no han sido masivamente adoptados, posiblemente debido a la dependencia instrumental, por lo que normalmente se sigue recurriendo a los ensayos tradicionales para confirmar y visualizar la presencia de fagos.

Como se sabe, los bacteriofagos pueden subdividirse en distintos grupos morfológicos. Un fago puro, inyectado en un conejo, inducirá la producción de anticuerpos específicos contra las proteínas estructurales. Estos anticuerpos son parte de las defensas del conejo y se unirán solamente al mismo fago o a otros estrechamente relacionados (Jarvis, 1977). Basado en este principio sería posible detectar la presencia de fagos usando anticuerpos dirigidos a ellos. En esto se basan los métodos inmunológicos, y el ensayo más comúnmente utilizado es la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay). Usando una mezcla de anticuerpos dirigidos contra todos los grupos morfológicos de fagos sería posible detectar la presencia de todos los tipos de fagos en un solo ensayo. Con estos ensayos fue posible alcanzar niveles de detección de 10^5 UFP/mL (Lembke y Teuber, 1979). La gran ventaja de estos métodos es el tiempo de detección (menor a 1 hora), pero las limitaciones de índole económica relacionadas con el costo de reactivos impidieron que alcancen la difusión esperada.

Otras metodologías de detección, muy útiles con fines de investigación, son la microscopía electrónica de los bacteriofagos y los análisis de homología de ADN. A partir de estudios por microscopía electrónica, es posible clasificar los fagos en los diferentes grupos morfológicos (Bradley, 1967). Este método podría, además, indicar si el mismo fago es el causante de inconvenientes cuando se suceden varios incidentes en ambiente industrial. La técnica más simple para la observación incluye la tinción negativa (utilizando acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico) de la muestra de fagos que debe contener aproximadamente

10^7 UFP/mL (Bradley, 1962). Este dato marca una limitación importante de la técnica si se pensara aplicarla de manera rutinaria, ya que el límite de detección es elevado, y serían necesarias etapas previas de concentración de las muestras, lo que incrementaría los costos y tiempos de análisis.

Por otro lado, los estudios de homología de ADN comparan el genoma de dos bacteriofagos, permitiendo establecer la existencia o ausencia de relaciones genéticas (Jarvis, 1984). Este método, al igual que la microscopía electrónica, permite establecer si el mismo fago es el origen de problemas sucesivos en una planta láctea.

Enumeración de bacteriofagos

La metodología más antigua es conocida como método de las diluciones límites. En este ensayo, el FLC de la muestra sospechosa se diluye hasta que la última dilución contenga menos de 1 UFP/mL. Entonces, el FLC no diluido y sus diluciones se adicionan, junto con un inóculo de la cepa elegida como indicadora, a un medio de cultivo líquido. Un cultivo de la cepa, sin otra adición, es utilizado como control del desarrollo. Luego de una incubación adecuada que permita la multiplicación fágica, se preparan filtrados de cada cultivo, incluyendo el control, y se analiza la presencia de bacteriofagos por uno de los métodos de detección descritos anteriormente. El número de UFP/mL es menor que el recíproco de la menor dilución del FLC que desarrolló normalmente.

Otros métodos, más ampliamente usados, se basan en la lisis de las células indicadoras en medio agarizado. Pequeños volúmenes de células mezclados con el FLC (o diluciones) y agar blando, se depositan en la superficie de una placa conteniendo medio agarizado. Luego de la incubación, los fagos presentes formarán zonas claras (placas) de lisis celular sobre el tapiz turbio correspondiente al desarrollo celular. Contando las placas de lisis es posible enumerar la concentración de fagos en el FLC original. Este método, conocido como método de la doble capa agarizada (Svensson y Christiansson, 1991), brinda información cuantitativa pero solamente puede usarse para cultivos puros de células hospedadoras. Los starters multicepas no pueden analizarse ya que las cepas resistentes desarrollarán cubriendo las placas de lisis. Debe notarse, sin embargo, que esta metodología solamente es apta para fagos que forman placas de lisis visibles en las condiciones de trabajo. Para fagos de bacterias lácticas termófilas, su número, detectado por esta metodología suele ser sensiblemente menor que con el método de las diluciones límites. Esto se debe al conocido problema de que estos fagos normalmente no forman placas de lisis visibles en medio agarizado. Algunos estudios (Turner y Nelson, 1951; Terzaghi y

Sandine, 1975; Lillehaug, 1997) se han orientado hacia la formulación de medios de cultivo y búsqueda de condiciones adecuadas que permitan mejorar la nitidez y tamaño de las placas de lisis. Entre ellos, algunos (Lillehaug, 1997) indican que el agregado de glicina (100 mM) al medio aumenta el tamaño de las placas de lisis. Además, el número de placas de lisis obtenidas para un dado FLC puede variar considerablemente como resultado de cambios en la técnica, que incidirán en el tamaño de las mismas: concentración de agar en la capa de agar blando, espesor de esta capa, pH, concentración de Ca^{2+} , agregado de componentes especiales (Lillehaug, 1997) y actividad de la cepa indicadora (Terzaghi y Sandine, 1975). Por lo tanto, es imprescindible estandarizar la metodología para cada sistema a analizar.

Como ya se mencionó, el Spot Test puede usarse como análisis cualitativo, pero si se realizan diluciones del FLC y se depositan sobre la cepa indicadora, será posible estimar la concentración de fagos presentes. En este caso, también se utilizan cepas puras como indicadoras.

En la última década se han desarrollado métodos moleculares para la determinación de fagos en muestras industriales. Algunos de ellos (Moineau y col., 1992), que utilizaban sondas específicas para fagos de *Lactococcus*, detectaban diferentes especies de fagos pero no podían discernir si dichas partículas virales formaban parte de ciclos líticos activos, ya que solamente monitorean presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN fágico.

Posteriormente, el método de PCR (Polymerase Chain Reaction), ampliamente usado como herramienta de detección e identificación de virus y bacterias en diferentes ambientes (Labrie and Moineau, 2000), se adaptó a la amplificación de ADN fágico, específicamente virulentos de *Streptococcus thermophilus* y presentes en sueros de quesería (Brüssow y col., 1994b). A partir de una región conservada de la secuencia de ADN fágico (Brüssow y col., 1994a) se desarrolló un oligonucleótido que sirviera como iniciador en la reacción de amplificación. Este método brinda un límite de detección de 10^3 UFP/mL. Todas las muestras de suero provenientes de elaboraciones de queso Mozzarella que fueron sometidas a análisis dieron resultados positivos, observándose productos de amplificación con tamaños moleculares que estaban de acuerdo con lo esperado. Esto puso de manifiesto la especificidad de la técnica, la que fue luego aplicada a fagos de *Lactococcus* (Labrie y Moineau, 2000). En este ensayo fue posible detectar, en forma simultánea, y en una sola reacción, la presencia de los tres diferentes grupos genéticos de fagos de *Lactococcus lactis* hallados hasta el presente en ambientes lácteos y provenientes de muestras de suero. El límite de detección del método se ubicó entre 10^4 y 10^7 UFP/mL, y 10^3 y 10^5 UFP/mL con etapas adicionales de concentración. Aunque la sensibilidad puede mejorarse a través de precipitaciones con polietilenglicol, debe considerarse que de esta manera pueden observarse interferencias por

parte de la flora fágica normalmente presente en los sueros. Por lo tanto, deben evitarse las etapas diseñadas para incrementar la baja sensibilidad intrínseca de la PCR. Además, la filtración de las muestras de leche o suero es igualmente crítica, ya que los profagos (contenidos en las células del starter) podrían ser potencialmente detectados por la PCR.

Ambos métodos, tanto la PCR aplicada a fagos de *Streptococcus thermophilus* como de *Lactococcus*, mostraron resultados aceptables y no se observaron inhibiciones en los análisis debido a que las determinaciones se realizaron sobre muestras de suero. Cuando se emplean muestras de leche aparecen algunas interferencias ligadas con proteínas de la misma que pueden enmascarar los resultados (Brüssow y col., 1994b), con el Ca^{2+} que compete con el Mg^{2+} como cofactor esencial de la *Taq* polimerasa (enzima encargada de amplificar el ADN a partir de los oligonucleótidos iniciadores previamente diseñados) (Bickley y col., 1996) o con cierta inhibición ejercida por la plasmina sobre el desarrollo de la PCR.

Pero, a pesar de algunas ventajas, el método de PCR no puede tampoco asegurar si los fagos están viables y son capaces, por lo tanto, de atacar al cultivo starter, con lo cual puede ser empleado para confirmar la presencia de fagos en una muestra positiva, analizada previamente por métodos tradicionales (Spot Test, Test de Turbidez), y además indicar rápidamente a qué grupo genético pertenece. Esta información es de importancia crítica para los esquemas de rotación y para la selección apropiada de un mecanismo antifago adecuado (Moineau, 1999).

Otro inconveniente de la PCR como método de detección de fagos es que posiblemente los *primers* diseñados no detecten todos los fagos presentes en las muestras, ya que estos pueden verse modificados en sus secuencias de ADN, con lo cual se establece un límite importante para el método. Los oligonucleótidos diseñados (Brüssow y col., 1994a) para fagos de *Streptococcus thermophilus* solamente consideraron fagos pertenecientes a colecciones europeas y, hasta el momento todos pertenecen a un mismo grupo genético. Pero en el caso particular de nuestro país, donde la problemática de fagos es realmente importante (Suárez y col., 2002), recién en los últimos años se han realizado aislamientos y los primeros estudios moleculares de estos fagos han sido recientemente divulgados (Quiberoni y col., 2003). Por lo tanto, será necesario plantear alternativas que contemplen orígenes y ecologías diferentes para lograr una aplicación más amplia de estos métodos moleculares de detección. Algunas alternativas podrán incluir diseños de otros primers o reducciones de las temperaturas de hibridación en la PCR (temperatura que fija la especificidad de la PCR: a menor temperatura podría lograrse la unión del mismo primer aun cuando la secuencia no sea idéntica).

Por otro lado, para llevar a cabo la reacción PCR es necesario equipamiento

especial, precauciones experimentales particulares y personal entrenado. No está claro entonces si estos métodos, aunque rápidos y sensibles, podrán llegar a ser de aplicación rutinaria en la industria láctea.

Referencias bibliográficas

- Bickley, J.; Short, J.K.; McDowell, D.G. and Parkes, H.C. (1996).** Polymerase chain reaction of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 22, pp. 153-158.
- Bradley, D.E. (1962).** A study of the negative staining process. *Journal of General Microbiology*, vol. 29, pp. 563-567.
- Bradley, D.E. (1967).** Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, vol. 31, pp. 230-314.
- Brüssow, H.; Frémont, M.; Bruttin, A.; Sidoti, J.; Constable, A. & Fryder, V. (1994b).** Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, pp. 4537-4543.
- Brüssow, H.; Probst, A.; Frémont, M. and Sidoti, J. (1994a).** Distinct *Streptococcus thermophilus* bacteriophages share an extremely conserved DNA fragment. *Virology*, vol. 200, pp. 854-857.
- Bulletin FIL-IDF 129 (1980).** Starters in the manufacture of cheese, pp. 5-15.
- Carminati D. and Neviani, E. (1991).** Application of the conductance measurement technique for detection of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* phages. *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 1472-1476.
- Champiat, D.; Creuly, C. and Larpent, J.P. (1988).** Contrôle de l'activité phagique par dosage de l'ATP chez les streptocoques lactiques mesophiles. *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, vol. 6, pp. 285.
- Hose, H. and Sozzi, T. (1983).** Impedimetric detection of phage. Technical notes. 4. rapid microbiological methods in food industry. Abstr. Mtg., Leatherhead Food R. A. November 19, 1981. J.M. Wood and P.A. Gibbs, ed. Leatherhead, Surrey, England.
- Hull, R.R. (1977).** Methods for monitoring bacteriophages in cheese factories. Technical note. *The Australian Dairy Technology*, vol. 32, pp. 63-64.
- Jarvis, A.W. (1977).** The serological differentiation of lactic streptococcal bacteriophage. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, vol. 12, pp. 176-181.
- Labrie, S. and Moineau, S. (2000).** Multiple PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66 (3), pp. 987-994.
- Lembke, J. and Teuber, M. (1979).** Detection of bacteriophages in whey by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). *Milchwissenschaft*, vol. pp. 34, 457.
- Lillehaug, D. (1997).** An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 83, pp. 85-90.
- Moineau, S. (1999).** "Applications of phage resistance in lactic acid bacteria". In Konings, W.N., Kuipers, O.P. and Huis in't Veld, J.H.J. (Ed.). Proceedings of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Veldhoven, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers - Dordrecht / Boston / London, pp. 377-382.
- Moineau, S.; Fortier, J.; Ackerman, H.M. and Pandian, S. (1992).** Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 38, pp. 875-882.
- Pearce, L.E. (1969).** Session 5: Starters and phage. Activity tests for cheese starter cultures. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, vol. 4, pp. 246-247.

- Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. and Reinheimer, J. (2003).** Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 84, pp. 51-62.
- Stenson, L.R. and Klaenhammer, T.R. (1985).** *Streptococcus cremoris* M12R transconjugants carrying the conjugal plasmid pTR2030 are sensitive to attack by lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 50, pp. 851-858.
- Suárez, V.B.; Quiberoni, A.; Binetti, A.G. and Reinheimer, J.A. (2002).** Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *Journal of Food Protection*, vol. 65 (10), pp. 1597-1604.
- Svensson, U. & Christiansson, A. (1991).** Methods for phage monitoring. *Bulletin FIL-IDF*, vol. 263, pp. 29-39.
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, vol. 29, pp. 807-813.
- Turner, G.E. and Nelson, F.E. (1951).** Enumeration of lactic *Streptococcus* bacteriophage by a two-layer plate method for plaques. *Journal of Dairy Science*, vol. 34, pp. 754-762.
- Valles, E. (1955).** Sur l'emploi de différents indicateurs d'oxydoréduction pour l'étude des bacteriophages des streptocoques lactiques. *Lait*, vol. 35, pp. 241-258.

Capítulo 3

Métodos microbiológicos y moleculares para el estudio de la diversidad fágica en plantas industriales

Andrea Quiberoni

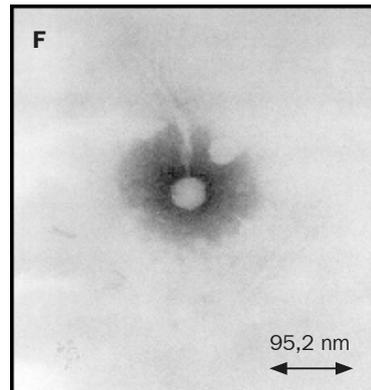
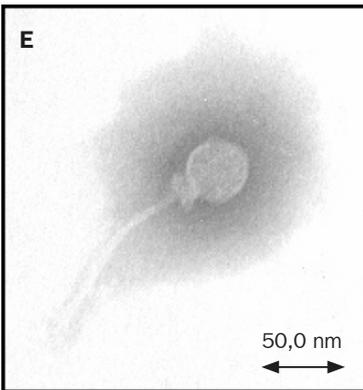
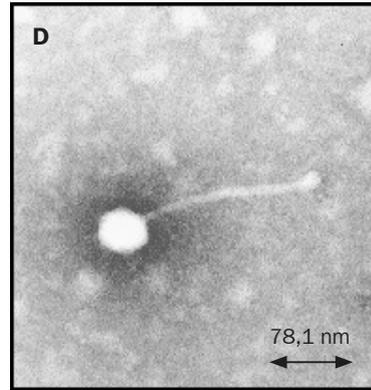
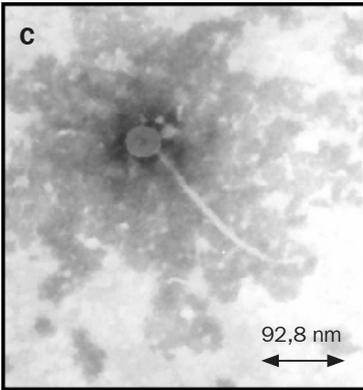
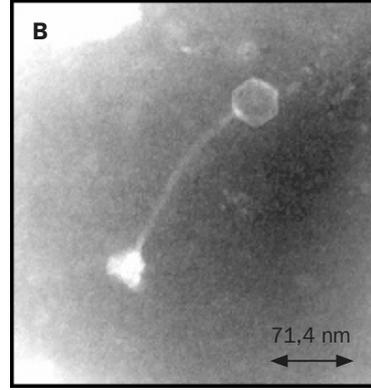
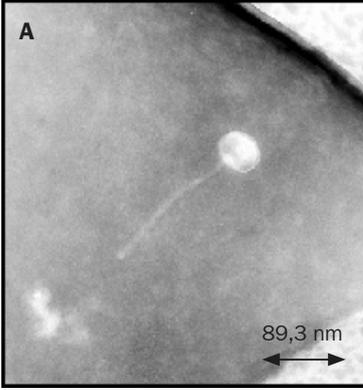
Los estudios ecológicos que exploran el origen de la diversidad fágica son muy escasos, cubriendo solamente algunos fagos de *Lactococcus* (Josephsen y col., 1994), *Lactobacillus* (Desiere y col., 1998) y *Streptococcus thermophilus* (Brüssow y col., 1994 y 1998). Estudios de este tipo involucran la aplicación de diferentes metodologías dirigidas a caracterizar fenotípica y genéticamente las poblaciones de bacteriofagos residentes en un ambiente definido, entre las cuales pueden citarse:

Microscopía electrónica

Las micrografías electrónicas obtenidas (Fig.1) permiten establecer las dimensiones y características morfológicas de las partículas fágicas (Josephsen y col., 1994). Con estas propiedades es posible clasificar los fagos según los diferentes grupos morfológicos (Bradley, 1967) o familias y morfotipos (Matthews, 1982).

Figura 1

Micrografías electrónicas de fagos argentinos: ϕ YEC (A), ϕ Ac1-4 (B), ϕ O21-5 (C), y ϕ FcSth3 (D) (*Streptococcus thermophilus*), ϕ BYM (E) y ϕ YAB (F) (*Lactobacillus delbrueckii*)



Rango de hospedadores

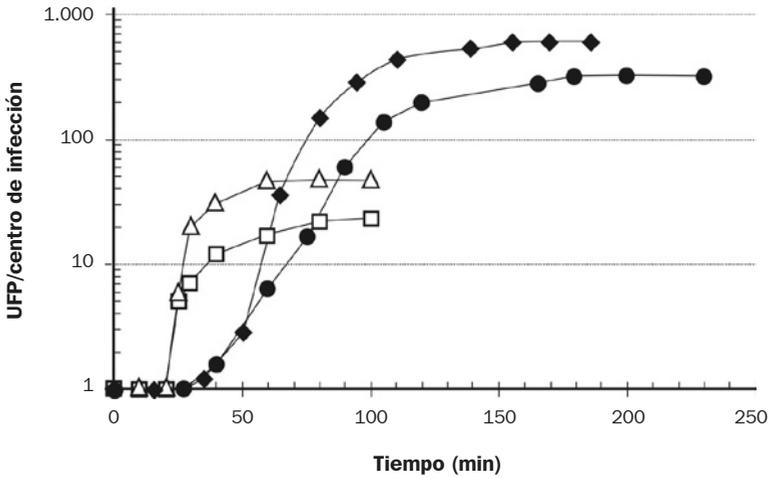
El rango de hospedadores de un fago se determina a través de los test detallados en la sección anterior (Test de Turbidez o Spot Test) (Svensson y Christiansson, 1991), utilizando un espectro de cepas lo más amplio posible.

Burst size

Se define como “burst size” el número de partículas fágicas liberadas a partir de una célula infectada por un fago. Este es un valor específico de cada sistema célula hospedadora-bacteriofago y, por lo tanto, útil para la caracterización. La metodología para su determinación depende específicamente del sistema a estudiar, y la obtención de un resultado preciso implica optimizar perfectamente las condiciones del ensayo. Brevemente, la metodología consiste en poner en contacto el cultivo de la cepa hospedadora, en fase exponencial de desarrollo, con una suspensión fágica, de tal modo de obtener una multiplicidad de infección (MOI: multiplicity of infection) adecuada al sistema. Esta mezcla, luego de ser incubada para permitir la adsorción fágica es centrifugada para recuperar la mezcla de células con las partículas fágicas adsorbidas, que luego es resuspendida en medio de cultivo fresco. A intervalos regulares de tiempo, alícuotas de la suspensión se ensayan para determinar el número de partículas fágicas presentes (Josephsen y col., 1994) y construir la curva de multiplicación fágica (Fig. 2).

Figura 2

Curvas de multiplicación de fagos argentinos: ϕ 021-4 (\blacklozenge), ϕ 0BJ (\bullet), ϕ BYM (\square) y ϕ YAB (\triangle), obtenidas sobre cepas sensibles de *Streptococcus thermophilus* (fagos 021-4 y 0BJ), y *Lactobacillus delbrueckii* (fagos BYM y YAB)

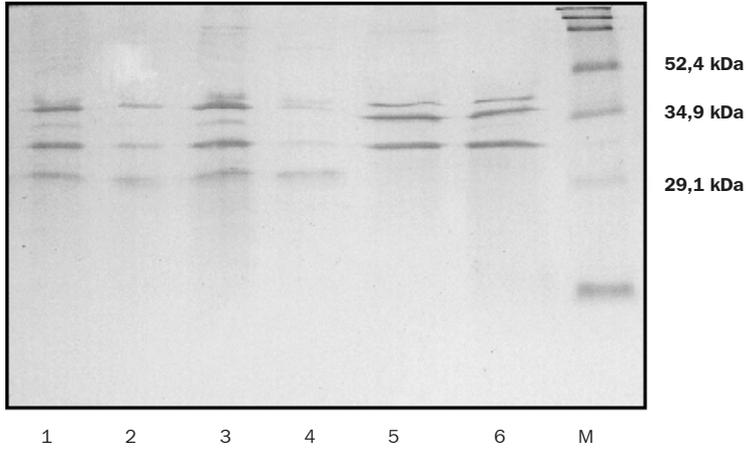


Perfil de proteínas estructurales

Como se sabe, las partículas fágicas están compuestas por ácidos nucleicos (ADN o ARN) y proteínas. Estas últimas constituyen las estructuras externas de los bacteriofagos: cabeza o cápside (conjunto de capsómeros o unidades proteicas), tubo central de la cola y vaina, fibras de la cola y placa basal. El aislamiento y análisis de las proteínas estructurales fágicas es una importante herramienta de caracterización que permite agrupar poblaciones fágicas y estudiar su diversidad. Brevemente, las partículas fágicas concentradas (precipitación con polietilenglicol) y purificadas (en gradiente de CsCl) se analizan en un gel de poliacrilamida con buffer desnaturante (SDS-PAGE) (Fig. 3). Las proteínas se revelan con azul de Coomassie (Sambrook y col., 1989). El tamaño de cada unidad proteica se determina por comparación con patrones de peso molecular conocido. Esta información, junto con el número de proteínas estructurales, constituye un dato más para caracterizar y comparar poblaciones fágicas.

Figura 3

SDS-PAGE de proteínas estructurales de fagos argentinos de *Streptococcus thermophilus*



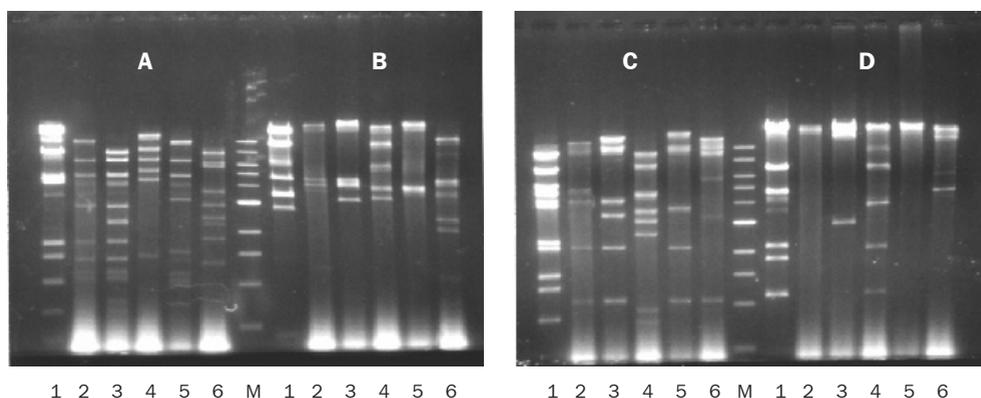
Línea 1: ϕ 021-4; **línea 2:** ϕ 021-5; **línea 3:** ϕ CHP; **línea 4:** ϕ CHQ210; **línea 5:** ϕ FcSth10; **línea 6:** ϕ 799-M1; **línea M:** marcador de peso molecular

Perfiles de restricción con endonucleasas

El análisis consiste en someter el ADN fágico a restricción con endonucleasas, lo que generará un conjunto de fragmentos que luego serán separados a través de una electroforesis en gel de agarosa (Fig. 4). Los tamaños de los fragmentos se calculan a partir de su movilidad relativa, comparando con patrones de peso molecular conocido (fragmentos de genomas fágicos perfectamente identificados) (Sambrook y col., 1989). Esta metodología permite, además, estimar el tamaño promedio del genoma fágico, a través de la suma de los pesos moleculares de cada fragmento de restricción.

Figura 4

Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN fágico, generados con las enzimas *EcoRV* (A), *EcoRI* (B), *PvuII* (C) and *PstI* (D), de fagos argentinos de *Streptococcus thermophilus*



Línea 1: ϕ 10; **línea 2:** ϕ 8; **línea 3:** ϕ 5; **línea 4:** ϕ 3;
línea 5: ϕ 2; **línea 6:** ϕ 1; **línea M:** 1 kb DNA Ladder

Hibridaciones ADN-ADN

Las metodologías que incluyen hibridaciones ADN-ADN permiten detectar homología entre los genomas fágicos que se comparan. Estos análisis pueden hacerse por enfrentamiento directo de los genomas completos de los bacteriofagos (Dot Blot) o utilizando como blanco el conjunto de fragmentos genómicos obtenido por restricción con endonucleasas, previa separación electroforética (Southern Blot).

Dot Blot

Consiste en inmovilizar una alícuota de ADN genómico en el soporte y, previo secado se hibrida con la sonda marcada. El revelado puede ser también radioactivo o quimioluminiscente. Aunque la exactitud de la cuantificación no es factible por el tamaño y cantidad variable de las alícuotas de ADN soportado, en muchos casos es posible realizar una comparación de la intensidad relativa de cada señal de hibridación.

Southern Blot

La localización de una secuencia particular dentro del ADN genómico se

logra frecuentemente por la técnica de transferencia descrita por Southern (1975). El ADN genómico es digerido con una o más enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se separan, de acuerdo con su tamaño, por electroforesis en gel de agarosa. El ADN es luego desnaturalizado *in situ* y transferido del gel a un soporte sólido (usualmente filtros de nitrocelulosa o membranas de nylon). Las posiciones relativas de los fragmentos de ADN se preservan durante la transferencia al soporte. El ADN soportado es sometido a hibridación con una sonda de ADN marcado (radioactiva o quimioluminiscente), y luego la posición de las bandas complementarias con la sonda es localizada a través del revelado de una placa radiográfica. La cantidad de ADN genómico necesaria para generar una señal de hibridación detectable depende de algunos factores, incluyendo la proporción de genoma que es complementaria a la sonda, el tamaño de ésta y su actividad específica, y la cantidad de ADN genómico transferido al soporte.

Serología

Las partículas fágicas, purificadas y concentradas, pueden ser utilizadas para inmunizar conejos, que producirán suero específicamente inmune al bacteriofago inyectado (antisuero). Diluciones decimales de este suero se enfrentan con diferentes bacteriofagos y se determina la tasa de neutralización de un antisuero contra un fago determinado (Brüssow y col., 1994).

Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR es utilizada para amplificar dos segmentos de ADN que al unirse cubren una región de secuencia desconocida. Dos oligonucleótidos se usan como iniciadores de una serie de reacciones catalizadas por la ADN polimerasa (*Taq* DNA polymerase; Sambrook y col., 1989). Estos oligonucleótidos tienen secuencias diferentes y son complementarios con las secuencias de la cadena opuesta del ADN molde y flanquean el segmento de ADN a ser amplificado. El ADN molde es desnaturalizado por calentamiento en presencia de un exceso molar de cada uno de los oligonucleótidos y de los cuatro dNTPs. La mezcla de reacción es luego enfriada a una temperatura adecuada para la unión de los iniciadores a sus secuencias complementarias, tras lo cual se produce la polimerización y extensión del ADN. Los ciclos de desnaturalización, unión y síntesis de ADN se repiten, y en cada uno se duplica la cantidad del ADN de interés (Sambrook y col., 1989).

En el caso específico de la PCR aplicada a la caracterización de bacteriofagos

y al estudio de su diversidad los oligonucleótidos elegidos se diseñan sobre la base de secuencias de genomas fágicos conocidos, con objeto de amplificar zonas conservadas de dichas secuencias y establecer luego la similitud entre los fagos conocidos y aquellos sometidos a estudio (Brüssow y col., 1994). La PCR puede también aplicarse para amplificar zonas arbitrarias del genoma fágico (Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting, RAPD-PCR) utilizando en estos casos oligonucleótidos diseñados al azar, lo que generará una familia de fragmentos de amplificación que serán separados y comparados en geles de agarosa.

Secuenciación de ADN

La determinación de la secuencia exacta de los productos PCR permitirá la comparación y análisis de estos fragmentos con objeto de establecer homología o diversidad. Las secuencias nucleotídicas obtenidas y las aminoacídicas que pueden predecirse se comparan con aquellas de fagos conocidos, depositadas en bases de datos (GenBank, Release 102, EMBL, PIR-protein, SWISS-PROT, etc.), usando programas computacionales especialmente diseñados (FastA o BLAST). Estos análisis incluyen alineamiento de secuencias empleando métodos específicos (CLUSTALW 1.6). Estas metodologías permiten detectar diferencias en las secuencias, así como intercambio de módulos de ADN, inserciones o deleciones, eventos que se sabe son responsables de cambios genéticos generadores de diversidad y evolución (Desiere y col., 1998).

Todas estas metodologías han sido aplicadas para investigar la ecología y el origen de la diversidad fágica en ambientes industriales, conformando los escasos informes de este tipo que se conocen en la actualidad.

Diversidad y origen de fagos de *Lactococcus*

Los fagos de *Lactococcus* son los principales responsables de las fermentaciones defectuosas que ocurren en producciones queseras, especialmente de Cheddar y Feta. Estudios taxonómicos llevados a cabo en varios laboratorios han demostrado que estos bacteriofagos pueden dividirse en distintos grupos, representados por especies y fagos tipo (Jarvis y col., 1977). Esta clasificación se basó en diferencias morfológicas, homología de ADN y proteínas estructurales. Cada grupo principal contenía fagos con diferente rango de hospedadores y diferencias morfológicas mínimas.

Las posibles fuentes de fagos líticos de lactococos han sido investigadas

por diversos autores, siendo sugeridas como posibles reservorios las cepas lisogénicas de los starters y de la leche cruda (Heap y Lawrence, 1977, Huggins y Sandine, 1977). Esta conclusión es soportada por numerosos estudios taxonómicos, que reportan fuerte homología de ADN entre fagos líticos y un grupo de fagos temperados (Prevots y col., 1990). La homología de ADN fue también observada entre fagos líticos y temperados de *Lactobacillus* (Josephsen y col., 1994). Jarvis y Meyer (1986) sugirieron que los nuevos fagos líticos son el resultado evolutivo de recombinaciones y mutaciones puntuales de los ya existentes. Por lo tanto, aunque la leche cruda o las cepas del starter son posibles reservorios de fagos, el ambiente de las plantas queseras es probablemente la principal fuente (Josephsen y col., 1994).

La presencia de fagos líticos para *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se estudió durante 5 años en una planta quesera de queso Cheddar danés, donde se usaba exclusivamente un starter mixto (TK5). Los fagos aislados fueron caracterizados por su morfología, espectro de hospedadores, burst size, perfiles de restricción y homología de ADN. Todos los fagos presentaban cabezas isométricas pequeñas, pero diferían en los rangos de hospedadores, burst size y perfiles de restricción. Sobre la base de la homología de ADN, la mayoría de los fagos podía dividirse en dos grupos con un bajo nivel de homología entre ambos, pero con alto grado de similitud al interno de cada grupo. El primer grupo comprendía, principalmente, fagos que se aislaron en el primer período de estudio, mientras que el segundo incluyó fagos aislados al final del monitoreo. Los resultados indicaron que nuevos fagos aparecieron con el tiempo y que éstos podrían surgir en una planta quesera a partir de cepas lisogénicas o de los fagos líticos ya existentes (Josephsen y col., 1994).

Diversidad y origen de fagos de *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus es una bacteria láctica termófila usada como starter en elaboraciones de quesos y yogur. Todos los fagos de *Streptococcus thermophilus* aislados hasta el momento han evidenciado homología de ADN. Durante los últimos 30 años, 81 fagos fueron aislados a partir de muestras provenientes de fermentaciones defectuosas ocurridas cuando cepas de *Streptococcus thermophilus* se usaban en elaboraciones de quesos y yogur, en diferentes países europeos (Bruttin y col., 1997). Los fagos aislados de yogur (aproximadamente 40) fueron clasificados en dos subgrupos, considerando serología, rango de hospedadores e hibridaciones con secuencias de ADN específicas de cada subgrupo, demostrando una limitada variabilidad genética. En contraste, los fagos derivados de queserías (aproximadamente 41) no pudieron clasificarse en subgrupos, y se detectaron 35 perfiles de restricción y 34 rangos de hos-

pedadores diferentes. Esta aparente variabilidad de los fagos de *Streptococcus thermophilus* es un inconveniente importante para la aplicación práctica de medidas de control.

En general, los fagos de *Streptococcus thermophilus* aislados de plantas queseras muestran mayor diversidad que aquellos derivados de elaboraciones de yogur. Una explicación para esto radica en las diferencias de starters y condiciones de fermentación. Debido a que la propagación fágica es dependiente de la presencia de hospedadores adecuados y en las elaboraciones de yogur se emplea un pequeño número de starters bien definidos, sólo puede esperarse una gran variedad de fagos en las elaboraciones queseras, donde se usan principalmente fermentos complejos o mayor diversidad de éstos. Además, debido a las diferentes condiciones de tratamientos térmicos y diseños de planta y procesos (tinas de fermentación cerradas versus abiertas), las plantas elaboradoras de yogur son menos susceptibles que las queserías a la invasión por fagos provenientes de fuentes ambientales. El proceso más crítico en las elaboraciones queseras es la separación del suero, que inevitablemente origina aerosoles (que pueden contener partículas fágicas) en la planta.

Con el objetivo de determinar si la diversidad en la población fágica surgió del ambiente o de cambios genéticos en los bacteriofagos residentes, Bruttin y col. (1997) hicieron un control “longitudinal” en una planta quesera. Se eligió una planta elaboradora de Mozzarella que empleaba un fermento natural complejo, en tanques abiertos de fermentación continua. Tal planta sería muy susceptible a la invasión por bacteriofagos del ambiente. Si un fago invadió la planta y experimentó cambios genéticos, se podría predecir una familia de bacteriofagos estrechamente relacionados, con similares perfiles de restricción y uno o varios hospedadores coincidentes. Además, se esperaría una acumulación de mutaciones puntuales, deleciones y recombinaciones como consecuencia de una rápida evolución fágica, y cambios en los perfiles de restricción durante el monitoreo. Alternativamente, si la diversidad surgió antes de la entrada a la planta, se podrían predecir variados espectros de hospedadores y perfiles de restricción. Los bacteriofagos serían genéticamente diferentes.

Los resultados de los estudios mostraron pequeñas evidencias a favor de modificaciones genéticas de los fagos residentes durante el período de control.

El estudio longitudinal, que cubrió un período de dos años, permitió observar 12 grupos líticos que mostraban 11 perfiles de restricción diferentes. De acuerdo con los estudios de hibridaciones Southern y Dot Blot, todos los fagos estaban estrechamente relacionados. Pero esta observación no prueba un único evento de invasión fágica en la planta, ya que todos los fagos de *Streptococcus thermophilus* aislados hasta ahora y originarios de diferentes países han mostrado una alta homología.

Los aislamientos de fagos pertenecientes al mismo grupo lítico mostraron

idénticos perfiles de restricción, excepto en dos grupos donde la presencia de sistemas de restricción/modificación parecía estar involucrada con las variaciones de los perfiles. Por su parte, muchos fagos virulentos para el mismo hospedador tenían perfiles de restricción idénticos o altamente relacionados. Un fragmento de ADN fágico de 0,5 kb, correspondiente a un gen codificante de una proteína, fue amplificado y secuenciado en 10 grupos líticos diferentes. Aislamientos independientes de fagos del mismo grupo lítico no mostraron durante el monitoreo cambios en los nucleótidos de las secuencias.

Aun cuando las diferencias genéticas fueron relativamente pequeñas, las observaciones podrían ser significativas en términos de evolución genética. La base molecular para las diferencias entre fagos con perfiles de restricción estrechamente relacionados es desconocida. Se encontraron diferencias similares entre fagos estrechamente relacionados y aislados de leche cruda. Variantes de este tipo ya habían sido observadas para el fago tipo de *Streptococcus thermophilus* Sfi21, durante propagaciones sucesivas en el laboratorio. En este caso, las diferencias en los perfiles de restricción reflejaban deleciones en sitios específicos en tres regiones del genoma (Bruttin y col., 1997).

Análisis de secuencias, en una región conservada del genoma, de múltiples fagos del mismo tipo revelaron la ausencia de mutaciones puntuales. En contraste, se observó más del 12 % de diversidad en la secuencia nucleotídica entre fagos de diferentes grupos.

Estas observaciones no soportan un modelo de invasión única y subsiguiente diversificación de los fagos durante su residencia en la planta. Por otro lado, una evolución tan rápida de los fagos en la planta quesera requiere una elevada velocidad de mutación de los fagos de *Streptococcus thermophilus* y, además, se requiere una fuerte selección impuesta por el starter para que los nuevos fagos sean detectables. No fue posible determinar cómo un starter complejo podría proveer esta selección. También, es difícil establecer una prueba directa del vínculo entre los fagos de la planta y aquellos del ambiente, ya que la concentración de fagos en la leche cruda es muy baja. Además, las plantas queseras tienden a estar infectadas con moderados o altos niveles de fagos (10^4 - 10^7 UFP/mL) y, por lo tanto, serían refractarias a la invasión por otros provenientes de la leche cruda. Finalmente, sólo es posible detectar los fagos para los cuales existen células susceptibles en el starter. Entonces, se comenzó con el estudio de “intervención”: el starter definido se reemplazó por uno complejo compuesto de células incapaces de propagar la población fágica ya existente en la planta.

Se plantearon tres hipótesis: i) bajo la presión selectiva de los nuevos hospedadores los fagos residentes podrían adaptarse, evidenciando una remarkable flexibilidad genética; ii) los fagos podrían ser reemplazados por otros; entonces, un estudio ecológico podría identificar la fuente de estos nuevos

virus (leche cruda, starters, operadores, aire, etc.); iii) finalmente, si el nivel fágico en el ambiente es bajo, la planta trabajaría por un tiempo prolongado sin infecciones fágicas evidentes.

Como se esperaba, esta intervención provocó un marcado descenso en los niveles de bacteriofagos y una rápida colonización por nuevos bacteriofagos que se rastrearon hasta la leche cruda. Ahora, el parámetro crítico fue las características genéticas de los nuevos fagos colonizadores de la planta. Los únicos cuatro fagos nuevos aislados exhibieron perfiles de restricción diferentes. Análisis posteriores permitieron establecer que estos no eran derivados de la población fágica antigua pero, fueron, en cambio, idénticos a aquellos aislados, en muy bajas concentraciones (10-130 UFP/mL) a partir de la leche cruda recibida en la planta.

En esta segunda etapa del estudio, la intervención con el starter definido ejerció una fuerte presión selectiva sobre la población fágica de la planta: el nuevo fermento podría no propagar los fagos residentes. Por lo tanto, los fagos aislados sobre los nuevos hospedadores deberían ser mutantes de los fagos residentes o nuevos fagos. Es interesante notar que la población fágica cambió rápidamente durante el estudio. En los 5-7 días de comenzada la intervención, se aislaron tres nuevos fagos capaces de infectar 3 de las 10 nuevas cepas del fermento. Datos similares ya habían sido informados para estudios ecológicos en plantas queseras que empleaban lactococos. Los perfiles de restricción de los nuevos fagos indicaron que no eran derivados de los previamente residentes. Para los tres fagos nuevos se identificó la leche cruda como fuente posible, ya que fagos con perfiles y rango de hospedadores idénticos se aislaron a partir de la leche cruda recibida en la planta durante el estudio de intervención. Los fagos presentes en la leche cruda fueron también el origen de problemas en plantas queseras que utilizaban lactococos. Pero la información para el caso de estos fagos de lactococos difiere en aspectos importantes. En estos estudios no hay pruebas de identidad molecular entre los fagos de la leche cruda y los de la planta. Además, en dos casos, los fagos de la leche cruda representaban profagos inducidos de cepas lisogénicas (Bruttin y col., 1997). Las cepas lisogénicas son relativamente raras en *Streptococcus thermophilus*.

Teóricamente, el estudio de intervención provocaría una fuerte presión hasta que los fagos residentes fuesen capaces de mutar a un nuevo rango de hospedadores. Sin embargo, la población de fagos residentes no fue eliminada hasta 10 días después del uso de fermentos no susceptibles. La reintroducción de cepas susceptibles permitió una rápida reaparición de los fagos residentes, indicando que pueden mantenerse en la planta por al menos 3 semanas en ausencia de sus cepas hospedadoras en el starter.

En conclusión, los datos de estos estudios identificaron la leche cruda como la fuente de fagos que contaminan la planta. No fue posible encontrar

evidencias de cambios genéticos en los fagos de la planta. La ausencia de recombinación parece sorprendente en vista de las experiencias de laboratorio que reportan frecuentes recombinaciones entre fagos después de infecciones sucesivas del starter. Esto puede deberse a la ausencia de hospedadores coincidentes, resultando en una clase de aislamiento reproductivo que podría ser muy importante en el diseño del starter. Aparentemente, toda la diversidad genética observada en los fagos de *Streptococcus thermophilus* durante el estudio ya estaba presente en el ambiente de la planta y refleja la ecología natural y no la evolución durante la residencia en aquélla. Por lo tanto, un conocimiento detallado de la diversidad genética de los fagos de *Streptococcus thermophilus* y sus hospedadores dentro del ambiente natural es esencial para el éxito de cualquier medida de control que desee implementarse en las plantas queseras.

Todos los fagos de *Streptococcus thermophilus* investigados hasta el momento pertenecen al grupo B de Bradley (*Siphoviridae*) y contienen un genoma de doble cadena de ADN que ronda los 31-45 kb en tamaño. En ellos, extremos cohesivos (*cos*-site) fueron frecuentemente observados. Los fagos poseen la misma morfología básica, consistente en cabezas isométricas (65 nm de diámetro) y largas colas no contráctiles (230 a 260 nm de longitud), observándose que algunos de ellos tienden a agruparse en clusters. En algunos fagos se observan delgadas fibras ancladas en la placa basal (Brüssow y col., 1998).

Prevots y col., (1989) clasificaron 23 fagos franceses en dos subgrupos: I y II, basándose en el rango de huéspedes. La mayoría de los fagos del grupo lítico I mostraron similares o idénticos perfiles de restricción, mientras que para todos los fagos del grupo lítico II, los perfiles fueron diferentes. La homología de ADN, analizada a través de Southern Blot, reveló elevada correlación aun entre fagos pertenecientes a grupos distintos, excepto para 3 fagos del grupo lítico II que mostraron elevada homología entre ellos, pero muy baja con los demás integrantes de los grupos I y II. Estos 3 fagos diferían, además, en el perfil de proteínas estructurales (23 y 40 kDa para las proteínas principales) de los demás fagos (23 y 29 kDa). Los tamaños estimados de los genomas fueron 37-43 kb.

Neve y col. (1989) dividieron 12 fagos de origen suizo y alemán en tres grupos. El subgrupo I comprendía 2 fagos suizos (41 y 44 kb y tres proteínas estructurales mayores: 40, 24 y 15 kDa), mientras que los fagos de los subgrupos II y III mostraron genomas de 34-38 kb y solamente dos proteínas estructurales (31 y 24 kDa). En este estudio fue posible encontrar 11 perfiles de restricción diferentes, pero se observó una fuerte homología de ADN entre todos los fagos, a excepción de uno (grupo II), que, sin embargo, evidenció una débil hibridación con los demás.

Benbadis y col. (1990) clasificaron 6 fagos franceses y 1 norteamericano en dos subgrupos, A y B. Los fagos del grupo lítico B mostraron similares perfiles

de restricción, mientras que para el grupo A se obtuvo un perfil único para cada fago integrante. Los tamaños de los genomas variaron entre 31 y 45 kb y fue posible identificar extremos cohesivos para los fagos del grupo A. Los experimentos de hibridación confirmaron la separación en dos grupos, aun cuando se observó hibridación cruzada entre los subgrupos. No fue posible establecer ninguna correlación entre los subgrupos y el rango de huéspedes, pero sí para los perfiles de proteínas estructurales (A: 32 y 27 kDa; B: 43, 25 y 15 kDa o 43 y 23.5 kDa). Estos autores usaron, además, fagos de Neve y col. (1989) para la comparación y observaron que, sobre la base de experimentos de Southern Blot, los subgrupos A y B correspondían a los grupos II y I de Neve, respectivamente.

Larbi y col., (1990) caracterizaron nueve fagos aislados de tres países europeos (Francia, Portugal e Irlanda), uno africano (Egipto) y uno americano (Argentina). Todos fueron casi idénticos, como lo demostró el mismo rango de huéspedes, hibridaciones cruzadas y similares perfiles de restricción y se aislaron a partir de fermentaciones que usaban el mismo starter, lo que explica la uniformidad de resultados. Los genomas fueron de 35,6 o 36,2 kb y, por lo tanto diferían solamente en un inserto de ADN de 0,6 kb.

Fayard (1993) caracterizó 56 fagos virulentos (38 de Francia, 2 de Austria, 14 de Italia y 2 de Finlandia), la mayoría de los cuales mostró un único patrón de restricción cuando se propagaron sobre su huésped original. Los genomas, medidos por microscopía electrónica, se estimaron en 36-42 kb y un 60 % de los fagos poseía extremos cohesivos. En las hibridaciones Southern Blot se observaron fuertes reacciones cruzadas cuando se analizaron todos los fagos. Con respecto a los perfiles de proteínas, se observaron dos tipos de perfiles idénticos a los reportados por Benbadis y col. (1990).

Brüssow y col. (1994) caracterizaron 81 fagos líticos (40 de elaboraciones de yogur y 41 de fermentaciones queseras), cubriendo 30 años de monitoreo en Francia e Italia. Entre estos fagos se identificaron 46 perfiles de restricción diferentes (11 para fagos de yogur y 35 para el caso de quesos). Una media de 35 kb fue calculada como peso molecular de los genomas fágicos. En los análisis de Southern y Dot Blot fue posible observar elevada cantidad de hibridaciones cruzadas entre los fagos. Los análisis de rango de huéspedes permitieron separar los fagos de yogur en dos subgrupos líticos, I y II. El establecimiento de estos dos grupos líticos fue biológicamente significativo, ya que fue corroborado por metodologías diferentes (serología, análisis de proteínas e hibridación de ADN). Los antisueros contra el grupo lítico I no neutralizaron los fagos del grupo II, y viceversa, definiendo serotipos I y II. Finalmente, los fagos de los grupos I y II poseían proteínas estructurales de 28 y 33 kDa, o 26 y 44 kDa, respectivamente.

Entre los 41 fagos aislados de quesos se observaron 34 diferentes rangos de

huéspedes. Por exclusión, se clasificaron como grupo lítico IV (el grupo III contenía el fago temperado Sfi21). Estos fagos derivados de quesos fueron luego subdivididos en dos subgrupos, de acuerdo con el desarrollo sobre la cepa hospedadora Sfi1. Muchos fueron neutralizados por el antisuero de ambos grupos (I y II), mientras que el antisuero contra un fago de queso neutralizó todos los demás. Las hibridaciones ADN-ADN confirmaron los resultados de serología, ya que no fue posible identificar ningún fragmento de ADN específico de los fagos de quesos.

Un hallazgo coincidente entre varios informes fue la división de fagos de yogur en dos grandes grupos. La variabilidad de fagos derivados de elaboraciones de yogur parece ser bastante limitada, ya que diferentes autores describieron fagos similares. Debe notarse, sin embargo, que hay una fuerte correlación geográfica en estas colecciones que cubren Francia, Italia, Alemania y Suiza. Esta limitada diversidad de fagos de yogur refleja, además, el reducido número de cepas usadas en las elaboraciones. Esto contrasta con la gran diversidad observada entre fagos aislados de elaboraciones queseras, donde habitualmente se emplean starters complejos.

Los fagos aislados por Brüssow y col. (1994) cubren aproximadamente 30 años de monitoreo en los ambientes industriales. La baja frecuencia de reaslamiento de un mismo fago en largos períodos de tiempo podría indicar que una población de fagos distintos coexiste en la planta. Otra posibilidad es que un mismo fago, definido por un similar perfil de restricción, experimente reordenamientos de su genoma (deleciones, duplicaciones o adquisiciones de nuevos módulos de ADN) en períodos cortos de tiempo. Frecuentemente fue posible identificar más de un fago en una muestra, por lo que la infección de un huésped por parte de dos fagos podría generar recombinantes. La superinfección de starters lisogénicos con fagos líticos podría, además, ser una fuente potencial de recombinantes.

Ecología y evolución de fagos *Siphoviridae*

Las correlaciones evolutivas entre fagos de distintas especies de bacterias lácticas no han sido aún estudiadas en detalle. Hasta ahora los análisis comparativos se han concentrado principalmente en diferentes fagos de *Streptococcus thermophilus* (Brüssow y col., 1994 y 1998). Un análisis de sus genes estructurales demostró una jerarquía de correlaciones de secuencias con las secuencias de otros fagos de la familia *Siphoviridae* (Brüssow y Desiere, 2001). Específicamente, fagos de *Streptococcus thermophilus* (extremos cohesivos y re-*dundantes*, *cos-* y *pac-site*) tienen secuencias estrechamente relacionadas con fagos temperados de *Lactococcus lactis*, seguido por bacteriofagos líticos

de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Bacillus* (Desiere y col., 1998). Los genes estructurales del fago Sfi21 de *Streptococcus thermophilus* mostraron una organización genética muy semejante a la de los fagos virulentos de bacterias Gram-negativas (fago lambda, por ej.), aunque la similitud de secuencias no fue elevada. Tales correlaciones son el resultado de cualquier sistema evolutivo. Estas observaciones podrían indicar que módulos de morfogénesis de líneas específicas de fagos *Siphoviridae* han tenido una historia evolutiva que puede rastrearse por análisis comparativo de secuencias. Notablemente, el grado de correlación entre fagos de las mismas líneas *Siphoviridae* parece relacionarse aproximadamente con la distancia evolutiva que separa a sus especies bacterianas hospedadoras.

La teoría modular de la evolución fágica ha sido desarrollada sobre la base de experimentos de hibridación ADN-ADN con fagos de *Escherichia coli* (lambda, por ej.), prescindiendo aún de secuenciaciones de ADN (Botstein, 1980). Luego, se propuso una conclusión inicial de la teoría de evolución fágica basada en las secuencias, pero cualquier marco teórico basado en el genoma fágico es muy limitado debido al pequeño número de secuencias de ADN fágico contenidas en las bases de datos. Actualmente hay sólo 50 genomas fágicos completamente conocidos; por lo tanto, son necesarias más secuencias genómicas y sus comparaciones para elaborar una teoría basada en ellas. Una fuente suplementaria de secuencias fágicas pueden ser los genomas bacterianos. Por ejemplo, durante el estudio del genoma bacteriano de *Lactobacillus johnsoni* fue posible identificar tres secuencias de profagos. Una comparación con secuencias fágicas publicadas evidenció dos líneas evolutivas principales para el último cluster de genes dentro de los fagos *Siphoviridae* de *Lactobacillus*. Representantes de estas dos líneas también se detectaron en otros géneros de bacterias Gram-positivas (bajo contenido en GC). Ambas líneas mostraron baja correlación con los fagos *Siphoviridae* de bacterias Gram-negativas. Estas observaciones restringen posteriores hipótesis sobre la evolución de la familia *Siphoviridae*.

El principio básico de la teoría modular de la evolución fágica (Botstein, 1980) ha resistido el paso del tiempo. Sin embargo, en la era de la secuenciación de ADN a gran escala, la teoría necesita una extensión que permita adaptarla a la nueva información genómica. El principal problema para cualquier teoría de evolución fágica, basada en la secuenciación, es la frecuente transferencia lateral de genes entre fagos. El análisis comparativo de genomas bacterianos completos reveló, además, impactos sustanciales de este tipo de transferencia y planteó dudas respecto de la construcción de árboles filogenéticos basados en secuencias de 16S rARN (Desiere y col., 2000). Sólo recientemente el análisis de árboles filogenéticos se ha aplicado al estudio de las proteínas fágicas, a pesar de su popularidad en otras ramas de la virología. Los árboles filogenéticos aplicados a las proteínas fágicas proveen información biológica consistente.

Para el caso de la proteína fágica ClpP y de la integrasa, las proteínas de los fagos de estreptococos y lactococos son las más estrechamente relacionadas en términos evolutivos, seguidas por las de lactobacilos. En ambos casos, la similitud se extiende a genes adyacentes: en el caso de la proteínas ClpP, define fagos con un mecanismo común de síntesis de los componentes de la cápside, mientras que en el caso de la integrasa, el árbol definió una rama de la familia *Siphoviridae* que comparte la misma organización de los módulos de lisogenia (Lucchini y col., 1999b).

El análisis de los árboles filogenéticos de proteínas fágicas, debe, sin embargo, ser interpretado cuidadosamente. Por ejemplo, en proteínas multidominio, los dominios individuales frecuentemente pertenecen a linajes evolutivos diferentes, como se demostró para el anti represor de fagos lácticos (Lucchini y col., 1999a). Las dificultades pueden surgir, además, de una adquisición no criteriosa de secuencias de las bases de datos. Por ejemplo, un análisis filogenético reciente de dUTPasas virales dedujo una transferencia horizontal de genes entre el fago r1t y su huésped *Lactococcus*. Sin embargo, el gen la dUTPasa del citado huésped es claramente parte de la secuencia del profago. En efecto, las tres dUTPasas identificadas en genomas de *Lactococcus lactis* se encuentran dentro de las cinco secuencias de profagos presentes en estas cepas de bacterias lácticas (Bolotin y col., 1999).

Se sugiere que la historia evolutiva de las proteínas fágicas y de los módulos completos puede ser rastreada por análisis comparativo de secuencias. El cluster de los genes de la cabeza fágica es el módulo fágico más conservado y por lo tanto un buen candidato para el análisis evolutivo. En consecuencia, se investigó el módulo de morfogénesis para fagos de *Lactobacillus* con una aproximación comparativa. Se identificaron dos ramas principales de genes estructurales asociados con sus modos de empaquetamiento del ADN (*pac*- y *cos*-site). Cada rama principal de genes estructurales demostró estrecha relación con fagos de la familia *Siphoviridae*, virulentos de grupos de bacterias Gram-positivas, de bajo contenido en GC, relacionadas evolutivamente. Además, se detectaron similitudes con fagos *Siphoviridae* de bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli*. Esto se aplicó a fagos de *Lactobacillus* con ambos mecanismos de empaquetamiento: *pac*-site (proteínas principales de la cápside) y *cos*-site (terminasa y ClpP proteasa). El fago D3 de *Pseudomonas* es, en este contexto, un puente entre *Siphoviridae* de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Algunas proteínas del D3 se vinculan solamente con colifagos (proteínas principales de la cápside, por ej.), o con fagos de bacterias Gram-positivas (proteínas ClpP), y otras presentan vínculos con ambos grupos (unidad mayor de la terminasa). Además, el fago D3 evidenció un tipo de mecanismo de síntesis de la cápside que también se identificó en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Otras evidencias de un ancestro común en

el cluster de los genes estructurales en *Siphoviridae* de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se establecen por la sorprendente similitud de mapa de genes observada en *Escherichia coli* y *Streptococcus thermophilus* (Desiere y col., 1998; Lucchini y col., 1999a).

Es posible establecer tres limitaciones de este análisis. En primer lugar, cuando se habla de *Siphoviridae* se debería entender que este término es primariamente una descripción morfológica de los fagos y no representa un grupo homogéneo. Se debe entonces, especificar que el presente análisis se aplica a fagos pequeños, de cabeza isométrica, con genomas de aproximadamente 40 kb. En segundo lugar, al hablar de genes estructurales o módulos de morfogénesis, no es posible imaginar esta región como una unidad genética homogénea, que se extiende desde los genes de empaquetamiento del ADN hasta los determinantes de las fibras de la cola. El mayor cluster de genes vinculados que pudo identificarse por análisis comparativo de secuencias se extiende desde la subunidad de terminasa hasta los genes de la cola. Este cluster se observó cuando se compararon fagos *pac-* (LL-H/phig1e) y *cos-site* (adh/Sfi21). Varias comparaciones de fagos definieron un segundo cluster pequeño, de genes relacionados dentro de esta región, cubriendo desde la terminasa hasta las proteínas principales de la cápside. Una tercera limitación del análisis genómico comparativo y evolutivo es el pequeño número de secuencias fágicas disponibles en las bases de datos. Las secuencias de genomas bacterianos y de profagos y su posterior análisis podrían proveer más respuestas a los estudios evolutivos fágicos.

Referencias bibliográficas

- Benbadis, L.; Faelen, M.; Slos, P.; Fazel, A. and Mercenier, A. (1990).** Characterization and comparison of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* isolated from yoghurt. *Biochimie*, vol. 72, pp. 855-862.
- Bolotin, A.; Mauger, S.; Malarme, K.; Ehrlich, S. and Sorokin, A. (1999).** (Eds. The Netherlands Kluwer Academic Publishers), Proc. Sixth Symp. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, pp. 377-382, Veldhoven, The Netherlands, 19-23 september 1999.
- Botstein, D. (1980).** A theory of modular evolution for bacteriophages. *Annali of New York Academy of Science*, vol. 354, pp. 484-491.
- Bradley, D.E. (1967).** Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, vol. 31, pp. 230-314.
- Brüssow, H. and Desiere, F. (2001).** Comparative phage genomics and evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Molecular Microbiology*, vol. 39 (2), pp. 213-222.
- Brüssow, H.; Bruttin, A.; Desiere, F.; Lucchini, S. and Foley, S. (1998).** Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages - A review. *Virus Genes*, vol. 16, pp. 95-109.
- Brüssow, H.; Frémont, M.; Bruttin, A.; Sidoti, J.; Constable, A. & Fryder, V. (1994).** Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, pp. 4537-4543.
- Bruttin, A.; Desiere, F.; D'Amico, N.; Guérin, J-P.; Sidoti, J.; Huni, B.; Lucchini, S. and Brüssow, H. (1997).** Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, pp. 3144-3150.
- Desiere, F.; Lucchini, S. and Brüssow, H. (1998).** Evolution of *S. thermophilus* bacteriophages by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions. *Virology*, vol. 241, pp. 345-356.
- Desiere, F.; Pridmore, D. and Brüssow, H. (2000).** Comparative genomics of the late gene cluster from *Lactobacillus* phages. *Virology*, vol. 275, pp. 294-305.
- Fayard, B. (1993).** Tesis Doctoral. Université de Nancy.
- Heap, H.A. and Lawrence, R.C. (1977).** The contribution of starter strains to the level of phage infection in a commercial cheese factory. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, vol. 12, pp. 213-218.
- Huggins, A. and Sandine, W. (1977).** Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 33, pp. 184-191.
- Jarvis, A. and Meyer, J. (1986).** Electro microscopic heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analysis of the DNA genomes of three lactic streptococcal bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 51, pp. 566-571.
- Jarvis, A.W. (1977).** The serological differentiation of lactic streptococcal bacteriophage. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, vol. 12, pp. 176-181.
- Josephsen, J.; Andersen, N.; Behrndt, H.; Brandsborg, E.; Christiansen, G.B.; Hansen, S.; Kim, J.H. & Batt, C.A. (1994).** Molecular characteristics of a *Lactococcus lactis* bacteriophage F4-1. *Food Microbiology*, vol. 8, pp. 15-26.

- Larbi, D.; Colurin, C.; Ronselle, L.; Decari, B. and Simonet, J.M. (1990).** Genetic and biochemical characterization of nine *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* bacteriophages. *Lait*, vol. 70, pp. 107-116.
- Lucchini, S.; Desiere, F. and Brüssow, H. (1999a).** Similarly organized lysogeny modules in temperate *Siphoviridae* from low GC content Gram-positive bacteria. *Virology*, vol. 263, pp. 427-435.
- Lucchini, S.; Desiere, F. and Brüssow, H. (1999b).** Comparative genomics of *S. thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *Journal of Virology*, vol. 73, pp. 8647-8656.
- Matthews, R.E.F. (1982).** Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, vol. 17, pp. 1-200.
- Neve, H.; Krusch, U.; Teuber, M. (1989).** Classification of virulent bacteriophages of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yoghurt and Swiss-type cheese. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, pp. 624-629.
- Prevots, F.; Mata, M. and Ritzenhaller, P. (1990).** Taxonomic differentiation of 101 lactococcal bacteriophages and characterization of bacteriophages with unusual large genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, pp. 2180-2185.
- Prevots, F.; Relano, P.; Mata, M. and Ritzenhaller, P. (1989).** Close relationship of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* at both the protein and the DNA level. *Journal of General Microbiology*, vol. 135, pp. 3337-3344.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. (Eds. Cold Spring Harbor Laboratory), Cold Spring Harbor, New York.
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, vol. 98, pp. 503-517.
- Svensson, U. & Christiansson, A. (1991).** Methods for phage monitoring. *Bulletin FIL-IDF*, vol. 263, pp. 29-39.

Sección 4

Quesos reducidos en materia grasa

La leche y los productos lácteos son alimentos que aportan a la dieta nutrientes de alto valor tales como proteínas, fósforo y calcio. Por este motivo han sido considerados siempre como importantes constituyentes de la alimentación humana.

Sin embargo, el consumo de estos alimentos ha recibido últimamente una mala propaganda, particularmente con relación a los efectos nocivos para la salud vinculados con la grasa y los compuestos con ella asociados. A esta publicidad se contraponen trabajos de reciente aparición que resaltan las buenas cualidades de estos componentes de la leche, principalmente vinculadas con su acción como agentes anticancerígenos (Parizza, 1991; Parodi, 1996).

Pese a todo, no se puede dejar de reconocer que en los últimos años ha habido un interés creciente por el consumo de alimentos reducidos en grasa, impulsado por las dietas que pregonan la disminución en su ingesta total (Defoliart, 1989; Labell y col., 1992; Bullens, 1994; Davide, 1994; Mann, 1994; Britten, 1995).

Ubicando los hechos en un nivel más balanceado, debería decirse que en las personas sanas es necesario limitar la ingesta de productos lácteos enteros a valores que no sean la causa de excesos en los compuestos citados, mientras que los individuos que presentan algún tipo de patología relacionada con el consumo de grasas y colesterol deben disminuir al máximo o suspender el consumo de este tipo de productos.

Capítulo 1

Problemas asociados con la producción

Carlos A. Zalazar, María C. Perotti, Susana M. Bernal y Diego J. Mercanti

Debido al creciente interés despertado en la población por el consumo de alimentos semidescremados o exentos totalmente de materia grasa de origen animal, la industria láctea se ha abocado al desarrollo de este tipo de productos. Con buenos resultados, como en el caso de las leches fluidas y en polvo descremadas y semidescremadas, los yogures de bajo contenido graso, los flanes, postres y helados.

En cambio, los quesos reducidos en grasa que ofrece el mercado son de inferior calidad que los de contenido graso normal. La causa de esto radica en que la reducción del contenido lipídico en un queso conlleva, como defectos principales, una textura excesivamente firme y sabor no típico.

En el queso entero la matriz proteica actúa como un componente estructural que encierra físicamente la grasa y la fase acuosa. En los quesos reducidos en grasa las proteínas ocupan una mayor porción de volumen, lo que se traduce en una mayor posibilidad de entrecruzamiento de dichas proteínas (Mistry y Anderson, 1993). A medida que disminuye el contenido de grasa la matriz proteica se vuelve más compacta y la textura se torna gomosa.

La grasa, por otra parte, cumple el papel de solvente, siendo reservorio de compuestos liposolubles, mientras que la membrana del glóbulo graso está ligada con enzimas importantes tales como lipasas, fosfatasa alcalina, etc., las que pueden afectar el sabor del queso. Además, la interfase agua-lípido es útil para las reacciones que conducen a la formación de los compuestos del sabor.

Finalmente, la grasa láctea como tal está asociada con muchas propiedades del queso, tales como firmeza, adhesividad, poder lubricante y opacidad.

Por todas estas razones, la producción de quesos reducidos en materia grasa que posean características organolépticas aceptables continúa siendo un problema no resuelto totalmente para la industria, mientras que los posibles caminos a recorrer para su solución constituyen un verdadero desafío para la investigación tecnológica. Es de destacar que la escasa producción de quesos bajos en grasa en Estados Unidos y en el Reino Unido (5 % y 8 % del total respectivamente) obedece más a la falta de calidad que a la ausencia de un mercado consumidor (Banks y col., 1992).

En lo que respecta al nivel de reducción de la materia grasa debe decirse que si alcanza al 25 % del producto normal las diferencias de calidad pasan inadvertidas. Si la reducción llega al 33 % todavía se mantienen características aceptables pero si es del 50 % o más el producto se torna decadente, gomoso, seco y falto de sabor.

Precisamente, las legislaciones sobre alimentos establecen que para que un queso pueda llamarse reducido en materia grasa o descremado, la reducción en materia grasa debe llegar al menos al 50 % con relación al producto normal. Así lo establece por ejemplo el Código Alimentario Argentino en su artículo 1.376 para los productos “reducidos en valor lipídico o de contenido graso reducido” (De la Canal y Asociados, 1999).

A nivel mundial son numerosos los trabajos referidos a quesos bajos en materia grasa y actualmente el tema está siendo intensamente tratado, lo que se refleja en la cantidad de artículos publicados en las principales revistas periódicas de lactología. La mayor parte de los estudios, sin embargo, han sido realizados sobre queso Cheddar. Fenelon y col. (2000) investigaron, por ejemplo, el efecto de una reducción de 33 a 6 % de la materia grasa sobre los cambios que se producían en la microbiología y la proteólisis del queso Cheddar. Llegaron a la conclusión de que la reducción de materia grasa tenía escaso efecto sobre las células del fermento primario, pero que la población de bacterias lácticas no provenientes del fermento (NSLAB) decrecía a medida que disminuía el tenor graso del queso. Asimismo, encontraron que los extractos de nitrógeno soluble a pH 4,6 analizados por HPLC en fase reversa mostraban perfiles de proteólisis ligeramente diferentes. Hay algunos trabajos sobre Mozzarella, Cacciota y ciertos tipos de quesos suizos y muy poca información con relación a quesos blandos. En la parte final de esta sección se presentan resultados de trabajos desarrollados sobre quesos argentinos blandos y semiduros reducidos en grasa.

Las más importantes estrategias básicas para solucionar los problemas asociados con la disminución del contenido graso se tratan en el punto siguiente, aclarando que dicho tratamiento no es exhaustivo y que en forma permanente están apareciendo nuevas comunicaciones sobre el tema.

Referencias bibliográficas

- Banks, J.; Muir D.; Brechany, E. y Law, A. (1992).** "The production of low fat hard ripened cheese". Proc. 3rd Cheese Symposium, National Dairy Products Research Centre, Moorepark, pp. 67-80.
- Britten, M. (1995).** Uncompromised low-fat foods. *Alimentech*, vol. 8, pp. 6-7.
- Bullens, C. (1994).** Reduced-fat Cheddar. *The World of Ingredients*, October-November, pp. 28-31.
- Davide, C. (1994).** New directions in low-fat dairy products processing towards better health. *The Philippine Agriculturist*, vol. 77, pp. 1-16.
- Defoliart, L. (1989).** Revolutionizing the cheesemaker's craft. *Touchstone*, vol. 6, pp. 34-36.
- De la Canal y Asociados (eds.) (1999).** *Código Alimentario Argentino*, Buenos Aires, Argentina.
- Fenelon, M.; O'Connor, P. y Guinee, T. (2000).** The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 2.173-2.183.
- Labell, F.; Eilers, J. y Duxbury, D. (1992).** Current dairy research highlights low-fat cheese. *Food Processing*, vol. 9, pp. 41-47.
- Mann, E. (1994).** Low fat cheese. *Dairy Industries International*, vol. 10, pp. 21-22.
- Mistry, V. y Anderson, D. (1993).** Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. *Food Structure*, vol. 12, pp. 259-266.
- Parizza, M. (1991).** A new cancer inhibitor in dairy products. International Dairy Federation, Bulletin N° 257, pp. 29-30.
- Parodi, P. (1996).** Milk fat components: possible chemopreventive agents for cancer and other diseases. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 51, pp. 24-32.

Capítulo 2

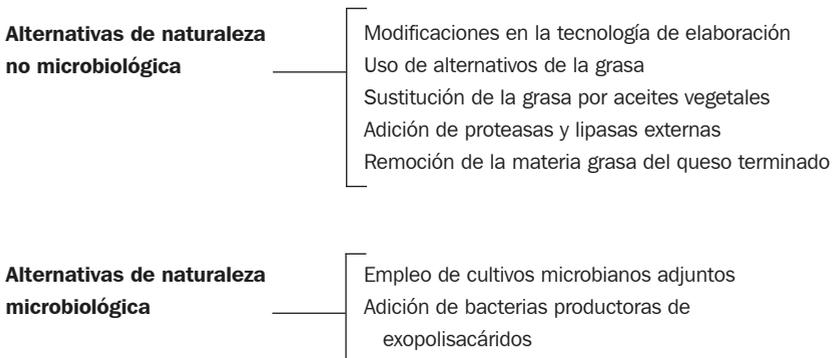
Alternativas tecnológicas de producción

Carlos A. Zalazar, María C. Perotti, Susana M. Bernal y Diego J. Mercanti

Las alternativas más conocidas hasta el presente para la elaboración de quesos reducidos en materia grasa se muestran en la Figura 1 (Zalazar y col., 1998).

Figura 1

Métodos para la producción de quesos bajos en grasa



Alternativas no microbiológicas

Modificaciones en la tecnología de elaboración

El medio más simple y económico para mejorar el sabor y la textura de los quesos reducidos en grasa es incrementar su nivel de humedad. Esto mejora la lubricidad e imparte palatabilidad cremosa y a su vez provoca un aumento del rendimiento quesero (Drake y Swanson, 1995).

Existen diversas alternativas tecnológicas para obtener un producto con un contenido de humedad superior al normal. La más común y simple es dejar los granos de cuajada de tamaño grande, es decir, realizar un menor trabajo de lirado. Esta técnica es perfectamente adaptable a quesos blandos, no tanto a productos semiduros e incompatible con productos duros.

Otro recurso simple es utilizar temperaturas de cocción más bajas, lo que también redundaría en un grano con mayor contenido de humedad, método que es aplicable a quesos de pasta semicocida. Para este mismo tipo de quesos el lavado de la cuajada con agua fría también conduce a una mayor retención de humedad (Ardö, 1993).

Johnson y col. (2001) han propuesto un método para elevar el contenido de humedad en el queso que consiste en aumentar la firmeza del coágulo al momento del lirado incrementando el tiempo desde el instante de la adición del coagulante hasta el inicio de la rotura por lirado. En dicho estudio se comparó el efecto que tiene la firmeza del coágulo en el momento del corte sobre la composición del queso Cheddar reducido en un 50 % en su contenido de materia grasa con respecto al valor normal. Los tiempos de lirado fueron de 25, 48 y 65 minutos luego de haber sido adicionado el coagulante. Un mayor tiempo para el lirado se tradujo en una mayor firmeza del coágulo, lo que resultó en un incremento de la humedad y del rendimiento quesero. El porcentaje de materia grasa recuperado en la cuajada disminuyó al aumentar el tiempo de lirado, pero esta disminución no alcanzó a enmascarar el aumento de rendimiento producido por el aumento de la humedad. La cantidad de nitrógeno recuperado en todos los quesos fue similar. Los quesos con mayor tiempo de lirado, como consecuencia de su mayor nivel de humedad y de su pH más bajo, fueron más blandos y suaves, y la intensidad de sus caracteres organolépticos no fue afectada.

También se puede aumentar el contenido acuoso incrementando la temperatura de pasteurización. Esto trae aparejado una mayor desnaturalización de las proteínas del suero y, por lo tanto, un aumento de la capacidad de ligar agua de la cuajada (Zalazar y col., 1998).

Lo y Bastian (1998) desarrollaron un estudio sobre la influencia de la incorporación de proteínas de suero nativas y desnaturalizadas a queso Havarti.

Para ello elaboraron quesos con leche parcialmente descremada al 1,5 % de materia grasa. Posteriormente la leche fue ultrafiltrada hasta un contenido total de sólidos de 42 a 44 % y tratada térmicamente de dos formas: 72 °C durante 15 segundos y 85 °C durante 17 segundos. Como control utilizaron un queso elaborado con leche de 1,5 % de materia grasa y pasteurizada a 72 °C durante 15 segundos, pero sin concentrar por ultrafiltración.

De esta forma obtuvieron quesos con un contenido final de materia grasa sobre sólidos totales de alrededor de 31 %, mientras que el contenido de proteínas sobre la misma base fue de 57,7 % para el control y de alrededor de 59 % para los elaborados con leche ultrafiltrada de alto y bajo tratamiento térmico. La humedad fue de aproximadamente 48 % para el queso control, mientras que la de los experimentales estuvo cercana al 50 %.

Se notó un menor nivel de degradación de la caseína α_{s1} para los quesos elaborados con leche ultrafiltrada, que fue más acentuado en el producto con menor tratamiento térmico, lo que los autores atribuyeron a la mayor proporción en éste de proteínas de suero nativas.

Al no contarse en este trabajo con un queso control elaborado con leche entera, las conclusiones que se extraen del mismo son relativas a un testigo de leche descremada pero sin ultrafiltrar. En ese sentido se estableció que los quesos experimentales resultaron más blandos, con más humedad y con una mayor cantidad de ojos que el testigo, y con niveles similares para los atributos sensoriales de acidez y sabor general.

La homogeneización de la materia grasa de la leche de elaboración es otro método que ha sido ensayado para mejorar la retención de humedad y la textura de la cuajada, al obtenerse glóbulos grasos más pequeños que se dispersan mejor en la matriz proteica potenciando el efecto untable (Tunick y col., 1993; Metzger y Mistry, 1994).

Como alternativa tecnológica ha sido usada también la ultrafiltración de la leche o el empleo de leche al 15 % de sólidos, para lograr mejorar el sabor del queso mediante una disminución en la cantidad de lactosa y un incremento en el contenido de proteínas de suero, que facilitan la incorporación de agua (Anderson y col., 1993; Anderson y Mistry, 1994).

Debido al aumento de la humedad el contenido de sal en la humedad de los quesos disminuye. Se ha verificado que para quesos Cheddar reducidos en grasa este valor es menor al óptimo de 4,5 % y puede llegar a ser tan bajo como el 3,5 % dependiendo del grado de reducción de la materia grasa y del contenido de humedad. Algunos autores han sugerido contenidos de sal en la humedad para este queso entre 4 y 6 %.

Como consecuencia de la disminución del contenido de sal en la humedad de los quesos parcialmente descremados se puede producir un excesivo crecimiento de microorganismos, lo que conduce a un elevado desarrollo de acidez

que conspira contra su calidad sensorial. Mistry y Kasperson (1998) llevaron a cabo un estudio cuyo objetivo fue evaluar las características sensoriales, reológicas y de maduración de quesos Cheddar con un contenido de sal en la humedad que varió entre 2,7 % y 4,5 %, con una humedad entre 45 % y 47 % y un contenido de materia grasa entre 14,6 % y 15,1 %.

Las conclusiones de este trabajo, aplicables sólo a quesos duros como el Cheddar, establecen que el contenido de sal en la humedad puede ser incrementado hasta los niveles hallados en los quesos elaborados con leche entera sin afectar adversamente las características de gusto y aroma pero, con características de textura menos deseables. A medida que se incrementaba el contenido de sal en la humedad, disminuía la intensidad del sabor amargo, el nivel de proteólisis general y la degradación de la caseína α_{s1} en particular. El nivel de degradación de la caseína β , en cambio, fue poco afectado por el contenido de sal.

Como contrapartida de la mayor retención de agua se incrementa la velocidad de acidificación de la cuajada al favorecerse el desarrollo de los microorganismos por una mayor actividad acuosa. Este mayor desarrollo de acidez puede provocar situaciones indeseables, que conducen en el caso de los quesos blandos a una textura dura y quebradiza, conocida como fenómeno de arricotado, que conspira contra la buena calidad del producto (Zalazar y col., 1995).

La elevación de la acidez puede ser controlada utilizando una menor cantidad de cultivos lácticos o bien empleando cepas de bajo desarrollo de acidez.

Consecuentemente, queda claro que cuando es implementada una alternativa para aumentar la retención de agua en un queso, paralelamente debe recurrirse a algún método para impedir el excesivo desarrollo de acidez.

Uso de alternativos de la grasa

Los alternativos de la grasa son ingredientes usados en lugar de las grasas naturales, con la intención de obtener una reducción en el valor calórico con una mínima pérdida de la untuosidad del producto. Los alternativos han sido divididos en miméticos y sustitutos de la grasa (Huyghebaert y col., 1996).

Los miméticos de la grasa imitan las propiedades de las grasas y aceites naturales. Este grupo incluye proteínas, hidrocoloides, celulosa microcristalina y almidones modificados. Al ser compuestos derivados de productos naturales, no han tenido mayores inconvenientes para ser aceptados por las correspondientes autoridades sanitarias.

En este terreno han alcanzado popularidad dos derivados de proteínas de suero de leche: Dairy-Lo® y Simplese®, cuyas propiedades aparecen en folletos comerciales. Se han usado exitosamente en helados, yogures y baños

de recubrimiento bajos en grasa pero su aplicación a quesos está todavía en experimentación. Otro producto basado en carbohidratos, el Novagel, también pertenece a este grupo de aditivos. Varios trabajos detallan el empleo de estos miméticos en distintos tipos de quesos, con resultados variables (Lucey y Gorry, 1993; Turín y Bonomi, 1995; Mc Mahon y col., 1996; Drake y col., 1996a). En la parte final de este capítulo se presentan los resultados de la aplicación de Dairy-Lo a quesos argentinos. En otro artículo se describe el uso de celulosa microcristalina en quesos procesados y en queso Cheddar (Bullens y col., 1994).

La característica general de este grupo de productos es que mejoran notablemente la textura y untuosidad pero no el sabor. Este efecto se logra por la mayor incorporación de agua que producen al ser polares e hidrosolubles, y porque el tamaño de sus partículas está dentro del rango de los glóbulos de grasa, por lo que en la boca provocan la sensación de tales.

Los sustitutos de la grasa pueden ser agrupados a su vez en lípidos estructurados, compuestos con uniones éster modificadas, y parafinas y aceites minerales. Se trata de compuestos que en algunos casos han sido aprobados recientemente por las legislaciones alimentarias, y en otros aún no.

Los lípidos estructurados están basados en ácidos grasos con uniones éster resistentes a la hidrólisis catalizada por lipasas. Este grupo exhibe propiedades muy similares a las de las grasas y aceites. Su funcionalidad es similar a la de la grasa natural y puede ser adaptada a necesidades específicas.

Dentro de los lípidos estructurados se encuentran los triacilgliceroles de ácidos grasos de cadena media y larga como la caprenina, triglicérido de bajo poder calórico (5 kcal g^{-1}), constituido por una molécula de ácido caprílico ($C_{8,0}$), una de ácido cáprico ($C_{10,0}$) y una de ácido behémico ($C_{22,0}$), al cual puede atribuirse la resistencia a la hidrólisis.

Los compuestos con uniones éster modificadas son también muy resistentes a la hidrólisis enzimática. Se trata, como en el caso anterior, de lípidos que tienen todas las propiedades físicas de la grasa pero que además aportan los componentes de sabor y aroma de las mismas.

En este último grupo el compuesto comercial más conocido es el Olean (Lemonick, 1996), poliéster de la sacarosa recientemente aprobado por la Food and Drug Administration (FDA). Se trata de hexa, hepta y octaésteres de la sacarosa. El tamaño de la molécula, debido a la cantidad de ácidos grasos que la integran, la torna totalmente inaccesible a las enzimas hidrolíticas, por lo que atraviesa intacta el tracto intestinal.

Su uso en alimentos ha sido cuestionado, en primer lugar porque no se trata de un aditivo sino de un ingrediente, ya que se usa en cantidades que superan largamente las usuales en los primeros, y en segundo lugar porque al no absorberse lleva consigo todos los componentes liposolubles, como por

ejemplo las vitaminas, que son corrientemente vehiculizadas por la grasa. Por esta razón, su uso por largos períodos debería incluir un suplemento de vitaminas liposolubles en la dieta. No hay muchos datos sobre su empleo en quesos (Drake y col., 1994).

Otro compuesto derivado del glicerol, utilizado en los quesos reducidos en grasa con el propósito de mejorar sus cualidades es la lecitina. La lecitina de soja es un emulsionante natural que contiene fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e inositol, y es comúnmente usada en chocolates. La lecitina puede ayudar a dispersar la grasa y a incorporar agua en los quesos magros. Drake y col. (1996b) estudiaron los efectos estructurales y sensoriales de incorporar lecitina de soja en quesos tipo Cheddar reducidos en grasa y comprobaron que el sabor de los mismos resultó poco atractivo.

Otros compuestos que no aportan calorías, como las parafinas y los aceites minerales, no son usados o no están permitidos en alimentos. Son similares en características físicas a las grasas animales, pero presentan diferencias desde el punto de vista organoléptico.

Por otra parte, todos estos compuestos no digeribles pueden ocasionar problemas relacionados con esta característica, ya sea creando sensaciones de hinchazón o de plenitud fastidiosas, u ocasionando flatulencias y/o diarreas por la excesiva lubricación de la mucosa intestinal.

Sustitución de la grasa de la leche por aceites vegetales

Es un aspecto en el que no se ha investigado demasiado. Por esta vía pueden ser obtenidos quesos completamente libres de colesterol y con una composición nutricional de la materia grasa más adecuada que la de la grasa de leche (Cenci y Panfili, 1994).

Se han desarrollado algunos trabajos sobre queso tipo Caciotta en Italia, ensayando para la elaboración el uso de leche totalmente descremada adicionada de aceite de oliva y de sustancias emulsionantes derivadas de la leche, y homogeneizando luego la mezcla. Las mayores dificultades encontradas han sido las de englobar completamente este tipo de sustancias en el retículo proteico.

Se evaluaron las propiedades a la coagulación de la leche adicionada con 1,8 y 10 % de aceite, y se determinó también el porcentaje de separación del mismo (Lucisano y col., 1994; Pompei y col., 1994).

Adición de proteasas y lipasas externas

Este recurso ha sido usado ampliamente para acelerar el proceso de maduración de distintos tipos de quesos, al aumentarse la velocidad de generación de compuestos derivados de la hidrólisis de grasas y proteínas (Fox y col., 1996). Los resultados obtenidos son de índole variable. En algunos casos se hallaron combinaciones de enzimas que producen buenos resultados, pero en muchas ocasiones se han obtenido productos con gustos no característicos, con predominancia del amargo.

Algunos ensayos mencionados en la bibliografía sobre el uso de proteasas y lipasas comerciales (Brandsma y col., 1994) indican que quesos tipo Cheddar elaborados con leche descremada y la adición de una mezcla de proteasas y lipasas comerciales desarrollaron buenas condiciones organolépticas y de textura en forma más rápida. Sin embargo, su maduración se debió seguir muy de cerca debido a la posibilidad de desarrollo de sabores anormales, que se incrementaban mucho entre los 8 y 12 meses, fundamentalmente por aparición de rancidez.

Sobre este aspecto no hay demasiada información disponible, y el método puede constituir un buen tema de investigación.

Remoción de la materia grasa del queso terminado

Basándose en trabajos que demuestran que los compuestos responsables de la intensidad del aroma y del sabor en quesos Cheddar residen en la fracción acuosa de los mismos, Nelson y Barbano (2004) han investigado la posibilidad de remover la materia grasa del queso al final de la maduración, partiendo de la hipótesis de que dichos compuestos permanecerían en el queso. Las experiencias se realizaron centrifugando muestras molidas de queso empleando diferentes combinaciones de fuerzas centrifugas, tiempos y temperaturas.

Los autores encontraron que eliminando por este procedimiento el 50 % de la grasa original del queso, ésta retenía cierto aroma pero muy poco sabor. Por otra parte, constataron que el queso desgrasado tenía una menor proporción de grasas saturadas y que las intensidades de aroma y sabor eran al menos iguales a las del queso con toda la grasa.

La técnica está aún en fase experimental, y el hecho de tener que moler el queso para extraer la materia grasa estaría limitando la aplicación de esta tecnología a productos que se comercialicen con esa presentación.

Alternativas microbiológicas

Empleo de cultivos microbianos suplementarios

El empleo de cultivos microbianos suplementarios (adjuntos) es una técnica que no ha sido muy desarrollada. Consiste en la adición de cepas adicionales a los cultivos lácticos normales, generalmente con capacidades proteolíticas destacadas y acidificantes atenuadas.

Ello provoca un incremento de la proteólisis de las caseínas que se traduce en un aumento de los sabores deseables, reduciendo los amargos al hidrolizar los péptidos responsables.

Algunas de las cepas utilizadas para este fin son *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

En queso Cheddar se han probado *Micrococcus* spp. y *Brevibacterium* spp. (Muir y col., 1992; Johnson y col., 1994; Johnson y Etzel, 1995).

En queso Edam se realizaron experiencias con la adición de cuatro cultivos adjuntos: *Brevibacterium linens*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus reuteri* (Tungjaroenchai y col., 2001). Como controles se utilizaron quesos con leche entera y parcialmente descremada sin la adición de los cultivos adjuntos. En los quesos experimentales se utilizaron los cultivos adjuntos solos y en distintas combinaciones, y leche con un contenido de materia grasa del 2 %. Los porcentajes medios de materia grasa y humedad de los quesos elaborados con leche descremada fueron del 21 % y 43 %, y 30 % y 39 % en los quesos con leche entera. El recuento de bacterias lácticas fue, en promedio, un orden logarítmico mayor para los quesos reducidos en grasa. El contenido de aminoácidos libres fue también mayor para este tipo de quesos y se incrementó durante el período de maduración. Los quesos con adición de *Lactobacillus helveticus* mostraron el mayor nivel de aminoácidos libres.

Adición de bacterias productoras de exopolisacáridos

Una amplia variedad de exopolisacáridos son producidos por bacterias lácticas termófilas. Se ha demostrado que cuando crecen en leche descremada ciertas cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* producen exopolisacáridos, que están primariamente compuestos por monómeros de glucosa y de galactosa. Dicha propiedad puede ser muy inestable, y la composición de los exopolisacáridos varía con los factores ambientales y con la disponibilidad de fuentes de carbono. Debido a que pueden

absorber agua y retardar la expulsión de suero, las bacterias productoras de los mismos han sido usadas para mejorar el comportamiento reológico y la textura en productos lácteos fermentados tales como el yogur.

En un estudio particular sobre el tema se trató de determinar si estos cultivos lácticos podían ser usados para retener agua en queso Mozzarella de bajo contenido graso (6 %), y si esta mayor humedad podía eventualmente afectar las propiedades de fusión del queso (Perry y col., 1997).

En las experiencias se utilizaron como fermentos primarios *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* productores y no productores de exopolisacáridos (starter EPS y starter no EPS) y cultivos adjuntos mesófilos productores de exopolisacáridos consistentes en mezclas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (adjuntos EPS). Las distintas Mozzarellas fueron elaboradas con las siguientes combinaciones de microorganismos:

- controles: starter no EPS (C);
- experimentales 1: starter EPS (E1);
- experimentales 2: starter no EPS + adjunto EPS (E2);
- experimentales 3: starter EPS + adjunto EPS (E3).

Los contenidos de humedad de las Mozzarellas C, E1, E2, y E3 a 24 h de la elaboración fueron de 58,2 %; 61,0 %; 60,9 % y 62,2 %, respectivamente.

Los quesos E2 no mejoraron su capacidad de fusión con respecto al control, pero aquéllos en los que se usó el starter EPS mostraron un incremento notable en la capacidad de fusión con respecto a dicho control.

Del trabajo se concluye que el uso de cultivos EPS puede ser de utilidad para incrementar el contenido de humedad de la Mozzarella y su capacidad de fusión. Se destaca asimismo que estos cultivos pueden usarse como una opción para la elaboración de quesos bajos en grasa sin el uso de alternativos de la misma.

Referencias bibliográficas

- Anderson, D. y Mistry, V. (1994).** Reduced fat cheddar cheese from condensed milk. 2 - Microstructure. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 7-15.
- Anderson, D.; Mistry, V.; Brandsma, R. y Baldwin, K. (1993).** Reduced fat cheddar cheese from condensed milk. 1- Manufacture, composition and ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 2.832-2.844.
- Ardö, Y. (1993).** Characterizing ripening in low-fat, semi-hard round-eye cheese made with undefined mesophilic DL-starter. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 343-357.
- Brandsma, R.; Mistry, V.; Anderson, D. y Baldwin, K. (1994).** Reduced fat cheddar cheese from condensed milk. 3 - Accelerated ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 897-906.
- Bullens, C.; Krawczyk, G. y Geithman, L. (1994).** Reduced-fat cheese products using carrageenan and microcrystalline cellulose. *Food Technology*, vol. 1, pp. 79-81.
- Cenci, A. y Panfili, G. (1994).** Possibili sostituzione dei grassi del latte con grassi vegetali o loro miscele in formaggi di rapido consumo effettuate con finalità nutrizionale o dietetiche. En Carini, S. (ed.), *Moderne Strategie Lattiero-Casearie, Tecniche Nuove spa*. Milano, pp. 84-85.
- Drake, M.; Boute, T.; Luedecke, L. y Swanson, B. (1994).** Milk fat sucrose polyesters as fat substitutes in Cheddar-type cheeses. *Journal of Food Science*, vol. 59 (2), pp. 326-327, 365.
- Drake M.; Boylston T. y Swanson B. (1996a).** Fat mimetics in low-fat Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, vol. 61, pp. 1.267-1.288.
- Drake M.; Herrett W.; Boylston T. y Swanson B. (1996b).** Lecithin improves texture of reduced fat cheeses. *Journal of Food Science*, vol. 61, pp. 1-4.
- Drake, M. y Swanson, B. (1995).** Reduced an low-fat cheese technology: a review. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 6, pp. 366-369.
- Fox, P.; Wallace, J.; Morgan, S.; Lynch, C.; Nilan, E. y Tobin, J. (1996).** Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, pp. 271-297.
- Huyghebaert, A.; Dewetrinck, K. y De Greyt, W. (1996).** Fat replacers. International Dairy Federation, Bulletin N° 317, pp. 10-15.
- Johnson, J. y Etzel, M. (1995).** Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze drying or freezing. *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 761-768.
- Johnson, M.; Chen, C. y Jaeggi, J. (2001).** Effect of rennet coagulation time on composition, yield and quality of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 1.027-1.033.
- Johnson, J.; Etzel, M.; Chen, C. y Johnson, M. (1994).** Accelerated ripening of reduced-fat Cheddar cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 adjuncts. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 769-776.
- Lemonick, M. (1996).** Are we ready for fat-free fat? *Time*, vol. 147 (2), pp. 52-61.
- Lo, C. y Bastian, E. (1998).** Incorporation of native and denatured whey proteins into cheese curd for manufacture of reduced fat, Havarti-type cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 16-24.
- Lucisano, M.; Pompei, C.; Dellera, C. y Casiraghi, E. (1994).** Miscele latte-olio: valutazione della stabilità all'affioramento. En Carini, S. (ed.), *Moderne Strategie Lattiero-Casearie, Tecniche Nuove spa*. Milano, pp. 97-99.
- Lucey, J. y Gorry, C. (1993).** "Effect of simplesse on the manufacture of low fat cheddar cheese". Proc. IDF Seminar, Cork, Ireland, pp. 439-447.

- Mc Mahon, D.; Alleyne, M.; Fife, R. y Oberg, C. (1996).** Use of fat replacers in low fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 79, pp. 1.911-1.921.
- Metzger, L. y Mistry, V. (1994).** A new approach using homogenization of cream in the manufacture of reduced fat Cheddar cheese. 1 - Manufacture, composition and yield. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 3.506-3.515.
- Mistry, V. y Kasperon, K. (1998).** Influence of salt on the quality of reduced fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 81, pp. 1.214-1.221.
- Muir, D.; Banks, K. y Hunter E. (1992).** Sensory changes during maturation of fat-reduced Cheddar cheese: effect of addition of enzymatically active attenuated starter cultures. *Milchwissenschaft*, vol. 47, pp. 218-222.
- Nelson, B. y Barbano, D. (2004).** Reduced-fat Cheddar cheese manufactured using a novel fat replacer removal process. *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 841-853.
- Perry, D.; Mc Mahon, D. y Oberg, C. (1997).** Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 799-805.
- Pompei, C.; Casiraghi, E.; Dellea, C.; Deller, C. y Lucisano, M. (1994).** Miscela latte-olio: valutazione dell'attitudine alla caseificazione. En Carini, S. (ed.), *Moderne strategie lattiero-casearie*, Tecniche Nuove spa. Milano, pp. 94-96.
- Tungjaroenchai, W.; Drake, M. y White, C. (2001).** Influence of adjunct cultures on ripening of reduced fat Edam cheeses. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 2.117-2.124.
- Tunick, M.; Malin, E.; Smith, P.; Shieh, J.; Sullivan, B.; Mackey, K. y Holsinger, V. (1993).** Proteolysis and rheology of low fat and full fat Mozzarella cheese prepared from homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 3.621-3.628.
- Turin, L. y Bonomi, F. (1995).** Influence of molecular modifications on the ripening of fat-substituted Caciotta cheese. *Italian Journal of Food Science*, vol. 1, pp. 63-68.
- Zalazar, C.S.; Bernal, S. y Zalazar, C.A. (1998).** Quesos reducidos en materia grasa: revisión del estado actual de conocimientos y tecnologías. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 16, pp. 135-142.
- Zalazar, C.; Meinardi, C.; Candiotti, M.; Bernal, S. y Hynes, E. (1995).** La maduración del queso Cre-moso Argentino. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 7, pp. 59-72.

Capítulo 3

Resultados obtenidos en quesos argentinos

Carlos A. Zalazar, María C. Perotti, Susana M. Bernal y Diego J. Mercanti

Efecto del nivel de humedad y del agregado de miméticos de la grasa

En un trabajo desarrollado sobre el queso Cremoso Argentino (Zalazar y col., 1999), se estudió el efecto de la incorporación de un mimético de la materia grasa y del incremento del nivel de humedad sobre las propiedades químicas y sensoriales de quesos bajos en materia grasa en comparación con testigos con contenido normal de grasa.

Se realizaron dos series de experiencias. En la primera serie se elaboraron quesos con distintas combinaciones de tenor graso en leche de elaboración y humedad final, la que fue conseguida con variaciones en la tecnología de elaboración, fundamentalmente por el tamaño de grano y por el tiempo de agitación. En la segunda se incorporó a la leche de elaboración el mimético comercial de la grasa Dairy-Lo, combinándose también con distintos niveles de humedad y materia grasa en leche. En la Tabla 1 se muestran los valores correspondientes a la composición de los distintos tipos de quesos de la primera serie al final del período de maduración, que se extendió por 20 días. En la Tabla 2 se presenta el mismo tipo de resultados para los quesos de la segunda serie.

Tabla 1

Valores de la composición final (%) para quesos elaborados sin la adición de Dairy-Lo (promedios de tres determinaciones)

Tipo de elaboración	De baja humedad		De humedad intermedia		De humedad alta	
Materia grasa en leche	2	2	2	4	1	
Proteínas	21,28	18,40	19,99	19,55	21,32	
Humedad	54,26	62,03	57,62	57,67	62,91	
Materia grasa	13,88	11,54	12,81	19,40	5,49	
Grasa en base seca	30,36	30,40	30,22	41,88	16,59	
Humedad en base no grasa	63,00	70,12	66,08	71,55	70,79	

* Quesos testigo.

Tabla 2

Valores de la composición final (%) para quesos elaborados con la adición de Dairy-Lo (promedios de tres determinaciones)

Tipo de elaboración	De humedad intermedia			De humedad alta	
Materia grasa en leche	1	2	4*	1	2
Proteínas	17,37	18,36	15,99	18,71	16,94
Humedad	68,95	63,32	65,60	68,79	67,15
Materia grasa	4,38	9,01	18,15	4,72	7,96
Grasa en base seca	14,11	24,77	40,88	15,15	24,25
Humedad en base no grasa	72,10	69,59	80,14	72,19	72,96

* Quesos testigo.

A partir de los datos de la Tabla 2 se puede apreciar que los quesos sin el agregado del mimético y con un tipo de elaboración que permite lograr una humedad final alta y media alcanzan un nivel para este parámetro que es algo superior al establecido por la legislación argentina vigente para quesos blandos (entre 45 y 55 % de humedad) con contenidos normales de materia grasa, pero debe hacerse notar que dicha legislación no fija valores para quesos blandos con contenidos reducidos de materia grasa. El agregado de Dairy-Lo incrementa aun más el contenido final de humedad debido a la capacidad de retención de agua de las proteínas de suero. De acuerdo con el Código Alimentario Argentino solamente pueden llamarse quesos reducidos en materia grasa aquellos cuyo contenido graso sea inferior al 50 % del producto entero. En el presente caso sólo cumplen ese requisito los productos con contenidos grasos inferiores al 9 %.

En lo relativo al progreso de la maduración de los distintos tipos de quesos elaborados, en la Tabla 3 se muestran los valores del grado de maduración, definido como la relación entre nitrógeno soluble a pH 4,6 y nitrógeno total.

Tabla 3

Valores del grado de maduración (%) para quesos con distintos contenidos (%) de materia grasa y humedad elaborados con y sin la adición de Dairy-Lo (promedios para tres determinaciones)

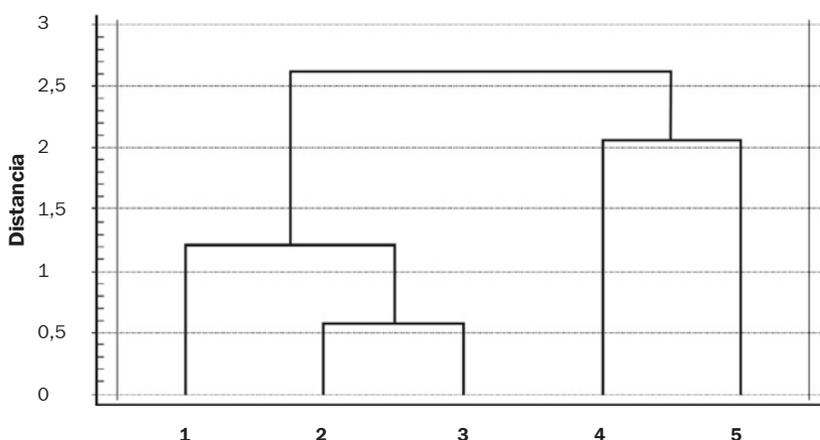
	Sin adición de Dairy-Lo					Con adición de Dairy-Lo			
Humedad final	62,91	54,26	57,62	62,03	57,67	68,95	68,79	63,32	67,15
Grasa en leche	1	2	2	2	4	1	1	2	2
Grado de maduración	12,7	12,6	12,5	12,8	12,1	13,6	13,9	13,6	13,2

Se puede apreciar el mayor valor del grado de maduración para los quesos con agregado de Dairy-Lo, lo que puede ser atribuido a su mayor nivel de humedad final, que acelera los procesos enzimáticos de degradación de las caseínas. Este hecho pudo ser verificado también por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida. En este caso, los quesos con adición de Dairy-Lo mostraron perfiles con un nivel evidentemente mayor de degradación de la caseína α_{s1} .

Desde el punto de vista del análisis sensorial, los quesos fueron ensayados por un panel que evaluó las características de aroma, color, textura y sabor para los productos semidescremados con y sin el agregado de Dairy-Lo, frente a un testigo elaborado con leche entera. En la degustación se evaluaron sólo los quesos de más alto contenido de humedad para cada tipo. Con base en los resultados obtenidos se los agrupó por similitudes sensoriales de acuerdo con el dendrograma que se muestra en la Figura 1.

Figura 1

Dendrograma de características sensoriales de quesos Cremoso Argentino



- 1: queso control con leche entera
- 2: queso con 1 % de grasa en leche, tecnología de alta humedad, sin Dairy-Lo
- 3: queso con 2 % de grasa en leche, tecnología de alta humedad, sin Dairy-Lo
- 4: queso con 1 % de grasa en leche, tecnología de alta humedad, con Dairy-Lo
- 5: queso con 2 % de grasa en leche, tecnología de alta humedad, con Dairy-Lo

Este diagrama permite apreciar que los quesos sin Dairy-Lo se agrupan entre sí a un nivel bajo de distancia, lo que indica sus similitudes. También puede observarse que este primer grupo se asocia a un nivel relativamente bajo con el queso testigo, lo que revela semejanzas entre ellos. Los quesos con Dairy-Lo en cambio se asocian entre ellos a un nivel de distancia alto, indicando que son significativamente diferentes de los quesos sin el agregado y del testigo.

En un trabajo complementario del detallado anteriormente se estudió el

efecto del nivel de humedad y del agregado de Dairy-Lo sobre las propiedades reológicas del queso Cremoso Argentino (Zalazar y col., 2002). Se concluyó que existen diferencias entre los quesos descremados y los enteros, pero que el uso de un mimético de la grasa no mejora esta situación.

Los resultados obtenidos en estos trabajos permiten establecer que los quesos blandos descremados, sin agregados y con un mayor nivel de humedad conseguido sólo con recursos tecnológicos, son comparables en sus características fisicoquímicas y sensoriales con los quesos con contenido normal de materia grasa. Quedaría pendiente la posibilidad de conseguir resultados aun mejores combinando los recursos tecnológicos para obtener un mayor nivel de humedad con la adición de algún cultivo adjunto.

La información relacionada con los quesos semiduros con contenidos reducidos de materia grasa es escasa. Dentro de los quesos argentinos de este tipo, últimamente han sido dados a conocer los resultados de un trabajo llevado a cabo sobre queso Tybo (Candioti y col., 2002).

En ese trabajo se analiza el efecto que tiene sobre la calidad de este queso el agregado de un mimético comercial de la grasa con base en proteínas de suero (Dairy-Lo), solo o en combinaciones con un coagulante de cabrito en pasta y con una proteasa alimenticia.

Se elaboraron seis quesos diferentes: un testigo con leche entera (T) y cinco experimentales con leche parcialmente descremada (1,8 % de materia grasa). El primero de ellos sin ningún agregado (E1), el segundo con Dairy-Lo (E2), el tercero con Dairy-Lo y coagulante de cabrito (E3), el cuarto con Dairy-Lo y una proteasa comercial (E4) y el quinto con Dairy-Lo, coagulante de cabrito y proteasa comercial (E5).

Los productos con coagulante de cabrito exhibieron un mayor porcentaje de ácidos grasos libres de bajo peso molecular, y aquellos con el agregado de la proteasa evidenciaron una mayor degradación proteica. La composición química de los distintos quesos al final de la maduración se ve en la Tabla 4, mientras que el perfil de los ácidos grasos libres se muestra en la Figura 2. El perfil sensorial de los distintos quesos se estableció en función de los siguientes atributos: aroma, color, aspecto de la masa, firmeza, elasticidad, plasticidad, sabor genuino, gusto salado y sabor residual, que fueron evaluados por un panel entrenado. El sabor típico se vio afectado negativamente en los quesos con coagulante de cabrito. El queso descremado con el solo agregado de Dairy-Lo fue el que presentó el perfil organoléptico más deficiente.

Figura 2

Perfil de ácidos grasos libres para distintos tipos de quesos semiduros reducidos en materia grasa, al final de la maduración

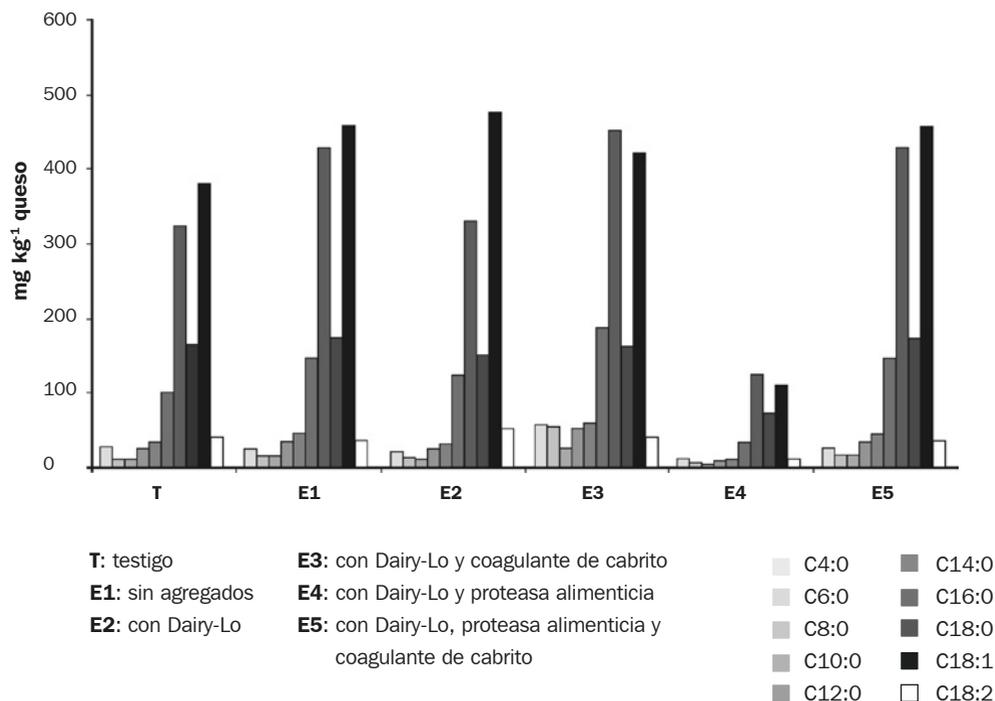


Tabla 4

Composición química (%) de distintos tipos de quesos semiduros reducidos en materia grasa, al final de la maduración

Tipo de queso	T	E1	E2	E3	E4	E5
---------------	---	----	----	----	----	----

Materia grasa	30,40	20,43	15,18	14,49	14,18	13,52
Proteínas totales	21,50	27,80	26,50	25,70	26,90	27,50
Humedad	41,70	43,90	50,50	50,50	52,10	50,70

T: testigo

E1: sin agregados

E2: con Dairy-Lo

E3: con Dairy-Lo y coagulante de cabrito

E4: con Dairy-Lo y proteasa alimenticia

E5: con Dairy-Lo, proteasa alimenticia y coagulante de cabrito

La reducción de materia grasa y el comportamiento funcional al calor de los quesos

Se han desarrollado numerosos trabajos con el objetivo de establecer una vinculación entre el comportamiento de los quesos a altas temperaturas y sus características fisicoquímicas. Este interés tiene su origen en el empleo de las variedades blandas en la fabricación de pizzas y sandwichs calientes, y la utilización de otras variedades más duras en salsas y comidas calientes.

Con respecto a las primeras, Mercanti y col. (2004) estudiaron el efecto que tienen diversas variables sobre la capacidad de fusión del queso Cremoso Argentino. Para analizar la influencia del tenor graso se elaboraron quesos a partir de leche entera (testigo), parcialmente descremada y entera adicionada de crema, cuyos contenidos de materia grasa fueron $3,50 \pm 0,15$ %, $2,00 \pm 0,15$ % y $4,50 \pm 0,15$ % respectivamente.

Los ensayos de fusión se realizaron utilizando una modificación del test de Schreiber, empleando cilindros de queso de 42 mm de diámetro y 10 mm de altura obtenidos a no menos de 1 cm de cada borde. Las muestras, cuatro por cada tipo de queso, fueron sometidas a 130 °C durante 15 minutos mediante una estufa con convección natural de aire. La cuantificación del ensayo se hizo a través de la determinación de las áreas de las muestras antes y después del tratamiento. El valor de la fusión se expresó como la relación porcentual entre el área después del ensayo y la de antes del mismo. En la Tabla 5 se muestran los resultados de los análisis químicos realizados sobre los quesos al final de la maduración.

Tabla 5

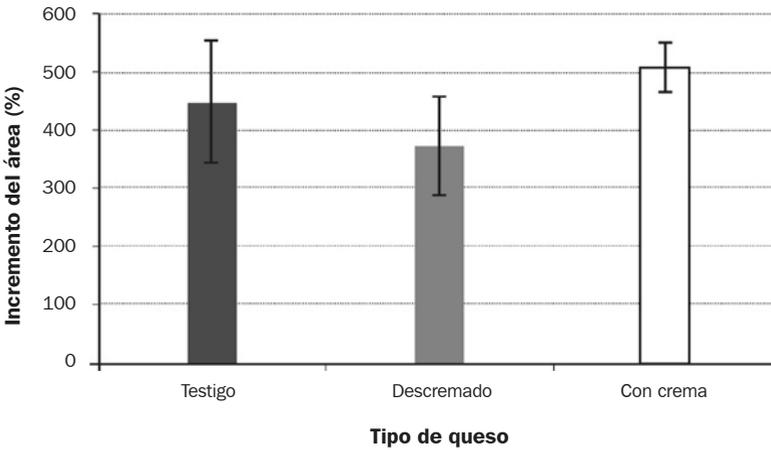
Composición química (%) de los quesos al final de la maduración (22 días). Datos correspondientes a tres elaboraciones (promedios y desviaciones)

Queso	Testigo	Descremado	Con crema
Humedad	$57,95 \pm 2,24$	$59,31 \pm 3,04$	$53,61 \pm 2,51$
Grasa	$21,60 \pm 1,45$	$12,40 \pm 3,25$	$25,90 \pm 2,67$
Grasa en base seca	$51,36 \pm 1,91$	$32,98 \pm 3,72$	$55,75 \pm 3,04$
Nitrógeno total	$2,42 \pm 0,09$	$2,92 \pm 0,25$	$2,13 \pm 0,30$
Nitrógeno soluble	$0,33 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,04$
Grado de maduración	$13,49 \pm 0,67$	$11,92 \pm 1,29$	$15,82 \pm 3,80$
Rendimiento	$15,37 \pm 0,85$	$13,50 \pm 1,56$	$17,43 \pm 0,67$

En la Figura 3 se presentan los resultados del ensayo de fusión realizado sobre los quesos a los 22 días de maduración.

Figura 3

Influencia del tenor graso en la fusión de quesos blandos. Incremento porcentual del área de los quesos después del ensayo de fusión (promedio y desviaciones estándares de dos elaboraciones)



Teniendo en cuenta que una buena capacidad de fusión se corresponde con un aumento en el área de al menos un 400 % (valor obtenido basado en estudios previos realizados sobre muestras comerciales), se pudo observar que una reducción en el contenido de materia grasa de un queso afecta negativamente esta propiedad. En efecto, mientras los quesos testigo y con crema superaron este valor, los descremados no lograron alcanzarlo.

Para los quesos con contenidos normales de materia grasa en general se han establecido buenas correlaciones positivas entre la capacidad de fusión y los contenidos de humedad y grasa.

Guinee y col. (2000) establecieron, para quesos tipo Cheddar, que una disminución de la materia grasa del 30 al 17 % resultaba en una significativa disminución de la humedad en sólidos no grasos y en el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6, y en un incremento en la caseína intacta. Con la disminución en la materia grasa se obtuvo asimismo un significativo aumento en el tiempo medio de fusión y una disminución en la capacidad para fluir del

queso fundido. Estos resultados estarían apoyando lo dicho anteriormente; de esta manera, podría esperarse una mejora ostensible en la capacidad de fusión de quesos parcialmente descremados cuyo contenido total de humedad ha sido aumentado.

Conclusiones

Si bien la cantidad y calidad de los trabajos de investigación en el tema de quesos reducidos en materia grasa ha ido en constante aumento, los productos de mercado hoy disponibles siguen siendo escasos, acotados a ciertas variedades y de cualidades dispares y no totalmente satisfactorias.

Por ello es necesario seguir profundizando en este aspecto, teniendo presente que el resultado final puede indicar que para obtener un producto que satisfaga las exigencias de los consumidores será necesario combinar dos o más de las metodologías presentadas.

Referencias bibliográficas

- Candioti, M.; Palma, S.; Sabbag, N.; Perotti, C.; Bernal, S. y Zalazar, C. (2002).** Estudio comparativo de distintas alternativas tecnológicas para la producción de quesos semiduros de pasta lavada bajos en grasa. *Grasas y Aceites*, vol. 53 (4), pp. 384-390.
- Guinee, T.; Auty, M. y Fenelon, M. (2000).** The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 277-288.
- Mercanti, D.; Wolf, I.; Meinardi, C.; Candioti, M. y Zalazar, C. (2004).** Influencia del contenido graso y otras variables sobre la capacidad de fusión del queso Cremoso Argentino. *Grasas y Aceites*, vol. 55 (3), pp. 296-302.
- Zalazar, C.S.; Meinardi, C.; Bernal, S. y Zalazar, C.A. (1999).** Effect of moisture level and use of fat replacers on quality of low-fat Argentinean cheeses. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 17, pp. 71-78.
- Zalazar, C.A.; Zalazar, C.S.; Bernal, S.; Bertola, N.; Bevilacqua, A. y Zaritzky, N. (2002).** Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *International Dairy Journal*, vol. 12, pp. 45-50.

Sección 5
Recientes desarrollos
en maduración de quesos

Los avances que se han alcanzado en los últimos tiempos, relativos a la profundización de los conocimientos acerca del proceso de maduración de quesos, han permitido tanto mejorar la calidad de los mismos como diseñar nuevas estructuras productivas que han conducido al logro de tecnologías más eficientes.

En esta Sección se pasa revista a esos avances. Luego de hacer un análisis del proceso desde una óptica general, con especial referencia a los métodos que se usan para su seguimiento y control, se discute el papel que juegan en la maduración las bacterias que no provienen de los fermentos intencionalmente agregados. La participación de estos microorganismos está recibiendo últimamente una gran atención debido a la creciente importancia que se les atribuye.

Por otro lado, lo prolongado del período de maduración para ciertos tipos de quesos con la paralización económica de un importante capital, ha conducido a la realización de diversas propuestas para acortar ese período, propuestas que se analizan en esta Sección.

Por último, otro importante factor que incide en forma notable sobre el aspecto económico de la producción de quesos es la aparición de defectos durante la maduración, por lo que resulta de gran interés la descripción de los mismos y sus posibles formas de control.

Capítulo 1

Maduración de quesos y su control

Carlos A. Zalazar, Mario C. Candiotti, Diego J. Mercanti,
Carina V. Bergamini y Carlos A. Meinardi

Introducción

El proceso de maduración de quesos consiste básicamente en la transformación de la cuajada recién elaborada, de pobres características reológicas y sensoriales, en el queso terminado, uno de los productos alimenticios más apreciados por la variedad de sus sabores, aromas y textura.

La transformación es debida fundamentalmente a cambios bioquímicos, casi todos de naturaleza enzimática, que se llevan a cabo sobre los principales componentes de la leche que han sido retenidos en la cuajada: lactosa, materia grasa y proteínas. Estos cambios están acompañados por otros de naturaleza exclusivamente física, que ocurren simultáneamente y en cierta forma determinan las condiciones para que sucedan los primeros. Se trata de los procesos de difusión de la sal y de pérdida de humedad (Fox y McSweeney, 1998).

La maduración de quesos es la etapa más larga del proceso productivo general. En efecto, mientras que los trabajos de transformación de la leche en cuajada en tina se miden en minutos, la maduración se mide en días, meses o años. Por esta razón tiene una gran incidencia sobre el aspecto económico, ya que grandes capitales están inmovilizados en una función totalmente improductiva. Debido a ello se han realizado numerosos intentos para acortar la duración de la maduración mediante distintos métodos que se conocen con

la denominación de maduración acelerada, tema que es tratado en detalle en otra parte de esta sección.

Un aspecto importante a destacar es que, si bien la maduración es generalmente lenta, son mínimas las posibilidades de incidir sobre la calidad final del producto o de corregir errores de fabricación en esta etapa. Efectivamente, mientras que en tina existen numerosos recursos para conducir la elaboración, las variables que pueden ser manejadas en la maduración son relativamente pocas: la temperatura de cámara, la humedad relativa, la limpieza y el volteo de las hormas. Por esto se afirma que los errores cometidos en la elaboración en tina difícilmente puedan ser corregidos durante la maduración. De cualquier manera, una mala conducción de la maduración puede aportar aun más factores para el fracaso de una elaboración.

La variable de mayor incidencia en la duración de la maduración es la humedad que tiene la cuajada al inicio de este período. Así, cuando se producen quesos con altos contenidos de humedad la maduración dura unos pocos días, o hasta algunas horas en los casos más extremos. Sin embargo, en la producción de quesos duros el estacionamiento puede durar muchos meses, como es el caso de los quesos duros italianos que permanecen en maduración durante más de dieciocho meses.

Durante la maduración ocurren importantes cambios en la flora microbiana de los quesos. A una constante caída de las bacterias lácticas provenientes del fermento como consecuencia de la desaparición de la lactosa, del aumento de la concentración de sal en el interior, del pH poco adecuado y de la lisis celular, se le superpone un incremento más o menos importante de las bacterias que no provienen del fermento y que se hallan presentes en el queso por los aportes de la leche y de la contaminación ambiental durante el trabajo en tina. Estas bacterias, que en la cuajada no superan las 100 UFC g⁻¹, llegan a niveles de hasta 10⁷ UFC g⁻¹ en el queso maduro.

En lo que concierne a los cambios de naturaleza bioquímica, en forma general pueden ser agrupados en:

- hidrólisis de la materia grasa con formación de ácidos grasos libres y productos de la ulterior transformación de los mismos;
- proteólisis fundamentalmente de la caseína con producción de compuestos nitrogenados de mediano y bajo peso molecular, aminoácidos libres y compuestos derivados de los mismos y
- metabolismos de la lactosa, del lactato y del citrato.

Las transformaciones ulteriores de los ácidos grasos libres, de los aminoácidos y del lactato conducen a la formación de compuestos determinantes en el aroma y sabor de los quesos mediante mecanismos complejos y ajustados a un correcto balance de componentes.

El origen de los agentes responsables de la maduración de quesos es variado, dado que provienen tanto de la leche como de los distintos insumos que se utilizan durante la elaboración. La leche aporta las enzimas nativas, proteasas y lipasas que, según el tipo de queso cumplen roles más o menos importantes. La enzima coagulante empleada en la elaboración contribuye significativamente con la actividad proteolítica, y en algunos casos particulares también con la actividad lipolítica durante la maduración. Los distintos tipos de microorganismos presentes en la masa proveen diversas enzimas, tanto proteasas como lipasas, dependiendo del tipo de microorganismo. Las bacterias del fermento suministran fundamentalmente proteasas de distintos tipos; los fermentos secundarios son fuente tanto de proteasas como de lipasas, que en algunos casos pueden llegar a ser de gran actividad. Las bacterias que no provienen de fermentos son también importantes en la maduración por su aporte enzimático y, aunque su rol no está aún bien determinado, hay actualmente numerosos estudios encarando este aspecto. Deben mencionarse finalmente las enzimas exógenas, proteasas y lipasas de grado alimentario, que son ocasionalmente adicionadas al queso durante su elaboración con la finalidad de realzar el sabor y el aroma o bien para conseguir estas características en tiempos más cortos (Menéndez y col., 1999).

Métodos para el estudio de la maduración

En primer lugar se realizará una revisión de los métodos que se utilizan para estudiar los cambios que se producen durante la maduración, es decir la proteólisis, la lipólisis y los metabolismos de la lactosa y del lactato.

El proceso de maduración es un complejo sistema de reacciones, fundamentalmente bioquímicas, muchas de las cuales se llevan a cabo simultáneamente, creando un panorama de muy difícil interpretación.

Para estudiar este complicado conjunto es necesario recurrir a sistemas que lo simplifiquen y, que de esa forma permitan acceder a un grupo más reducido de variables.

Dilucidar la contribución de los principales agentes de la maduración, sobre todo para los quesos duros y semiduros, es un proceso que suele requerir experiencias costosas y que insumen mucho tiempo, a causa del extenso período de maduración. Este hecho limita significativamente el número de ensayos que pueden llevarse a cabo en un tiempo determinado, por lo que los modelos que puedan ejecutarse en el menor tiempo posible aparecen como los más apropiados. Con este fin se han desarrollado varios sistemas o modelos, detallándose a continuación los más utilizados por los distintos investigadores que han trabajado en este tema.

Métodos para el estudio de la proteólisis

En lo que respecta al estudio de la proteólisis, entre los métodos más importantes que se utilizan para separar la influencia de los distintos agentes que participan en la maduración de quesos pueden mencionarse los más tradicionales, como son los de eliminación selectiva, y los métodos de incubaciones *in vitro*. A éstos se han agregado más recientemente los sistemas de lechadas de queso, de pastas de queso, de productos símil queso y los sistemas de elaboración de quesos miniatura, fundamentalmente para el estudio de la acción de las enzimas de los fermentos primarios y secundarios.

En los métodos de eliminación selectiva se llevan a cabo elaboraciones de quesos en las cuales uno o más de los equipos enzimáticos que participan de la maduración son eliminados. Es así como se han desarrollado métodos por medio de los cuales se elaboran quesos que maduran sin la influencia de un factor en particular, ya sea la enzima coagulante, los fermentos, las enzimas nativas, los agentes lipolíticos, etc. (Kleter, 1976). Estos métodos son realistas, ya que implican la elaboración y maduración de un queso en condiciones muy cercanas a las normales.

Los métodos de las incubaciones *in vitro* abarcan un conjunto de sistemas de más fácil ejecución, ya que no se realizan en ellos elaboraciones sino incubación de los sistemas enzimáticos con sustratos determinados en condiciones parecidas a las de maduración. Sin embargo, los resultados que se obtienen están limitados por el hecho de que las condiciones de trabajo y los sustratos utilizados no reflejan en forma realista lo que ocurriría en un medio como el queso. Por esta razón, las conclusiones que se pueden obtener de estos estudios son relativas y necesitan ser confirmadas en elaboraciones reales.

Los sistemas de lechadas de queso, pastas de queso o productos símil queso tienen la ventaja de que reproducen con bastante exactitud, en unos pocos días, los acontecimientos bioquímicos que se producen durante la maduración. Pero, por el contrario, son incapaces de reproducir el cuerpo, la textura o la actividad acuosa de un queso real.

Los quesos miniatura, de reciente desarrollo, tienen la ventaja de poder producirse en número elevado en forma simultánea, de manera de poder estudiar varias variables al mismo tiempo. Además, reflejan con bastante exactitud la composición de los quesos reales. Estos sistemas aparecen como muy promisorios para el estudio de la maduración de quesos blandos y semiduros pero no para los quesos duros, cuyas características muy especiales difícilmente puedan reproducirse con fidelidad en un modelo pequeño (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001).

Métodos de eliminación selectiva

a- Inactivación del coagulante

Como ya se dijo, en estos métodos se elimina del medio queso alguno/s de los grupos enzimáticos que participan en la maduración. En lo referente a la eliminación de la enzima coagulante se han desarrollado varios sistemas, que consisten en su inactivación una vez que ha realizado la fase primaria de la coagulación. Esta inactivación se basa en las notables diferencias que existen entre las velocidades de realización de la fase primaria y de la secundaria en función de la temperatura, o bien en el hecho de que la fase secundaria no se lleva a cabo en ausencia de iones calcio (Visser, 1976; Meinardi y col., 1998; Shakeel-Ur-Rehman y col., 1998).

La pepsina porcina es una enzima coagulante de muy limitada utilización en quesería debido a su marcada acción proteolítica secundaria, pero que se adapta bien a una inactivación por la gran diferencia que presenta en su estabilidad en función del pH del medio. Con base en esto, Meinardi y col. (1998) han desarrollado un método para la elaboración de quesos que maduran sin la influencia de la enzima coagulante, y que ha sido aplicado con muy buenos resultados al estudio del queso Cremoso Argentino.

El principio del método consiste en enfriar la leche a 6 °C y agregar pepsina porcina. A esta temperatura se lleva a cabo la fase primaria, pero no la secundaria. Después de un cierto tiempo de acción se sube el pH del medio hasta 7,8, de manera de provocar la destrucción de la pepsina. Una vez ocurrido esto, se eleva la temperatura de la leche hasta unos 37 °C, con lo que la coagulación se produce inmediatamente.

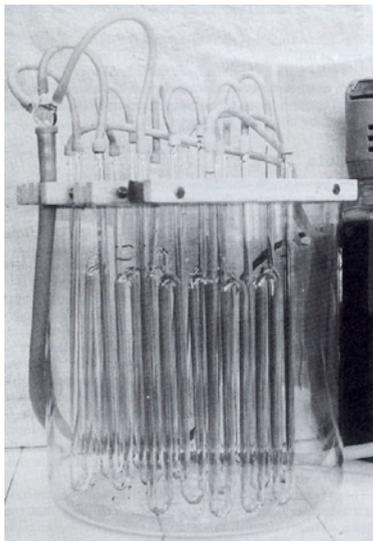
En primer lugar se procedió a determinar, mediante la realización de ensayos planificados, el tiempo necesario para que la pepsina complete la etapa primaria de la coagulación y las condiciones de inactivación de la misma. Se concluyó que 80 minutos a 5 °C eran suficientes para el primer caso, y que la enzima se inactiva totalmente con 45 minutos a 5 °C y pH 7,8.

Con estos resultados se diseñó una tina de laboratorio para llevar a cabo elaboraciones casearias sin la influencia del coagulante.

En la Figura 1 se muestran los detalles del equipo. Se trata de una cuba de vidrio cilíndrica de unos 15 litros de capacidad a la que se le adapta un sistema que permite realizar un intercambio calórico en forma eficiente sin agitación. Esto se logra colocando dentro de la tina una serie de serpentines construidos en tubos de vidrio, de fácil limpieza, dispuestos en forma paralela a unos 8 cm de distancia entre sí.

Figura 1

Equipo para elaboraciones casearias con inactivación de la enzima coagulante



Para enfriar y mantener baja la temperatura, circula agua a 4,5 °C por el interior de los serpentines, proveniente de un tanque pulmón asistido por un equipo de frío. Para calentar la leche se hace circular agua a 38 °C que proviene de otro tanque pulmón mantenido con un baño termostático. Tanto para calentamiento como para enfriamiento, el agua se impulsa por una bomba de caudal variable.

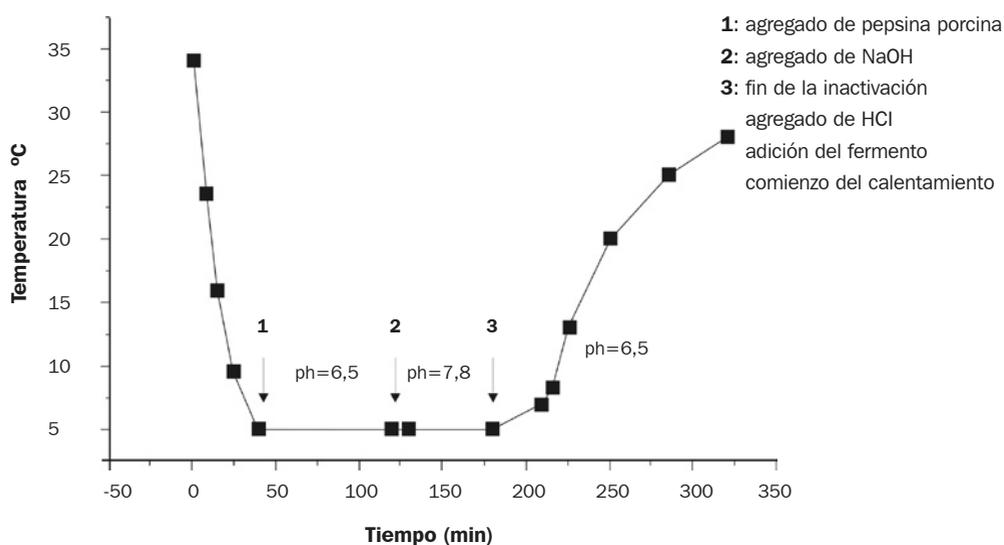
Los serpentines pueden ser fácilmente retirados de la tina para una prolija limpieza del conjunto.

El proceso operativo del equipo comienza con el llenado de la tina con unos 15 litros de leche, la cual es enfriada a 5 °C por circulación de agua helada a través de los serpentines. Se agregan luego 0,5 g de pepsina porcina disuelta en buffer acético-acetato de pH 5,5. Se agita el sistema para homogeneización y se mantiene a 5 °C durante 80 minutos, a fin de que se lleve a cabo la fase primaria de la coagulación. Transcurrido ese tiempo, se agrega solución de NaOH al 20 % (p/p) en cantidad suficiente para hacer ascender el pH hasta 7,8, manteniéndose en esas condiciones durante 45 min, a fin de que se produzca la desnaturalización de la pepsina. A continuación se adiciona una solución de HCl al 10 % (v/v) en cantidad suficiente para alcanzar un pH de 6,5, procediéndose a la adición del fermento correspondiente cuando el pH

alcanza el valor de 7,0. Finalmente, se produce el calentamiento del sistema haciendo circular agua caliente por los serpentines. Durante el ascenso de la temperatura se va produciendo la fase secundaria de la coagulación en la masa de la leche, formándose el gel típico. Cuando se adquiere la consistencia deseada se retira el sistema de intercambio de calor, se lira la cuajada y se continúa con la elaboración en forma normal. En la Figura 2 puede observarse la evolución temperatura-tiempo para la elaboración descrita.

Figura 2

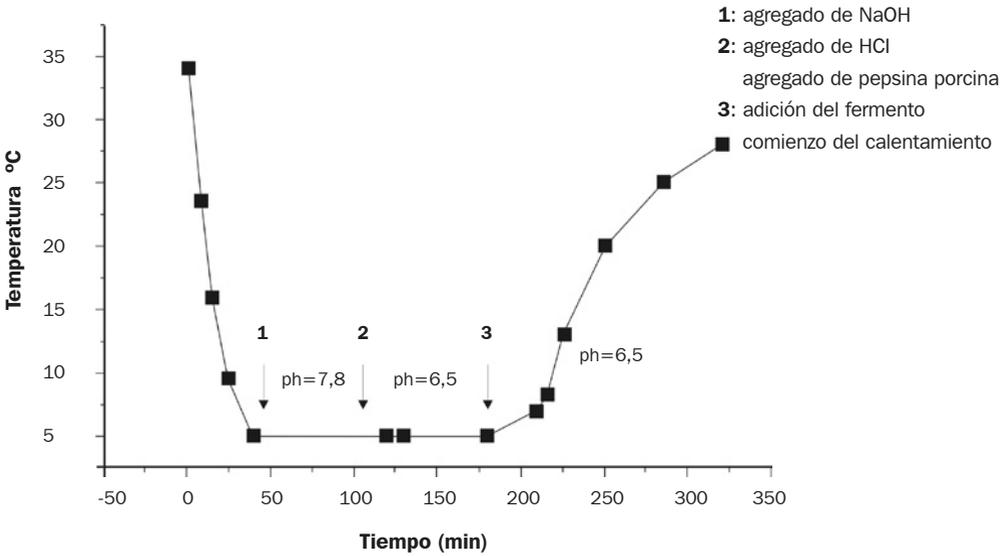
Evolución temperatura/tiempo para elaboraciones con enzima coagulante inactivada (Hynes, 1998)



El mismo equipo puede utilizarse para llevar a cabo elaboraciones normales que pueden servir como controles. En este caso, una vez que la leche se enfría a 5 °C se la alcaliniza con NaOH hasta pH 7,8 y se mantiene en esas condiciones durante 45 min. A continuación y, previa incorporación del fermento láctico como en el caso anterior, se agrega el ácido hasta pH 6,5. Finalmente se adiciona la pepsina y se comienza el calentamiento, procediéndose luego en forma idéntica al caso anterior. De esta forma se elabora un queso con el coagulante activo pero con una leche que ha sufrido un proceso similar al del queso experimental. La evolución temperatura-tiempo para esta última experiencia puede verse en la Figura 3.

Figura 3

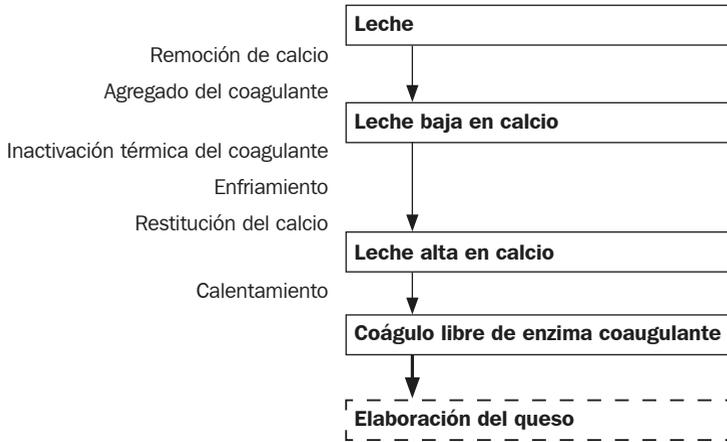
Evolución temperatura/tiempo para una elaboración con coagulante activo (Hynes, 1998)



Otro sistema para la obtención de cuajadas libres de enzima coagulante consiste en hacer actuar el coagulante sobre leche a la cual se le ha reducido el contenido de calcio iónico. Posteriormente, la enzima se inactiva por medio de una pasteurización a 72 °C durante 20 segundos, a lo que sigue un enfriamiento a 5 °C y la restitución del calcio iónico. Se finaliza con un calentamiento sin agitación hasta unos 36 °C, durante el cual se produce la coagulación. La Figura 4 esquematiza las diferentes etapas de este proceso (Visser, 1976).

Figura 4

Representación esquemática de las etapas de tratamiento de la leche para la obtención de un coágulo libre de enzima coagulante (Visser, 1976)



b- Inactivación de la proteasa nativa de la leche (plasmina)

La participación que le cabe a esta enzima en el proceso de maduración de quesos generalmente se establece por métodos indirectos, utilizando sistemas en los que se han inhibido los otros equipos enzimáticos, provenientes del coagulante, del fermento o de las bacterias de contaminación. La determinación de su rol en forma directa es bastante complicada, ya que su inactivación por calor no parece posible debido a que resiste aun las condiciones de esterilización. Se han mencionado algunos inhibidores químicos tales como los inhibidores de la tripsina (semilla de soja, clara de huevo, calostro, etc.), cobre, zinc, mercurio y el ácido α -amino butírico, pero al presente no han sido publicados trabajos en los que se utilicen estos elementos.

c- Eliminación de las enzimas provenientes del fermento láctico

Para lograr este objetivo es necesario no adicionar fermento primario a la elaboración. Sin embargo, ello no puede hacerse en una elaboración normal, ya que la actividad primaria de acidificación que lleva a cabo el fermento es necesaria para el correcto trabajo de la cuajada en la tina. Este rol resulta fundamental para el secado adecuado del grano.

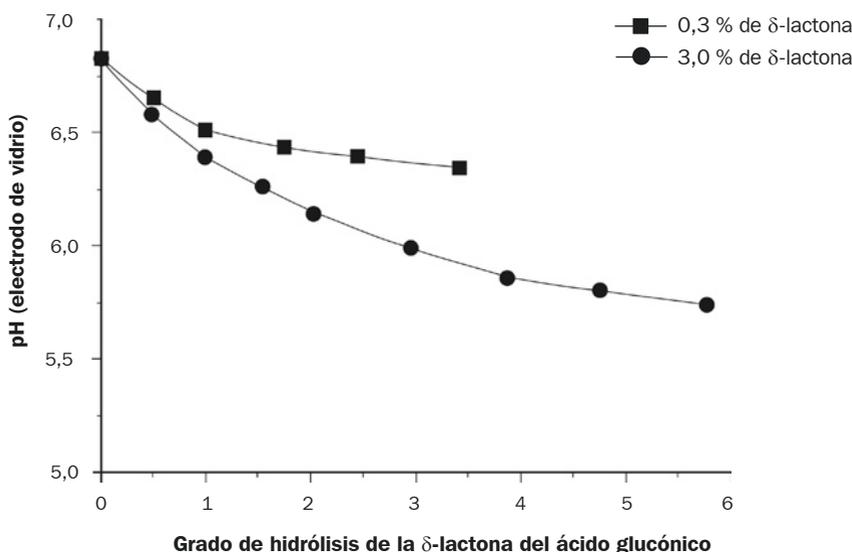
A fin de conseguir una acidificación artificial por vía química que sustituya al fermento láctico se ha recurrido al empleo de la δ -lactona del ácido glucónico (DLG). Se trata de una molécula natural obtenida de la cristalización del ácido

glucónico, el que a su vez se obtiene por fermentación de la glucosa. Químicamente la DLG es un éster interno del ácido glucónico y su característica principal es la de hidrolizarse lentamente en solución acuosa a ácido glucónico, de acuerdo con una cinética que depende del pH, de la temperatura y de una constante de equilibrio (Giraffa y Olivari, 1992).

La liberación progresiva de hidrogeniones por la DLG permite una acidificación gradual de la leche *in situ* similar a la que realiza un fermento láctico y conduce, si es lo suficientemente extensiva, a la formación de un coágulo homogéneo. En la Figura 5 puede observarse la evolución del pH en leche adicionada con distintas cantidades de DLG.

Figura 5

Evolución del pH en leche adicionada con distintas cantidades de δ -lactona del ácido glucónico (DLG)



De esta forma, la DLG ha prestado una gran utilidad en la elaboración de quesos sin la intervención de fermentos lácticos, permitiendo indirectamente la interpretación del rol que estos últimos juegan en la maduración.

Esta propiedad de la DLG ha sido explotada como regulador de pH en la fabricación de algunos quesos como el Crescenza y la Mozzarella, ya que su

uso disminuye los problemas de demoras en la acidificación láctica por parte de los fermentos debida a bacteriófagos o antibióticos presentes en la leche (Giraffa y Olivari, 1992).

d- Eliminación de los microorganismos de contaminación

Además de los microorganismos aportados por el fermento láctico durante la elaboración de quesos se incorporan otros provenientes de distintas fuentes, tales como la leche cruda y el ambiente de la quesería. Estos microorganismos se incluyen en una forma no controlada y constituyen una flora muy diversa; algunos son perjudiciales, como las bacterias coliformes, los hongos y las levaduras. Otros han recibido últimamente una gran atención por parte de los investigadores ya que se les atribuye un rol importante en la maduración, sobre todo en quesos elaborados con leche cruda. Este grupo recibe en general el nombre de bacterias lácticas no provenientes del fermento (NSLAB).

Como es lógico, los equipos enzimáticos que aportan estas bacterias también tienen una función en el proceso general de maduración de quesos. Si se encara un estudio en el que no se desea su participación, es necesario evitar su presencia.

Para esto se debe trabajar en condiciones de total asepsia, tanto en lo referente a la leche utilizada como materia prima como al equipo de elaboración y a los aditivos que son agregados.

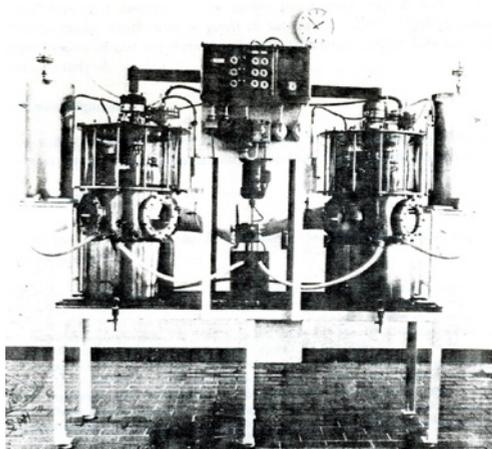
Si bien es tecnológicamente imposible elaborar quesos con leche esterilizada, ya que la misma no coagula enzimáticamente, se puede obtener leche con una carga de microorganismos muy baja llevando a cabo un ordeño en condiciones de estricta higiene. Si este producto es posteriormente pasteurizado, puede asegurarse en el mismo una carga microbiana realmente baja.

Para procesar este tipo de leche han sido desarrollados equipos de laboratorio que permiten un trabajo totalmente aislado del medioambiente, así como la incorporación de coagulante y fermentos en condiciones de estricta esterilidad. Uno de estos aparatos ha sido detalladamente descrito por Kleter (1975).

El equipo consiste en dos tinas idénticas, totalmente cerradas, equipadas con liras y agitadores, de una capacidad de 40 L cada una. Las tinas pueden ser esterilizadas a 120 °C durante 20 min y todo lo requerido durante el proceso de elaboración ya está incluido en las tinas antes de la esterilización, o bien puede ser agregado asépticamente durante el proceso. La Figura 6 muestra un esquema de este equipo.

Figura 6

Equipo para elaboraciones de quesos en condiciones asépticas (Kleter, 1975)



Métodos de incubaciones *in vitro*

Básicamente consisten en poner en contacto los equipos enzimáticos responsables de la maduración, en forma aislada, con distintos tipos de sustratos durante un tiempo determinado y en condiciones preestablecidas de temperatura, pH, concentraciones, etc.

Como sustratos se pueden utilizar tanto la caseína entera como las distintas fracciones de la misma, si lo que se desea estudiar es la acción proteolítica; o bien manteca, tributirina, distintos lípidos o ácidos grasos libres, si lo que se quiere analizar es la capacidad lipolítica o de transformación de los ácidos grasos.

Por medio de estas metodologías se ha estudiado, por ejemplo, la acción de distintos coagulantes de leche sobre las fracciones de la caseína, habiéndose establecido con toda claridad los sitios de ataque en las diversas secuencias aminoacídicas. Sin embargo, y como ya se puntualizó anteriormente, no todos los sitios de ataque reconocidos en los estudios *in vitro* han podido ser confirmados en queso. Las diferencias entre los resultados encontrados en ambos tipos de estudio se deben fundamentalmente a la organización en micelas que las caseínas mantienen en el queso, lo que evidentemente hace que los sitios de ataque no tengan la misma disponibilidad que en las caseínas aisladas.

Un caso similar ocurre cuando la lipólisis se analiza por medio de incubaciones en sustratos artificiales. Aun cuando para este caso se utilice la grasa de leche en forma de manteca, la estructura que poseen los glóbulos grasos

en esta última difiere sustancialmente de la original que presentan en la leche, diferencia que se acentúa cuando se usa la tributirina como sustrato.

De cualquier manera, estos sistemas presentan la ventaja de su rapidez y sencillez, que contrasta notoriamente con los descritos anteriormente, y sus resultados constituyen una buena primera aproximación a un tema tan complejo en el que los indicios iniciales son de notoria importancia.

Lechadas y pastas de queso

Estos métodos se basan en la preparación de un producto semilíquido que contiene entre un 60 y un 70 % de humedad, lo que se logra mezclando cuajada fresca con agua y distintos niveles de sal. Se procede luego a la incubación de la mezcla a temperaturas que por lo general son tan altas como 30° a 35 °C. De esta forma, los elevados niveles de humedad y temperatura producen una “maduración” acelerada, durante la cual se llevan a cabo los cambios químicos y enzimáticos en tiempos cortos.

Después de preparada, la lechada semilíquida puede someterse a tratamientos térmicos, por ejemplo a 80 °C durante 3 min, de manera de obtener un sustrato libre de bacterias y enzimas al que puede agregarse el equipo enzimático que se desea estudiar. De esta forma se han analizado diferencias en las capacidades proteolíticas de diferentes especies de bacterias lácticas no provenientes del fermento (NSLAB).

Estos métodos, sin embargo, tienen muchas desventajas. En primer lugar, las temperaturas de incubación y la elevada humedad son factores propicios para que se desarrollen contaminaciones indeseables que enmascaran totalmente el resultado que se desea obtener. Por esta causa, en algunos casos se han agregado conservadores, sobre todo para prevenir el desarrollo de hongos y levaduras, pero esta práctica puede también inhibir el desarrollo de los equipos enzimáticos que desean ser estudiados. Por otra parte, el producto resultante no tiene el cuerpo, la textura y la actividad acuosa del queso real, por lo que los datos obtenidos con estos sistemas pueden no ser iguales a los de un queso real y por lo tanto deben ser manejados con las reservas del caso (Dulley, 1976).

En otros casos, en lugar de utilizar cuajadas, estas lechadas se preparan en forma artificial utilizando fosfocaseinato nativo de calcio, coagulante de leche, grasa anhidra desodorizada, leche en polvo, sal y agua (Jang y Lee, 1985). El desarrollo de acidez se simula en estos casos con la adición de α -lactona del ácido glucónico. De esta forma se obtiene una base a la cual pueden luego agregarse los agentes de maduración cuyo estudio se quiere llevar a cabo.

Quesos miniatura

Este sistema consiste en la elaboración de pequeños quesos de 20 a 40 g, con equipamiento a escala de laboratorio, realizándose la separación de la cuajada

del suero por centrifugación. Tiene la ventaja de que pueden hacerse varios quesos simultáneamente, lo que permite el estudio de numerosas variables en un tiempo relativamente corto y, por otra parte el producto resultante es totalmente similar al queso elaborado en escala normal (Hynes y col., 2000a).

Con este sistema se estudió la influencia de diversas cepas de *Lactococcus lactis* sobre la maduración del queso Cheddar. También se ha demostrado que por este medio puede ser estudiada la influencia de la enzima coagulante, elaborando quesos en los cuales ha sido inactivada por el agregado de pepstatina, un potente inhibidor de aspartil proteasas (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001).

Se ha desarrollado asimismo un protocolo para la elaboración de quesos miniatura tipo Saint Paulin, un producto de pasta lavada, con el objeto de estudiar la influencia de diversas cepas de *Lactobacillus* como flora secundaria (Hynes y col., 2000a).

Se considera que este sistema de quesos miniatura es el más apropiado para el estudio de la influencia sobre la maduración de los distintos equipos enzimáticos, debido a su bajo costo y la posibilidad de llevar a cabo varias experiencias en forma simultánea. En contrapartida a estas ventajas aparece el hecho de que la difusión del agua y de la sal no serían las mismas que en un queso natural, como tampoco la velocidad de enfriamiento de la cuajada, hechos que son de mucha importancia en los quesos duros. Por eso el estudio de la maduración de este último tipo de queso es aún dificultoso, debido a que no puede lograrse un sistema que reemplace al original.

Métodos para el estudio de la lipólisis y de los metabolismos de la lactosa y del lactato

Como ya se indicó en el ítem anterior, la lipólisis puede ser estudiada por medio de incubaciones *in vitro*. Sin embargo, y debido al hecho de que los agentes responsables de las transformaciones de la materia grasa no son por lo general los equipos enzimáticos más comúnmente hallados en quesos, cuando un agente verdaderamente lipolítico está presente es fácilmente identificable y por lo tanto se puede evaluar su forma de acción.

Para aclarar mejor este concepto véase por ejemplo el caso del queso Roquefort. Este producto presenta profundas transformaciones de la materia grasa que conducen a la formación de considerables cantidades de ácidos grasos libres y productos de su ulterior transformación. Estos cambios son indudablemente producto de la acción del fuerte equipo lipolítico que posee el hongo *Penicillium roqueforti*, que se usa en su preparación. Otro caso es el del queso Provolone picante, en donde la acción lipolítica se debe a las lipasas presentes en el estómago de cabrito utilizado como coagulante.

De esta manera, el proceso de lipólisis puede ser estudiado directamente en los quesos normales sin que sobre los mismos se deban hacer elaboraciones especiales, ya que resulta poco probable que dos o más equipos lipolíticos de esta magnitud operativa se hallen presentes en forma simultánea.

En lo que respecta al metabolismo de la lactosa puede decirse algo similar a lo mencionado para lipólisis, ya que los cambios primarios de conversión de dicho azúcar en ácido láctico, sea de modo homo o heterofermentativo, son atribuidos a las bacterias lácticas del fermento, microorganismos que dominan el medio en las primeras etapas de la elaboración del queso. De la misma manera, la formación de ácido propiónico a partir del lactato es debida únicamente a las bacterias propiónicas.

Análisis para el estudio de la maduración

Los métodos descritos anteriormente permiten llevar a cabo o anular selectivamente, en una u otra forma, la acción de los distintos equipos enzimáticos sobre los sustratos presentes en el queso durante la etapa de maduración. A fin de seguir la evolución de la misma, durante esta etapa se realizan controles que dan como resultado una serie de muestras, en las que están presentes productos de demolición o transformación originados a partir de los componentes iniciales: proteínas, materia grasa y lactosa, y cuya cantidad y calidad es necesario evaluar analíticamente (McSweeney y Fox, 1993). A continuación se detallan estos análisis, agrupando los mismos según se trate de evaluar la proteólisis, la lipólisis o la glicólisis.

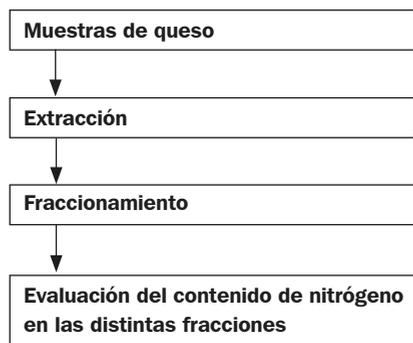
Análisis para la evaluación de la proteólisis

Estudio del contenido de distintas fracciones nitrogenadas en quesos

Se trata de una de las formas más antiguas para el seguimiento de la proteólisis en quesos. Básicamente consiste en realizar, en primer lugar, una extracción de los productos solubles presentes en las muestras por medio de distintos solventes. El extracto puede ser luego fraccionado en distintas partes, conteniendo cada una de ellas compuestos que se clasifican más o menos aproximadamente por su peso molecular. Por último se lleva a cabo una evaluación de la cantidad de nitrógeno presente en cada fracción, utilizando por lo general el método de Kjeldahl (FIL-IDF, 1999). El esquema general del procedimiento se ilustra en la Figura 7.

Figura 7

Esquema general del proceso de extracción y fraccionamiento de nitrógeno en muestras de queso



Si bien actualmente han aparecido técnicas más avanzadas, prácticamente en todas ellas es necesario llevar a cabo en primer lugar las etapas de extracción y fraccionamiento, por lo cual las mismas conservan actualmente su vigencia y son continuamente puestas al día por medio de los boletines de la Federación Internacional de Lechería (FIL).

Como líquidos de extracción y fraccionamiento han sido utilizados agua y una amplia gama de soluciones acuosas, tales como citrato de sodio 0,5 M, cloruro de sodio al 5 %, ácido tricloroacético (TCA) al 2, 5, 10 y 12 %, ácido fosfotúngstico al 5 %, ácido sulfosalicílico al 2,5%, buffers de pH 4,4 a 4,6, ácido pícrico, etanol al 70%, mezclas de etanol y acetona y de cloroformo y metanol, etc.

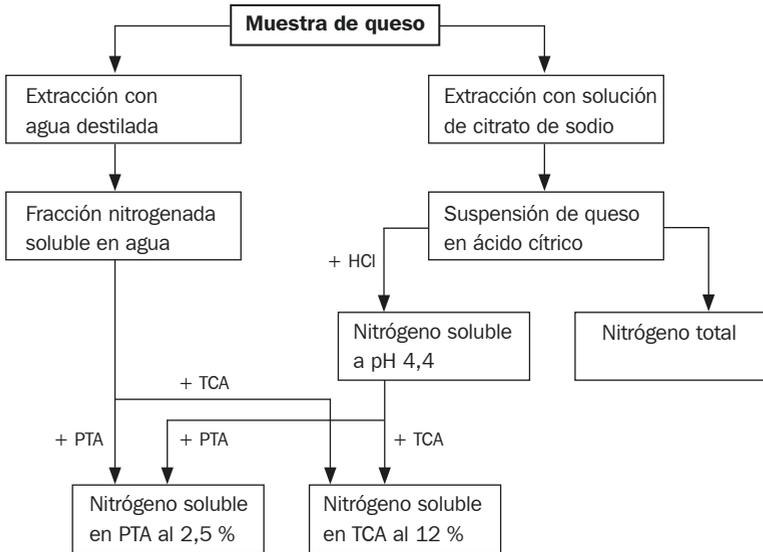
Por otra parte, los esquemas de extracción y fraccionamiento propuestos por los distintos investigadores que han trabajado en el tema de maduración de quesos son numerosos, lo que ha complicado la tarea de realizar comparaciones de los resultados obtenidos a través de los distintos sistemas. Por lo tanto, la tarea de estandarizarlos es de suma importancia y de difícil realización.

En el boletín N° 337 (FIL-IDE, 1999) la FIL recomienda realizar la extracción con agua o bien con solución de citrato de sodio, llevando la mezcla a un pH cercano a 4,4 en este último caso. En ambos casos el fraccionamiento posterior de los extractos solubles obtenidos se lleva a cabo primero con TCA al 12 % y luego con PTA al 2,5 %. En el citado boletín se describen en forma detallada las técnicas analíticas correspondientes y se discuten las diferencias entre los dos métodos, que en líneas generales resultan poco significativas.

En la Figura 8 se ilustran en forma esquemática los procesos aconsejados, con las distintas fracciones que se obtienen de ellos.

Figura 8

Obtención de distintas fracciones de nitrógeno en quesos



No resulta muy sencillo establecer un rango de peso molecular para los compuestos nitrogenados presentes en cada fracción, aunque es evidente que a medida que se utilizan agentes precipitantes más energéticos las sustancias que quedan en solución tienen pesos moleculares menores. Hay que tener en cuenta sin embargo, que la solubilidad de los péptidos no es sólo función de su tamaño sino que también juegan un importante rol en este aspecto otras propiedades de los mismos, como ser su grado de hidrofobicidad y la capacidad de producir interacciones electrostáticas con el reactivo precipitante.

No obstante estas consideraciones, en líneas generales se puede establecer que la fracción soluble en agua o en solución de citrato de sodio a pH 4,4 está compuesta principalmente por péptidos de 30 a 35 aminoácidos. La fracción soluble en TCA al 12 % está formada a su vez por péptidos de 2 a 22 aminoácidos, mientras que la fracción soluble en PTA al 2,5 % está constituida mayoritariamente por aminoácidos y péptidos muy pequeños, de peso molecular de hasta 600 Daltons (FIL-IDF, 1999).

El residuo insoluble a pH 4,4 o en agua está compuesto por las caseínas nativas que permanecen sin degradar y por los grandes péptidos productos de la acción del coagulante de leche o de la plasmina, como lo son los $\alpha_{s1}I$, γ_1 , γ_2 y γ_3 .

Debido a que cada una de las fracciones antes definidas contiene los compuestos nitrogenados de la fracción decreciente que sigue, con el fin de

estrechar los rangos y de identificar mejor los productos que cada fracción contiene se realizan una serie de definiciones basadas en sus diferencias. Es así como se tiene:

- *nitrógeno caseínico* = nitrógeno total – nitrógeno soluble a pH 4,4;
- *nitrógeno de grandes péptidos* = nitrógeno soluble a pH 4,4 – nitrógeno soluble en TCA al 12 %;
- *nitrógeno de pequeños péptidos* = nitrógeno soluble en TCA al 12 % – nitrógeno soluble en PTA al 2,5 % y
- *nitrógeno de aminoácidos* = nitrógeno soluble en PTA al 2,5 %.

Técnicas analíticas

a- Evaluación del contenido de nitrógeno: método de Kjeldahl

El método de Kjeldahl se ha utilizado y se utiliza en la actualidad para determinar el contenido de nitrógeno. Las dificultades que el mismo presenta son bien conocidas y se refieren fundamentalmente a su laboriosidad y lentitud, que se tornan particularmente importantes cuando debe ser procesada una gran cantidad de muestras. En contraposición, presenta la ventaja de ser un método de referencia y que por lo tanto aporta resultados sumamente confiables (Bütkofer y col., 1993; Bernal y col., 2001).

En la bibliografía se encuentran numerosas referencias de métodos alternativos, propuestos para reemplazar total o parcialmente al de Kjeldahl, pero ninguno ha alcanzado una difusión importante. Entre ellos se pueden citar la determinación del contenido de triptofano y tirosina por absorción a 280 nm, la precipitación de proteínas y péptidos por colorantes tales como el amido black y el orange G, y los métodos de determinación de grupos amino libres.

En nuestro laboratorio se desarrolló una metodología rápida y de notable precisión para la determinación de proteínas y fracciones nitrogenadas en leche y productos lácteos (Bernal y col., 2000). Como en la metodología clásica de Kjeldahl, el método se fundamenta en un proceso de digestión con formación de amonio y su posterior cuantificación. El proceso de digestión se optimizó para una técnica semimicro rápida, utilizando como catalizador dióxido de titanio, que es tan eficaz como los catalizadores clásicos y además de probada inocuidad. Para la evaluación del amonio se utilizó un método colorimétrico adaptado de un equipo comercial de bajo costo y alta estabilidad basado en la clásica reacción de Berthelot. Los resultados se compararon estadísticamente con el método convencional de destilación y no se hallaron diferencias significativas.

Sin embargo, el método de Kjeldahl ha cobrado nuevo impulso dado que en la actualidad se cuenta con equipamiento que realiza en forma automatizada las etapas de destilación y titulación, lo que permite procesar numerosas muestras en poco tiempo.

b- Electroforesis

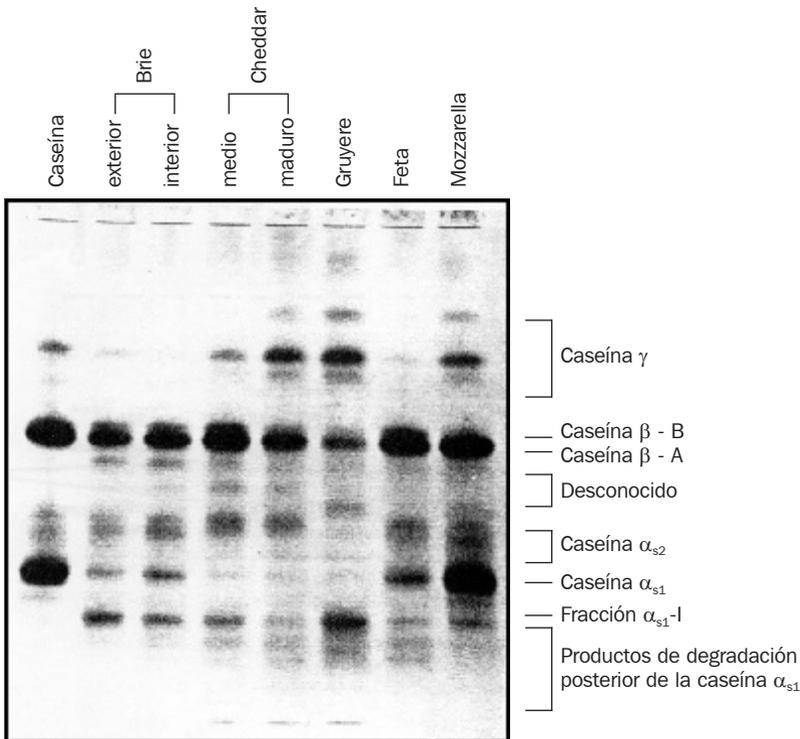
Los métodos electroforéticos han sido utilizados desde hace mucho tiempo para evaluar la denominada proteólisis primaria de las caseínas, o lo que es lo mismo, para estudiar los cambios que se producen durante la maduración de quesos en la fracción insoluble a pH 4,4 (Shalabi y Fox, 1987).

El boletín N° 261/1991 de la FIL (Creamer, 1991) ofrece una muy buena revisión de estos métodos, tanto de los primitivos como de los que son utilizados actualmente.

La evolución de los métodos electroforéticos parte del papel como medio de soporte y pasando por los geles de almidón llega a los actuales de poliacrilamida con el agregado de urea en medio alcalino, reactivo que disocia la micela caseínica en sus componentes, en la llamada urea-PAGE (Trieu-Cout y Gripon, 1983; Weckx y Vanderpoorten, 1973). En la Figura 9 se observa un ejemplo de corrida urea-PAGE en medio alcalino para distintos tipos de quesos, en la que puede apreciarse la posición que ocupan en el gel tanto las caseínas intactas como los productos de su degradación primaria.

Figura 9

Electroforesis Urea-PAGE en medio alcalino para distintos tipos de quesos (Creamer, 1991)



Las versiones con el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y la electroforesis bidimensional no han sido aplicadas en gran extensión a la maduración de quesos, ya que las mismas son de realización más compleja y no ofrecen ventajas claras con respecto a la urea-PAGE (Weber y Osborn, 1969; O'Farrel, 1975).

La focalización isoelectrica, que utiliza un gel en el cual se genera un gradiente de pH por acción de reactivos denominados anfólitos, es útil en la identificación de variantes genéticas de las caseínas, como consecuencia de su alto poder de resolución. Este alto poder de resolución es debido a que cuando una proteína llega al punto de su pH isoelectrico, se fija en él y no corre más por ausencia de cargas eléctricas (Righetti, 1977; Jonsson y Fredriksson, 1978).

A fin de poder conservar los resultados de la electroforesis en el tiempo se hace necesario en primer lugar conservar los geles de corrida. Para ello existen varias técnicas, que incluyen el secado de los mismos, el sellado por calor entre láminas plásticas y el almacenamiento en cubetas plásticas conteniendo soluciones ácidas diluidas. Esta última forma aparece como la más conveniente, debido a que los geles se conservan en su estado natural sin ser sometidos a procesos que pueden cambiar su apariencia original.

El fotografiado de los geles permite la conservación indefinida de las imágenes y la difusión de las mismas en forma impresa. Debe prestarse especial atención a la técnica y a la película fotográfica a usarse a fin de lograr una reproducción lo más fiel posible del original.

Muchas veces se ha tratado de realizar la cuantificación de las bandas electroforéticas con la finalidad de conocer el nivel de degradación de las caseínas, pero siempre se ha arribado a la conclusión de que la electroforesis es una metodología analítica fundamentalmente cualitativa, y que las conclusiones de orden cuantitativo que de ella pueden obtenerse siempre poseen un considerable margen de duda.

Algunos de los métodos usados para la cuantificación se basan en la extracción del colorante contenido en cada banda y la lectura colorimétrica de la solución resultante, y otros, los más comunes, se basan en la densitometría, o sea la lectura directa de la densidad de color por medio de equipos que la llevan a cabo a determinadas longitudes de onda, con lo que se obtiene un trazado parecido a un cromatograma. El uso de estándares internos ha sido propuesto con el objeto de mejorar las lecturas cuantitativas.

Actualmente parecen abrirse nuevas perspectivas para la cuantificación de los geles de electroforesis a través de los equipos basados en la tecnología de análisis de imágenes.

c- Electroforesis capilar

Esta técnica es relativamente nueva y aparece con un futuro promisorio en el campo de la química de los alimentos (Gouldsworthy y col., 1999; Miralles y col., 2000).

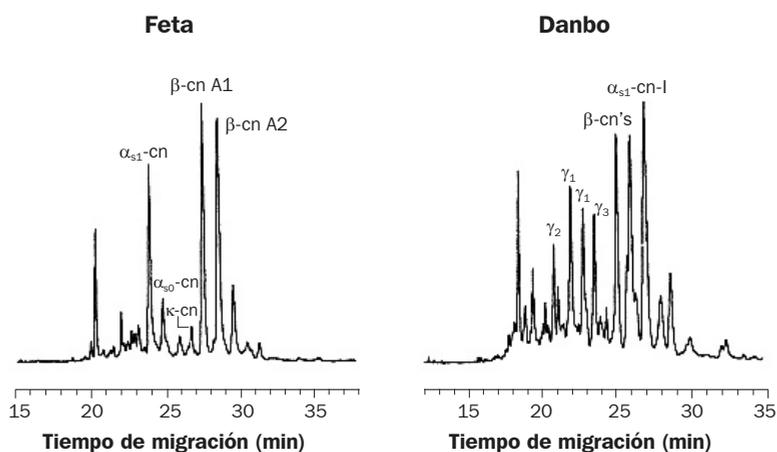
La electroforesis se lleva a cabo en un estrecho capilar de sílice fundida de 20 a 75 μm de diámetro interno recubierto externamente por una cobertura de poliamida a fin de proteger el interior durante la manipulación. La detección de la corrida se lleva a cabo en forma directa y continua por medio de un detector UV-Visible que realiza la lectura a través de una ventana que se forma sobre la pared de poliamida por quemado de una porción de la misma. Esta forma de lectura automatiza totalmente la técnica y hace posible que puedan ser procesadas varias muestras secuencialmente.

A diferencia de la electroforesis urea-PAGE, por medio de la electroforesis capilar es posible detectar pequeños péptidos y aminoácidos. Por otra parte, la forma de detección permite llevar a cabo interpretaciones cuantitativas con una precisión mucho mayor. El acople de un equipo de electroforesis capilar con un espectrómetro de masa permitiría llevar a cabo la caracterización de los distintos péptidos formados durante la maduración de quesos.

En la Figura 10 se muestran trazados obtenidos por electroforesis capilar para quesos Feta de seis meses y Danbo de 12 semanas.

Figura 10

Resultados obtenidos por electroforesis capilar para quesos Feta de seis meses y Danbo de 12 semanas (FIL-IDF, 1999)



En el boletín FIL-IDF N° 337 (FIL-IDF, 1999) se hallan descritas en detalle las variantes más comunes de la electroforesis capilar.

d- Cromatografía

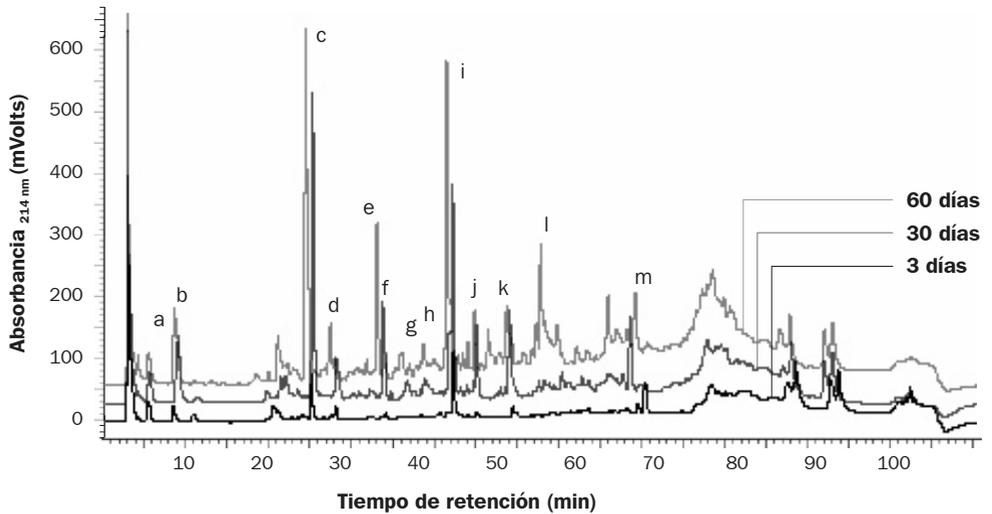
Se han aplicado numerosas técnicas cromatográficas a la separación y cuantificación de los péptidos producidos durante la maduración de quesos. En la actualidad, la que aparece con una tendencia creciente definida es la cromatografía líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC).

El principal problema asociado con este método es la identificación de los distintos péptidos que aparecen en cada cromatograma. Si bien para algunas variedades de quesos se han logrado caracterizar muchos de ellos, el problema general está bastante lejos de su total resolución. Los cromatogramas obtenidos a lo largo de la maduración para un mismo queso pueden, sin embargo ser una herramienta útil para caracterizar una determinada variedad, ya que en estos casos es más interesante la evolución de los péptidos en el tiempo que su identificación precisa.

Recientemente, Bergamini y col. (2005) han llevado a cabo el estudio de la proteólisis durante la maduración del queso Pategrás Argentino elaborado con un fermento de *Streptococcus thermophilus* y cultivos probióticos, mediante RP-HPLC. En la Figura 11 se muestran perfiles cromatográficos de los extractos solubles en agua de un queso elaborado con cultivo de *Streptococcus thermophilus* y bacterias probióticas a 0, 30 y 60 días de maduración. Los caracteres “a” a “m” indican los picos que fueron seleccionados para su estudio.

Figura 11

Perfiles peptídicos por cromatografía en fase reversa del extracto soluble de quesos elaborados con un cultivo de *Streptococcus thermophilus* y el agregado de lactobacilos probióticos, a 0, 90 y 180 días de maduración



Las letras **a a m** indican los picos seleccionados para el análisis por componentes principales

e- Determinación de aminoácidos

Los aminoácidos liberados durante la maduración de quesos fueron analizados inicialmente por métodos individuales para cada uno de ellos. Posteriormente se desarrollaron análisis por cromatografía gaseosa. Actualmente, los métodos que aparecen como los de mejores resultados son la cromatografía de intercambio iónico y la RP-HPLC, los cuales son recomendados por la FIL.

Análisis para la evaluación de la lipólisis

Los métodos analíticos para la evaluación de la lipólisis durante la maduración de quesos han sufrido últimamente cambios de importancia. Hasta no hace mucho los parámetros utilizados para este fin estaban basados en la determinación de índices y constantes químicas y fisicoquímicas. Es así como se definía el índice de acidez de la materia grasa en función de la cantidad de álcali que era gastado en la neutralización de la materia grasa extraída del queso, o los índices de Reichert Meissl y Polenske. Estos métodos daban sólo

una idea cualitativa del proceso de lipólisis, pero nada informaban acerca de la cantidad y calidad de cada uno de los ácidos grasos liberados.

Actualmente, el mayor interés se ha dirigido hacia las técnicas analíticas a emplearse con la finalidad de determinar la composición acídica total de la materia grasa, la identificación de los ácidos grasos libres totales y volátiles, y el nivel de degradación oxidativa de los ácidos grasos (Bernal y col., 1998).

Estos métodos comprenden en general la extracción de la materia grasa del queso, eventualmente la hidrólisis de la misma para la obtención de todos los ácidos grasos en forma libre o bien la separación solamente de aquellos que hayan sido liberados por lipólisis en el queso y, finalmente la cuali y cuantificación de los ácidos grasos libres, solos o como ésteres etílicos, por cromatografía gaseosa.

La valoración de los productos de degradación oxidativa de los ácidos grasos es relativamente reciente y aún no existen métodos totalmente estandarizados para este fin. Esta situación se debe fundamentalmente a la gran variedad de compuestos posibles de ser formados a partir de los ácidos grasos liberados. Los compuestos carbonílicos como las cetonas, las lactonas y las metil cetonas han sido valorados por métodos propuestos para queso Cheddar (Collins y col., 2003).

Análisis para la evaluación de los productos de transformación de la lactosa y del citrato

Los sustratos y productos tales como la lactosa, D- y L-lactato pueden ser cuantificados por ensayos enzimáticos, los que han desplazado casi totalmente a otros métodos. A la reacción enzimática le sigue una cuantificación espectrofotométrica de los productos. Estos métodos son, por otra parte, los únicos que pueden diferenciar el D-lactato del L-lactato.

El ácido acético también puede ser cuantificado por métodos enzimáticos.

El citrato puede ser evaluado tanto por métodos químicos como enzimáticos.

El diacetilo ofrece diversas alternativas para su determinación por medio de extracción por destilación en corriente de vapor y reacción con diversos reactivos para formar compuestos coloreados.

También se ha descrito un método por cromatografía gaseosa para la evaluación de ácido acético, acetona y 2-3 butilenglicol, meso y racémico (McSweeney y Fox, 2004).

El propionato, compuesto de sumo interés en los quesos suizos elaborados con bacterias propiónicas, puede determinarse por cromatografía gaseosa (Fox y col., 1993).

Determinaciones de compuestos de aroma y sabor

Las características de aroma y sabor de los quesos, de acuerdo con lo establecido en la teoría del balance de componentes, no están determinadas por la presencia de ciertos compuestos como se creyó en un principio sino por una serie definida de reacciones que da lugar a la formación de un gran número de especies químicas en concentraciones perfectamente proporcionadas. En este sentido, cada tipo de queso posee una característica propia, lo cual constituye en gran manera el hecho que diferencia una variedad de otra.

Estos compuestos son el resultado de las transformaciones de los últimos productos derivados tanto de las caseínas como de los triglicéridos, la lactosa y el citrato, o sea aminoácidos libres, ácidos grasos libres, y D- y L-lactato. En la bibliografía pueden hallarse datos para ciertos tipos particulares de quesos como el Cheddar, Parmigiano Reggiano y otros (Engels y col., 1997; McSweeney y Sousa, 2000; Lecanu y col., 2002; Qian y Reineccius, 2002; Tavaría y col., 2002).

Debido a la gran cantidad de productos relacionados con el aroma y sabor que pueden formarse, a lo que se agrega el hecho de que algunos de ellos se hallan en cantidades sumamente pequeñas, la cual y cuantificación de los mismos es una tarea complicada.

El primer paso consiste generalmente en una extracción del queso molido o rallado, que se efectúa con agua o con distintos solventes. Este primer extracto puede ser sometido a una destilación al vacío con la finalidad de eliminar los lípidos. Posteriormente se divide el destilado en fracciones ácidas, neutras y alcalinas para separar los compuestos extraídos en grupos más sencillos.

La cual y cuantificación propiamente dicha de los compuestos químicos se lleva a cabo por medio de distintas técnicas, principalmente cromatografía gaseosa y espectrometría de masa, asociadas con olfactometría, espacio de cabeza, "purge and trap" etc. (Qian y Reineccius, 2002 y 2003; Lecanu y col., 2002; Tavaría y col., 2002).

Acción de los agentes de maduración sobre los componentes del queso

Transformaciones de las proteínas

En esta parte se tratará la acción de los agentes vinculados con las transformaciones de las proteínas, incluyendo las enzimas coagulantes de la leche, la plasmina y los distintos tipos de microorganismos presentes en el queso (Fox, 1989; Visser, 1993; Fox y McSweeney, 1996).

Enzimas coagulantes de leche

a- Tipos comerciales de enzimas coagulantes

Las enzimas coagulantes que se utilizan en la industria láctea son proteasas que pueden tener diverso origen, de acuerdo con lo que se muestra en la Tabla 1. Entre ellas, la más estudiada es la quimosina, una enzima proteolítica que ha sido clasificada como proteasa ácida, de acuerdo con su pH óptimo de actividad. Sin embargo, una nomenclatura más rigurosa la registra como carboxil proteasa o aspartil proteasa, debido a los grupos específicos presentes en el sitio catalítico. La quimosina, que es la sustancia coagulante más tradicionalmente utilizada en la obtención de variedades de queso muy apreciadas, predomina en el cuajar de ternero mamón.

Tabla 1

Tipos de enzimas coagulantes de la leche

Origen vegetal	Origen microbiano	Origen animal	De fermentación
Látex de higuera	Proteasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	Quimosina de ternero	Quimosina producida por <i>Escherichia coli</i>
Látex de mamón	Proteasa de <i>Rhizomucor pusillus</i>	Cuajo de bovino adulto	Quimosina producida por <i>Kluyveromyces lactis</i>
Cardo	Proteasa de <i>Chryphonectria parasitica</i>	Pepsina de cerdo	Quimosina producida por <i>Aspergillus niger</i>
		Pepsina de pollo	
		Coagulante de cabrito o cordero en pasta	

Debido a la demanda creciente de coagulantes causada por el incremento de la producción de quesos y a una tendencia a disminuir la matanza de animales jóvenes, surgió en el mercado la necesidad de sustituir el coagulante de ternero mamón. Por este motivo, los investigadores dirigieron sus estudios hacia la obtención de sustitutos de este producto. Entre los más importantes de origen animal se pueden citar el coagulante de bovino adulto, que contiene pepsina en proporciones crecientes a medida que aumenta la edad del animal, y la pepsina porcina. Las proteasas ácidas de origen microbiano de uso más difundido son las provenientes de *Chryphonectria parasitica*, *Rhizomucor*

pusillus y *Rhizomucor miehei*. La primera ha sido dejada de usar en forma casi total por su elevado poder proteolítico, mientras que las otras dos se emplean preferentemente en quesos blandos.

Los sustitutos de la quimosina han sido aceptados de modo diferente según los países. Así, en Estados Unidos las enzimas microbianas y las mezclas de quimosina y pepsina porcina se han popularizado mucho. En la Argentina el coagulante más utilizado es sin duda el cuajo de bovino adulto, mientras que para las variedades francesas e italianas con denominación de origen, el único coagulante permitido es el de ternero mamón.

Otros coagulantes, como los de origen vegetal o la pepsina de pollo han tenido escaso éxito en su aplicación a gran escala. En la actualidad, solamente el queso Serra en Portugal es elaborado con un coagulante de origen vegetal.

El criterio más importante que se utiliza para la selección de un sustituto es que la relación coagulación/proteólisis sea comparable con la de la quimosina, ya que una proteólisis excesiva llevará a geles débiles y pérdida de material proteico y grasa durante la coagulación, además de acarrear problemas en el proceso de maduración. También se busca que las proteasas no sean mucho más termorresistentes que la quimosina, ya que pueden interferir en la maduración de los quesos de pasta cocida donde normalmente están presentes en cantidades reducidas. Asimismo, la presencia de estas enzimas activas puede generar inconvenientes en la utilización posterior de los sueros de quesería. Otro criterio de importancia es la estabilidad al pH que exhiben las diferentes proteasas. Entre ellas, la pepsina porcina es la más sensible; a valores de pH por encima de 6,7 comienza a desnaturalizarse. De todas maneras, la desnaturalización al pH de la leche puede considerarse como una ventaja, ya que disminuye el potencial proteolítico de la pepsina durante la maduración.

Los preparados en pasta usados en la elaboración de los quesos duros italianos Provolone y Sardo contienen una lipasa, la esterasa pregástrica, junto con la quimosina. La esterasa es segregada por una glándula en la base de la lengua, secreción que es estimulada durante la succión de la leche por la cría y de esta forma es arrastrada hacia el estómago. El animal, ternero, cordero o cabrito, es sacrificado luego de haber mamado. Su estómago con el contenido de leche es retirado y almacenado durante unos dos meses, para luego ser macerado y transformado en coagulante en pasta. Este producto posee la particularidad de otorgar a los quesos con él elaborados, un sabor picante característico.

Recientemente se han desarrollado por ingeniería genética microorganismos en los cuales ha sido clonado el gen que codifica la quimosina. Así, se pueden obtener cantidades ilimitadas de la enzima pura. Los quesos hechos con coagulante de ternero mamón y los elaborados con quimosina proveniente de microorganismos genéticamente modificados han sido comparados en diversos trabajos, sin encontrarse diferencias, excepto que el rendimiento quesero ob-

tenido es mayor cuando se utiliza este último tipo de coagulante. Su uso, sin embargo, no está autorizado en todos los países (Salvadori del Prato, 1998).

Los aspectos más importantes que se deben conocer de una enzima coagulante de leche son su actividad o tiempo de coagulación y su composición enzimática cuali y cuantitativa cuando se trata de mezclas.

La actividad coagulante normalmente se expresa como fuerza o título, cuya forma más difundida indica que es la cantidad de mililitros de leche que coagula un mililitro de coagulante en 40 minutos a 37 °C. Según esta definición, los productos líquidos normalmente tienen un título de 10.000 y los en polvo de 100.000. La FIL ha propuesto métodos más elaborados y precisos para este fin (FIL-IDE, 1992).

Para la determinación del título ha sido desarrollada una gran cantidad de métodos y equipos, siendo los más difundidos el visual de Berridge y el reológico de la Foss Electric (Huck y Zalazar, 1971/72; Meinardi y col., 2002).

Para la cuali y cuantificación de las enzimas presentes en productos mezcla han sido propuestas numerosas técnicas basadas en cromatografía, desnaturalización selectiva por pH, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, ELISA, etc. (Corradini y Zalazar, 1990).

b- Acción de las enzimas coagulantes sobre las caseínas en solución

La acción de la enzima coagulante sobre las caseínas está relacionada con el papel que juega esta proteasa durante la maduración del queso. En la elaboración en tina la hidrólisis de la caseína κ es el único fenómeno proteolítico de importancia que se verifica, ya que se produce a una velocidad mucho mayor que la hidrólisis de cualquier otra proteína de la leche. Posteriormente, la proteólisis llevada a cabo sobre las caseínas por el coagulante remanente en la cuajada ejerce un rol en la maduración cuya importancia depende de la variedad de queso.

Los sitios primarios de hidrólisis de cada caseína debida al coagulante han sido determinados en solución por incubación de la proteína y la enzima en condiciones variables de temperatura, pH, fuerza iónica, etc. Es necesario tener en cuenta estas condiciones así como el estado de agregación del sustrato (forma monomérica o polimérica, micelas compuestas por una única caseína, caseinato de sodio isoeléctrico, etc.), ya que se han observado variaciones entre los parámetros cinéticos y aún entre los péptidos obtenidos al modificarlas (Carles y Ribadeau Dumas, 1985; McSweeney y col., 1993b; Coker y col., 1999; Minkiewicz y col., 2000).

El sitio primario de hidrólisis de la caseína α_{s1} por la quimosina y otras enzimas coagulantes está bien determinado y es el enlace Phe₂₃-Phe₂₄. Este enlace se hidroliza para dar las fracciones 1-23 y 24-199, esta última llamada α_{s1} -I (Mulvihill y Fox, 1979). El péptido α_{s1} -I se detectó en todos los estudios

de la acción de coagulantes sobre caseína α_{s1} , en un amplio rango de pH y de concentraciones de NaCl. La especificidad de la quimosina sobre la caseína α_{s1} en solución se dirige hacia varios enlaces. Así, en buffer fosfato 0,1 M pH 6,5 se han identificado los sitios de ataque que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Sitios de ataque de la quimosina hacia la caseína α_{s1} en solución buffer 0,1 M fosfato pH 6,5 (Mulvihill y Fox, 1979)

Phe ₂₃ -Phe ₂₄	Leu ₁₄₉ -Phe ₁₅₀	Tyr ₁₅₉ -Pro ₁₆₀
Phe ₂₈ -Pro ₂₉	Phe ₁₅₃ -Tyr ₁₅₄	Trp ₁₆₄ -Tyr ₁₆₅
Leu ₄₀ -Ser ₄₁	Leu ₁₅₆ -Asp ₁₅₇	

A pH 5,2 en presencia de 5% de NaCl se hidrolizan además:

Leu ₁₁ -Pro ₁₂	Leu ₁₀₁ -Lys ₁₀₂	Phe ₁₇₉ -Ser ₁₈₀
Phe ₃₂ -Gly ₃₃	Leu ₁₄₂ -Ala ₁₄₃	

La hidrólisis en el enlace Phe₂₃-Phe₂₄ se ha observado en todas las condiciones ensayadas. Asimismo, incubando a pH 6,2 y 30 °C durante 3 horas fue la única verificada, ya que la curva de decrecimiento de la caseína α_{s1} y la de aparición del péptido α_{s1} -I fueron completamente simétricas (McSweeney y col., 1993b). La concentración del péptido menor resultante de este corte, el α_{s1} (f1-23), alcanza una meseta después de las 3 horas de hidrólisis a pH 6,5, y comienza a decrecer aproximadamente al mismo tiempo a pH 5,2, lo que indica que sufre una hidrólisis posterior en esas condiciones. Se ha observado que el péptido α_{s1} -I es aparentemente más sensible al ataque de la quimosina que la caseína α_{s1} intacta. Los perfiles de péptidos obtenidos por HPLC a pH 6,5 y 5,2 son similares, aunque al valor menor de pH aparecen varios péptidos más y la velocidad de hidrólisis de los enlaces es mayor. Se encontró que el sitio secundario de acción de la enzima sería el Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅. Los dos enlaces donde la hidrólisis es preferencial contienen residuos aminoácidos aromáticos a ambos lados.

En la caseína β el sitio primario de hidrólisis es el enlace Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃, aun-

que existen otros, como Ala₁₈₉-Phe₁₉₀, Leu₁₆₅-Ser₁₆₆, Gln₁₆₇-Ser₁₆₈, Leu₁₆₃-Ser₁₆₄, Leu₁₃₉-Leu₁₄₀ y Leu₁₂₇-Tyr₁₂₈, en orden decreciente de susceptibilidad según estudios realizados a pH 5,4 en buffer de acetato de sodio 0,05 M. Algunos de los péptidos resultantes de la hidrólisis de la caseína β , como los fragmentos C-terminales (f193-209) y (f190-209), son extremadamente amargos y han sido aislados a partir de quesos con esta característica.

Los principales fragmentos N-terminales identificados son β I, β II y β III, que representarían aproximadamente las fracciones 1-189/192, 1-163/165/167 y 1-127/139 respectivamente. La hidrólisis de la caseína β por el coagulante es mucho más lenta que la hidrólisis de la caseína α_{s1} . También en este caso el estado de agregación de la proteína y las características del medio condicionan la hidrólisis. En efecto, la presencia de 5 % de NaCl inhibe fuertemente la acción del coagulante sobre la caseína β , probablemente a causa de la asociación hidrofóbica de las moléculas del sustrato.

En el caso de la caseína α_{s2} , el sitio primario de ataque del coagulante parece ser la unión Phe₈₈-Tyr₈₉. También se han detectado otros sitios, siempre en la zona hidrofóbica de la molécula. La caseína α_{s2} resulta mucho menos sensible que la α_{s1} al ataque de la enzima coagulante, y la para-caseína κ parece ser resistente a la quimosina (Hynes y Zalazar, 2000b y c).

La velocidad de hidrólisis de las caseínas puede compararse por medio de los parámetros k_{cat} y K_m , es decir la constante cinética y la constante de Michaelis-Menten, respectivamente, aunque es importante tener en cuenta que mínimas variaciones en las condiciones experimentales introducen cambios en los valores de estas constantes. Se ha encontrado suficiente evidencia de que la velocidad de hidrólisis de las caseínas α_{s1} y β está determinada en gran medida por el estado de agregación del sustrato, el cual puede afectar la accesibilidad de la enzima a los enlaces peptídicos específicos. La flexibilidad de la conformación puede estar influida a su vez por variables tales como pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de urea, etc.

La velocidad a la que los enlaces son hidrolizados depende del pH y de la fuerza iónica, en particular el enlace Leu₁₀₁-Lys₁₀₂ de la caseína α_{s1} es cortado muy rápidamente a bajo pH. Las constantes k_{cat} y K_m para la hidrólisis de la unión Phe₂₃-Phe₂₄ de la caseína α_{s1} son 0,7 s⁻¹ y 0,37 mM respectivamente (Fox, 1989).

c- Acción de las enzimas coagulantes durante la maduración de quesos

Los estudios *in vitro* sobre las caseínas han aportado información valiosa sobre la potencialidad hidrolítica de las enzimas coagulantes. Sin embargo, resulta difícil reproducir en solución condiciones similares a las del queso. Por esta razón se han realizado numerosos estudios directamente sobre quesos experimentales, comparándolos con otros quesos testigo (de Jong, 1976; de

Jong, 1978; Noomen, 1978b; Vassal y col., 1986; Fox, 1988; Fox y McSweeney, 1995; Hynes y col., 1999a; Hynes y col., 1999b; Hynes y col., 1999c; Hynes y col., 2000a; Hynes y Zalazar, 2000b; Hynes y Zalazar, 2000c; Hynes y col., 2001b).

Como ya se observó, los quesos experimentales son aquéllos en los que uno o más de los equipos enzimáticos normalmente presentes durante la maduración son eliminados. En el caso particular del coagulante, los métodos usados se basan en destruir la enzima una vez que ha realizado la primera fase de la coagulación.

También se han desarrollado métodos en donde el coagulante es la única enzima presente en la maduración. La comparación de los resultados obtenidos en distintas experiencias de estos tipos ha permitido a los investigadores obtener conclusiones muy ajustadas sobre la participación del coagulante en la maduración de quesos.

Únicamente de un 3 a un 6 % de coagulante agregado a la leche es retenido por la cuajada. La retención y actividad del coagulante residual varían mucho de una variedad de queso a otra. Por ejemplo, el nivel de quimosina retenido por la cuajada es muy dependiente del pH; en cambio, las pepsinas y las proteasas microbianas son independientes de esta variable. La tecnología casearia puede desnaturalizarlo en gran medida, como en el caso de quesos duros de pasta cocida (Reggianito, Parmigiano Reggiano, etc.), o favorecer su retención y actividad, como en los quesos de pasta blanda de alto contenido de humedad (Cremoso Argentino, Crescenza, Camembert, Saint-Paulin, etc.).

Generalmente se acepta que durante la maduración del queso la enzima coagulante es responsable de la proteólisis primaria, es decir, de la acción hidrolítica sobre las caseínas para dar grandes péptidos, los que posteriormente pueden ser degradados por el sistema proteolítico de las bacterias lácticas del fermento o por las otras enzimas presentes. Parte de la proteólisis primaria ha sido adjudicada a la plasmina, aunque se considera que su incidencia es menor, excepto en los casos de quesos de pasta cocida, donde se inactiva el coagulante. Se encontró que la actividad de la enzima coagulante puede mantenerse durante toda la maduración en quesos de pasta blanda y semidura.

El coagulante es el principal responsable de la producción de nitrógeno soluble en muchas variedades de queso. Entre los péptidos que forman el nitrógeno soluble a pH 4,6, la mayor incidencia en porcentaje le corresponde a aquéllos de peso molecular mayor a 3.000 daltons. Por el contrario, la enzima coagulante produce por sí misma cantidades menores de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético 12 % y/o fosfotúngstico al 5 %. En estas fracciones, la incidencia de los péptidos pequeños y los aminoácidos libres es mucho mayor.

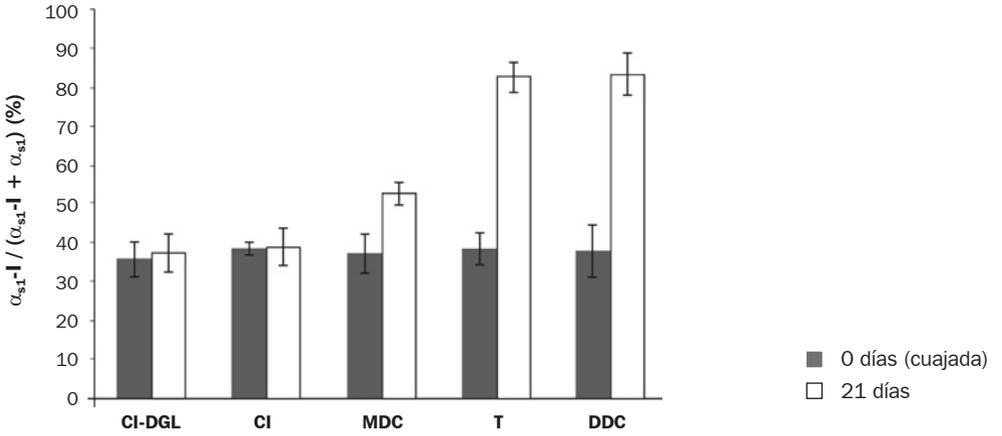
Hynes y col. (2001a y b) estudiaron la influencia de la dosis de enzima

coagulante sobre la degradación de la caseína α_{s1} . Para ello elaboraron cinco tipos diferentes de quesos: quesos experimentales con coagulante inactivado, para lo que se utilizó la técnica de inactivación de pepsina descrita antes; quesos con coagulante inactivado y sin fermento; quesos con media y con doble dosis de coagulante y un queso control con dosis normal de coagulante. La proteólisis se siguió por medio de focalización isoelectrica y determinación del índice de maduración, definido como la relación entre nitrógeno soluble a pH 4,6 y nitrógeno total. Las bandas electroforéticas fueron cuantificadas por densitometría y en base de ello se calculó la relación $\alpha_{s1}\text{-I}/(\alpha_{s1}\text{-I} + \alpha_{s1})$.

En las Figuras 12 y 13 pueden observarse los valores de la relación $\alpha_{s1}\text{-I}/(\alpha_{s1}\text{-I} + \alpha_{s1})$ y del índice de maduración para los distintos tipos de quesos elaborados a 0 y 21 días de maduración. El nivel de hidrólisis de la caseína α_{s1} dependió de la dosis de coagulante utilizada en las elaboraciones. Los quesos sin enzima coagulante activa no mostraron ninguna degradación durante la maduración, mientras que aquellos elaborados con dosis media y dosis normal mostraron degradaciones proporcionales a las mismas. Los quesos con dosis doble de coagulante, sin embargo, no exhibieron una degradación mayor que aquellos con dosis normal. Por otra parte, no se hallaron diferencias entre los quesos elaborados con y sin fermento, lo que indica que las enzimas de los microorganismos termófilos usados fueron incapaces de desdoblar la caseína entera. También se halló una alta correlación lineal entre el índice de maduración y la relación $\alpha_{s1}\text{-I}/(\alpha_{s1}\text{-I} + \alpha_{s1})$, lo que indica que esta relación es una buena medida del grado de maduración de quesos blandos (Zalazar y col., 1995).

Figura 12

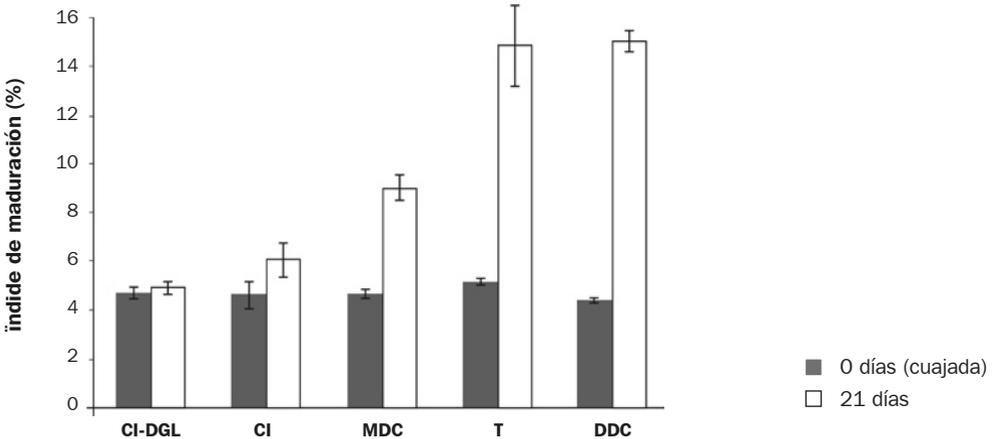
Relación porcentual $\alpha_{s1-I}/(\alpha_{s1-I} + \alpha_{s1})$ para quesos de 0 y 21 días (Hynes y col., 2001b)



T: quesos testigo; **MDC:** quesos con media dosis de enzima coagulante; **DDC:** quesos con doble dosis de enzima coagulante; **CI:** quesos experimentales con enzima coagulante inactivada; **CI-DGL:** quesos experimentales con enzima coagulante inactivada y glucono- δ -lactona

Figura 13

Índice de maduración porcentual para quesos de 0 y 21 días (Hynes y col., 2001b)

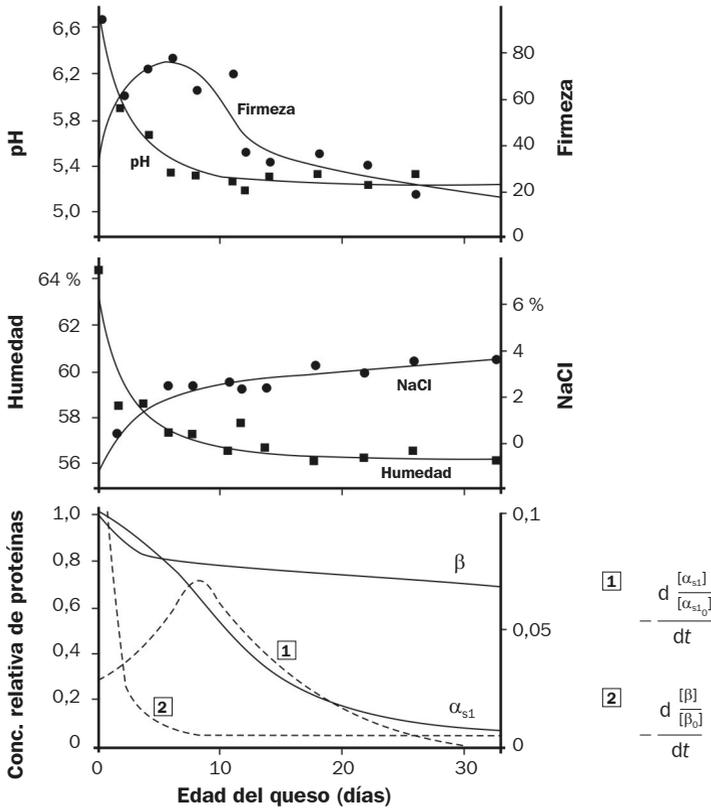


T: quesos testigo; **MDC:** quesos con media dosis de enzima coagulante; **DDC:** quesos con doble dosis de enzima coagulante; **CI:** quesos experimentales con enzima coagulante inactivada; **CI-DGL:** quesos experimentales con enzima coagulante inactivada y glucono- δ -lactona

El péptido α_{s1} -I es más ácido y tiene mayor capacidad de ligar agua que la caseína de origen. Esto ha sido relacionado con el ablandamiento que experimentan ciertos tipos de quesos en un estado temprano de su maduración, que va desde el centro hacia el exterior y que está directamente relacionado con la degradación de la caseína α_{s1} . En una cuajada experimental modelo se ha encontrado que en 24 horas la caseína α_{s1} sufre una degradación del 40 %. Se ha informado también que la proteólisis intensa de la caseína comienza aproximadamente en una semana para los quesos Taleggio y Quartirolo. Para el queso Noordhollandse Meshanger la proteólisis comienza casi inmediatamente después de su producción, aunque el ablandamiento empieza en una semana, al contrarrestarse otros efectos como la pérdida de humedad y el aumento de la concentración de sal. En la Figura 14 se pueden observar estas variaciones en función del tiempo, juntamente con la de la consistencia del queso expresada en unidades que van de 0 a 80 (de Jong, 1976).

Figura 14

Evolución de algunos parámetros importantes durante la maduración del queso Meshanger (de Jong, 1976).



Si bien la producción del péptido α_{s1} -I en quesos es atribuida a la acción del coagulante, también ha sido detectado en quesos de pasta cocida, donde esta enzima se supone inactivada. En el caso de tratamientos a pH 6,5 y 53 °C algunos autores no excluyen la posibilidad de actividad residual pero, de todas maneras se necesita una mejor definición sobre el origen del péptido en este tipo de variedades. Este tema será tratado con mayor detalle en el capítulo “Recientes avances en el estudio de la maduración de quesos duros. El ejemplo del queso Reggianito Argentino”.

La hidrólisis de la caseína α_{s1} es estimulada por el incremento en la concentración de NaCl hasta el 4 % en la humedad del queso. Concentraciones mayores retardan la degradación. El pH óptimo es cercano a 5,00, aunque la reacción se observa en un rango de 4,85 a 5,20 y en solución se ha verificado a pH 4,00.

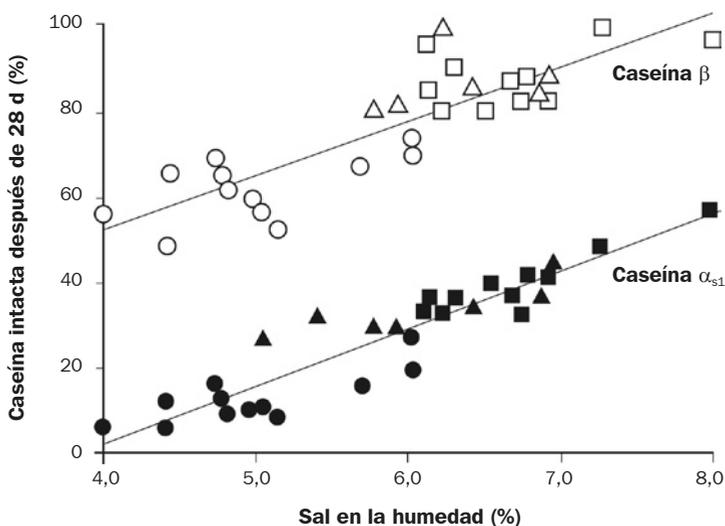
Con relación al pH de los quesos blandos al final de la etapa de elaboración, se ha podido observar que cuando el mismo es demasiado bajo, inferior a 4,8, se produce un fenómeno que se conoce con el nombre de arricotado, que se caracteriza por un cuerpo duro y quebradizo y por la dificultad de fluir por acción del calor. Este problema ha sido atribuido en algunas oportunidades a la ausencia de un nivel adecuado de degradación de la caseína α_{s1} . Hynes y col. (1999a) estudiaron las causas de este defecto. Para ello, elaboraron dos tipos de queso Cremoso Argentino, uno utilizando un fermento directo de *Streptococcus thermophilus* y el otro con fermento natural de leche. El primero se dejó acidificar luego de elaborado hasta pH 5,2, mientras que al segundo se lo dejó hasta pH 4,7. La caracterización de la proteólisis se llevó a cabo por medio del análisis de las fracciones nitrogenadas, electroforesis y análisis de aminoácidos. La textura y la apariencia de los quesos fueron muy diferentes. El queso elaborado con fermento directo fue blando y cremoso, mientras que el de fermento natural resultó duro y quebradizo. Dado que el nivel de proteólisis en ambos fue similar se concluyó que el defecto de textura podría estar relacionado con la gran influencia del pH de la cuajada antes del salado sobre la organización de la red proteica de las caseínas y no a un diferente grado de proteólisis.

La caseína β es resistente al ataque del coagulante durante la maduración del queso, y una gran parte permanece intacta en muchas variedades. Esto ocurre a pesar de que la caseína β en solución se hidroliza rápidamente en varios enlaces, situados en la región C-terminal de la molécula. Probablemente, las uniones hidrofóbicas intermoleculares que se ponen en juego en la formación de polímeros, en las cuales está involucrada la zona C-terminal de la cadena de la proteína, impiden la acción de la quimosina. Esta hipótesis parece reforzada por el hecho de que el ataque se ve favorecido a bajas temperaturas (menores a 10 °C), en las cuales esta caseína está principalmente como monómero. Los péptidos provenientes de este ataque, β I y β II, no han sido detectados en quesos normales de

una manera fehaciente y atribuible a la acción del coagulante, aunque el β I fue hallado en muy baja cantidad en quesos experimentales. El pH óptimo para esta reacción parece ser 5,50. La hidrólisis de la caseína β es fuertemente inhibida por el cloruro de sodio. Se ha informado que en quesos experimentales sin sal esta ruptura se lleva a cabo y que disminuye rápidamente en presencia de bajas concentraciones de cloruro de sodio; sin embargo, aun en quesos sin sal, la hidrólisis detectada fue leve. En la Figura 15 se pueden apreciar los niveles de degradación de las caseínas α_{s1} y β durante la maduración de un queso blando y el efecto que tiene sobre ellos la concentración de sal. Se considera que la caseína β es resistente a todos los coagulantes de origen animal y, consecuentemente a la quimosina producida por fermentación, aunque no ocurre lo mismo con algunas proteasas ácidas provenientes de microorganismos.

Figura 15

Efecto de la concentración de sal en la fase acuosa del queso sobre la extensión de la proteólisis de las caseínas α_{s1} y β , en tres bloques individuales (identificados con un cuadrado, un círculo y un triángulo) de queso Cheddar, almacenados a 10 °C durante 30 días (Lawrence y col., 1987)



La cantidad remanente de cada caseína está expresada como el porcentaje de la originalmente presente

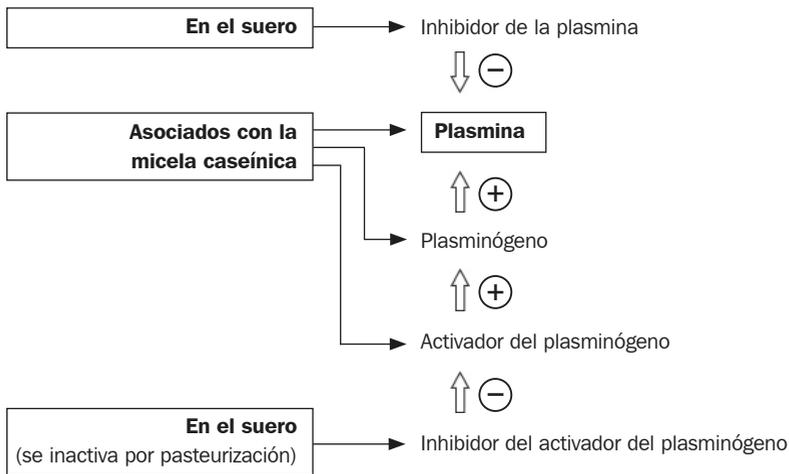
La caseína α_{s2} y la para-caseína κ han demostrado ser muy resistentes a la acción de la enzima coagulante durante la maduración.

Plasmina

La plasmina (EC 3.4.21.7), una proteasa de actividad similar a la tripsina, es de origen sanguíneo y constituye la principal proteasa natural de la leche. Su pH óptimo es de alrededor de 7,5 y tiene una alta especificidad hacia las uniones peptídicas que poseen residuos de lisina. La leche contiene el sistema plasmina completo, que está constituido por la plasmina propiamente dicha, sus inhibidores, el plasminógeno o precursor inactivo, activadores del plasminógeno e inhibidores de los activadores del plasminógeno. La plasmina y el plasminógeno se hallan asociados con las micelas de caseína y quedan retenidos en la cuajada durante la elaboración de quesos. Los otros dos componentes se hallan en el suero y son removidos durante su separación de la cuajada (Politis y col., 1992). En la Figura 16 se esquematiza el sistema plasmina en leche.

Figura 16

El sistema plasmina en leche



La leche contiene por lo menos cuatro veces más plasminógeno que plasmina, y se sabe que ciertos procesos tales como el almacenamiento o los tratamientos térmicos de la leche favorecen el pasaje a la forma activa.

La plasmina es sumamente resistente al calor. Los procesos más severos, tales como los tratamientos de ultra alta temperatura (142 °C durante 4 segundos) sólo causan una inactivación parcial de la misma.

La pasteurización y la cocción del grano de cuajada en suero a altas temperaturas (52-53 °C) incrementan la actividad de la plasmina, posiblemente por

inactivación de los inhibidores de los activadores del plasminógeno (Grufferty y Fox, 1988).

Debido a que la mayor parte del plasminógeno y de la plasmina están presentes en el queso, es muy probable que contribuyan, en formas variables según el tipo, al proceso de maduración de los mismos (Noomen, 1978a).

A pesar de que generalmente se acepta que la plasmina contribuye con la proteólisis en los quesos, hay muy poca información disponible. Experiencias realizadas *in vitro* han demostrado que la caseína β es el sustrato más susceptible a la plasmina, conduciendo a la formación de caseínas γ y algunas de las fracciones proteosa peptona.

La inhibición de la plasmina mediante el agregado de ácido 6-amino hexanoico a quesos experimentales del tipo Emmental, Gruyère y Romano dio lugar a diferencias considerables en los perfiles de maduración con respecto a testigos elaborados en forma normal (Fox y Stepaniak, 1993).

Para los quesos duros tales como los italianos Parmigiano-Reggiano y Grana Padano, y los argentinos Reggianito, Parmesano y Sbrinz, los procesos de cocción a 52-53 °C posiblemente desnaturalizan en forma completa o casi completa las enzimas coagulantes mientras que, por el contrario, serían los responsables de una activación de la plasmina. Esta situación ha llegado a establecer la hipótesis de que la plasmina en estos tipos de quesos tendría un papel de suma importancia en la hidrólisis primaria de las caseínas. Este aspecto se tratará con mayor detalle en el capítulo "Recientes avances en el estudio de la maduración de quesos duros. El ejemplo del queso Reggianito Argentino".

Al presente, solamente existen algunos estudios relativos a la acción de la plasmina en la maduración de quesos del tipo suizo (Emmental, Gruyère) y Cheddar, habiendo aparecido recientemente un trabajo sobre quesos italianos (Ollikainen y Kivela, 1989; Farkye y Landkammer, 1992; Bastian y col., 1997; Rampilli y Raja, 1998). Recientemente se han realizado estudios en quesos argentinos.

De acuerdo con los resultados de ensayos llevados a cabo *in vitro* se ha podido establecer que los sitios primarios de ataque de la plasmina sobre la caseína β son: Lys₂₈-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆, Lys₁₀₇-Glu₁₀₈, dando lugar a las fracciones β CN f 29-209 o caseína γ_1 , β CN f 106-209 o caseína γ_2 , β CN f 108-209 o caseína γ_3 , como también a las proteosa peptonas correspondientes a las fracciones 1-105 y 1-107, denominadas 5, a las fracciones 29-105 y 29-107, denominadas 8 lenta, y a la fracción 1-28, llamada 8 rápida.

Los sitios detectados en la caseína α_2 son los siguientes: Lys₂₁-Glu₂₂, Lys₂₄-Asn₂₅, Arg₁₁₄-Asn₁₁₅, Lys₁₄₉-Lys₁₅₀, Lys₁₅₀-Thr₁₅₁, Lys₁₈₁-Thr₁₈₂, Lys₁₈₈-Ala₁₈₉, Lys₁₉₇-Thr₁₉₈, lo que conduce a la formación de 14 péptidos, de los cuales 3 son potencialmente amargos.

Sobre la caseína α_1 , la acción hidrolítica de la plasmina es sensiblemente

inferior. Sin embargo, se han podido identificar los siguientes sitios de acción: Arg₂₂-Phe₂₃, Arg₉₀-Tyr₉₁, Lys₁₀₂-Lys₁₀₃, Lys₁₀₃-Tyr₁₀₄, Lys₁₀₅-Val₁₀₆, Lys₁₂₄-Glu₁₂₅, Arg₁₅₁-Gln₁₅₂. Dentro de los productos formados, la fracción menor ha sido identificada como caseína λ .

La plasmina ha demostrado una muy baja actividad hacia la caseína κ , no habiéndose determinado ningún sitio específico de acción (Grufferti y Fox, 1988).

Toda esta información ha sido poco corroborada en quesos, en los que no se tienen mayores datos disponibles. En quesos suizos se ha detectado la presencia tanto de las caseínas γ como de las proteosomas peptonas, considerándose a estas fracciones como componentes típicos de estos quesos. Se debe tener en cuenta que en estos casos la destrucción del inhibidor del activador del plasminógeno en la pasteurización posibilita la presencia de una mayor concentración de plasmina durante la maduración, y además se ve favorecida la actividad de la misma con el tiempo debido al incremento del pH que se va produciendo durante la maduración.

En experiencias llevadas a cabo en la elaboración de quesos suizos en los que el nivel de plasmina en la leche estaba incrementado por la adición de uroquinasa, un activador del pasaje plasminógeno a plasmina, a las 12 semanas de maduración se observó una mayor hidrólisis de la caseína β . Asimismo, un mayor contenido de ácido propiónico y una mayor intensidad del gusto y del sabor a nuez con respecto a los quesos testigo en los que el plasminógeno no había sido activado (Fox y Stepaniak, 1993).

En lo que respecta al queso Cheddar, algunos autores manifiestan que el rol de la plasmina en su maduración es intrascendente, debido a que no implica un proceso de cocción durante su elaboración. Sin embargo, otros investigadores han observado que a pesar de la acidez de la pasta, que oscilaba entre pH 4,8 y 4,9, se pueden obtener quesos con mejores niveles de sabor si la concentración de plasmina en la leche de elaboración es elevada artificialmente hasta tres veces su valor normal. Teniendo en cuenta estos resultados se ha llegado a proponer la adición de plasmina como un medio para acelerar la maduración, aunque los elevados costos de esta enzima no hacen muy viable esta alternativa (Fox y Stepaniak, 1993).

Otro aspecto interesante relacionado con la plasmina es el pH al cual la misma se disocia de la micela caseínica. Se ha podido establecer que por debajo de pH 4,8 esta enzima migra totalmente hacia el suero, por lo que es de esperar que su nivel de retención sea menor en aquellos quesos en los que la separación del suero de la cuajada se produce con un mayor nivel de acidez.

Recientemente, Fernández y col. (2004) llevaron a cabo un trabajo en el que se estudió el nivel de plasmina y plasminógeno en distintos tipos de quesos argentinos, incluyendo productos de pasta no cocida, semicocida y cocida, a fin

de establecer posibles diferencias entre los mismos y sus respectivas causas.

Dentro del primer grupo se analizaron quesos Blanco, Cremoso y untables; en el segundo grupo se incluyeron los tipos Por Salut, Holanda, Pategrás y Goya y en el tercero Reggianito y Parmesano. En la Tabla 3 se indican los valores medios de varias determinaciones para cada tipo, expresadas en $\mu\text{g g}^{-1}$ de queso.

Tabla 3

Contenido de plasmina en distintos tipos de quesos argentinos (promedios de varias determinaciones para cada tipo) (Fernández y col., 2004)

Tipo de queso	Plasmina ($\mu\text{g g}^{-1}$ de queso)
Blanco marca A	4,91 ^a
Blanco marca B	5,72 ^a
Cremoso	6,51 ^a
Untable	5,16 ^a
Provolone	7,98 ^c
Por Salut marca A	13,38 ^b
Por Salut marca B	12,56 ^b
Holanda	13,04 ^b
Pategrás	13,80 ^b
Reggianito marca A	11,75 ^f
Reggianito marca B	14,77 ^e
Reggianito marca C	21,78 ^d
Parmesano	20,47 ^d
Reggianito elaborado en escala piloto (INLAIN)	15,38 ^e

^{a, b, c, d, e, f} Los valores con iguales supraíndices no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

Se puede observar que los quesos no cocidos presentaron los valores más bajos de plasmina y que no difirieron entre sí. Pese a ello, el queso Blanco marca A, que presentó un pH más bajo que el resto, resultó el de menor contenido de la enzima. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que al no existir ningún tratamiento térmico no se produce la activación del plasminógeno a plasmina y, además que a pH bajos se produce la disociación de la plasmina de la micela de caseína con pasaje de la misma al suero.

Los quesos semicocidos presentaron valores intermedios de plasmina a causa de la activación parcial del plasminógeno por el efecto térmico. La excepción a este grupo la constituyó el queso Provolone, caso que está justificado ya que su tecnología incluye un paso de hilado durante el cual se produce un profundo lavado de la pasta con cambios de agua.

Los quesos duros cocidos presentaron los valores más altos de plasmina, pero fueron diferentes entre sí. Posiblemente, las diferencias en las tecnologías de las distintas empresas justifiquen estas desigualdades.

Sobre estos mismos quesos se llevó a cabo la determinación del nivel de plasminógeno, como plasmina previa activación con uroquinasa. En la Tabla 4 se presentan los valores medios para la relación plasminógeno/plasmina obtenidos para los tres tipos de quesos.

Tabla 4

Relación plasminógeno/plasmina promedio para distintos tipos de quesos (Fernández y col., 2004)

Tipo de queso	Relación plasminógeno/plasmina
Pasta no cocida	1,31
Pasta semicocida	1,17
Pasta cocida	0,73

Estos valores confirman lo dicho anteriormente en el sentido de que en los quesos con mayor tratamiento térmico se produce la activación del plasminógeno, pasando a plasmina, y disminuyendo el valor de la relación plasminógeno/plasmina.

Microorganismos

a- Microorganismos usados en quesería

Durante el proceso de elaboración de quesos se incorporan al mismo dos grandes grupos de microorganismos que tienen roles de distinto nivel de importancia durante el proceso de maduración. Por un lado, se trata de microorganismos cuidadosamente seleccionados y de agregado intencional y por el otro de microorganismos de adición no controlada, que se incorporan ya sea por estar presentes en la leche de elaboración o por contaminaciones inevitables provenientes del ambiente de la quesería.

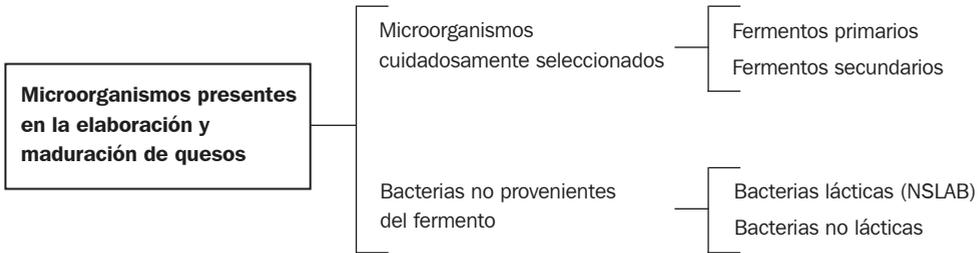
El primer grupo está formado por los denominados fermentos, los que a su vez se dividen en fermentos primarios y secundarios.

Los microorganismos de adición no intencional comprenden especies no totalmente identificadas, que en los casos de quesos elaborados con leche cruda tienen en ésta su principal fuente de aporte. En los quesos elaborados con leche pasteurizada se encuentran presentes aquellas bacterias termorresistentes que soportan el tratamiento térmico. El denominado ambiente de la quesería es la otra fuente de estos microorganismos. Estos grupos están mereciendo últimamente una gran atención en lo que respecta al rol que juegan en la maduración, ya que se los considera responsables de una gran parte de las propiedades características de los llamados quesos con denominación de origen. De acuerdo con la denominación inglesa “non starter lactic acid bacteria”, se los conoce en la literatura con la sigla NSLAB. El rol que juegan estos microorganismos durante la maduración se trata en otra parte de este capítulo.

En la Figura 17 se halla resumida la clasificación descrita anteriormente.

Figura 17

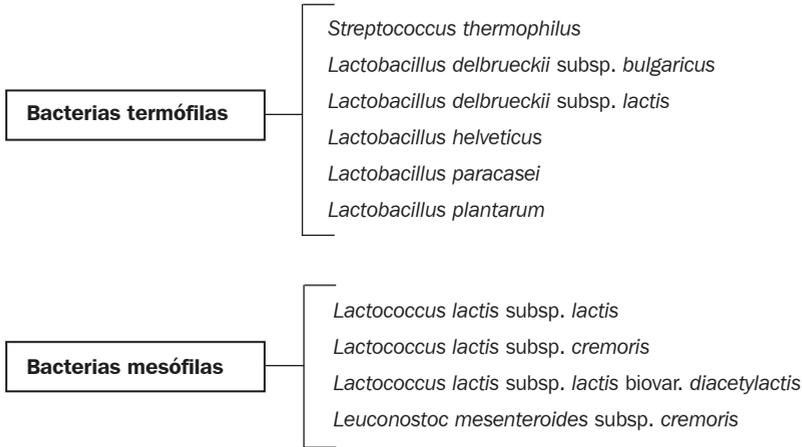
Tipos de microorganismos presentes en el queso



Los fermentos primarios cumplen el rol de generar ácido láctico durante la elaboración de quesos, lo que tiene importantes connotaciones tecnológicas. Estos fermentos primarios están compuestos por un limitado número de cepas de bacterias lácticas termófilas y mesófilas, cuyos principales representantes se indican en la Figura 18.

Figura 18

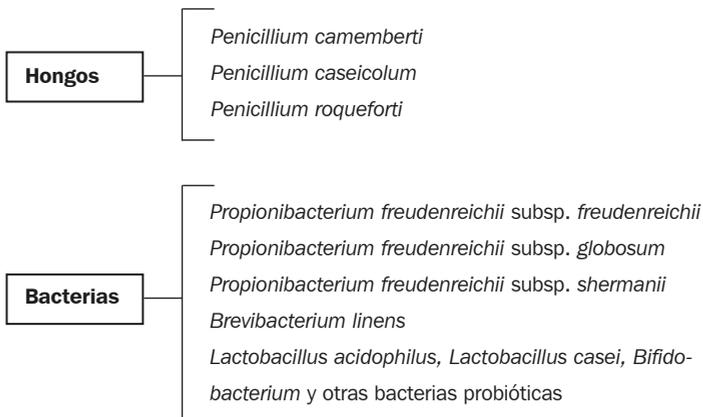
Bacterias lácticas más comúnmente usadas en la elaboración de quesos



Los fermentos secundarios son agregados con la finalidad de impartir al queso características especiales de aroma, sabor y textura mediante la formación de compuestos que son típicos de cada variedad. En general, no producen ácido láctico y están compuestos por distintas variedades de hongos y bacterias. Los principales exponentes de cada grupo se indican en la Figura 19.

Figura 19

Hongos y bacterias utilizados como fermentos secundarios en la maduración de queso



Últimamente se ha difundido el uso de bacterias probióticas como fermento secundario en quesos, impulsado por los beneficios que aportan a la salud y por el hecho de ofrecer los quesos un soporte menos agresivo que las leches fermentadas. Con esta finalidad se están adicionando a distintos tipos de quesos especies del género de *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* y diversas especies del género *Bifidobacterium*, entre otras. El objetivo principal de estas adiciones es que las mismas se hallen viables en cantidades superiores a 10^6 UFC g^{-1} durante la vida útil del queso y que no provoquen alteraciones durante la maduración que conduzcan a modificaciones en las características típicas del queso al cual son adicionadas (Stanton y col., 1998; Ross y col., 2002; Bergamini y col., 2005).

b- Actividad proteolítica de los fermentos primarios

Con respecto al papel que desempeñan durante la maduración los microorganismos de los fermentos primarios, la función de los lactococos es la que ha sido mejor estudiada, habiéndose caracterizado bastante bien sus sistemas proteolíticos. Estos sistemas están formados por proteasas asociadas con la pared celular y por 3 ó 4 proteasas intracelulares. Además, en el interior de las células han sido identificadas peptidasas que llegan a producir aminoácidos libres, actuando generalmente sobre el extremo N terminal (McSweeney y col., 1993a; Vicente y col., 2000).

Si bien se ha podido establecer la especificidad de las proteasas de pared de varias cepas de lactococos sobre las caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y κ , en sistemas *in vitro*, no parece que estas acciones se verifiquen en el queso, debido a la estructura micelar de las caseínas y a las interacciones que existen entre ellas cuando están organizadas en esa forma.

Todos los investigadores están de acuerdo en afirmar que la producción de péptidos pequeños y aminoácidos libres en quesos es una consecuencia de la actividad de las peptidasas del fermento primario, ya que cuando éste está ausente dichos productos no se forman o lo hacen en muy bajas cantidades.

Dada la importancia que poseen en la maduración de quesos las peptidasas intracelulares aportadas por los lactococos, adquiere un rol trascendente la capacidad de lisis de las células del fermento primario. Efectivamente, luego de la muerte y ruptura de la estructura celular, estas peptidasas se vuelcan en la masa del queso. De esta forma las enzimas están disponibles para ejercer su acción libremente sobre los péptidos que han sido originados por los otros equipos enzimáticos, tales como los provenientes del coagulante o de la plasmina. Por este motivo se han desarrollado trabajos de investigación tendientes a seleccionar, dentro de una determinada especie, aquellas cepas bacterianas que posean la mayor capacidad de lisis, entendiendo que mediante el uso de ellas se podría acelerar la maduración de los quesos.

Las variedades termófilas de bacterias lácticas han sido menos estudiadas que las mesófilas, pese a que son ampliamente utilizadas en la industria láctea para la producción de quesos y leches fermentadas. Muy posiblemente, el tamaño de los quesos que usan fermentos termófilos (Emmental, Grana, etc.) y los largos tiempos de maduración que insumen hayan dificultado la realización de modelos para el estudio de la misma.

Se ha llegado a establecer, sin embargo, que el sistema proteolítico de los lactobacilos es similar al de los lactococos, con una proteasa principal asociada a la pared celular. Asimismo, ha sido caracterizado un importante número de peptidasas.

Streptococcus thermophilus es una bacteria usada en la elaboración de yogur, en la popular Mozzarella y en muchos tipos de quesos blandos argentinos. Se considera menos proteolítica que los lactobacilos termófilos y su sistema proteolítico no ha sido bien estudiado. Usualmente crece en simbiosis con especies de lactobacilos, los que habitualmente le proveen los péptidos necesarios.

c- Actividades metabólicas de los fermentos secundarios

Como se dijo anteriormente, los fermentos secundarios son agregados durante la elaboración de quesos no con el objetivo de producir ácido láctico sino con la función de generar ciertos compuestos, responsables del flavor típico de determinadas variedades de quesos (El Soda y col., 2000).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y las variedades de *Leuconostoc*, microorganismos que se usan como fermentos primarios, cumplen también un rol de fermentos secundarios, ya que fermentan el lactato o citrato con producción de anhídrido carbónico, responsable de la formación de ojos dulces en quesos semiduros como el Danbo y el Gouda.

Los quesos azules se caracterizan por el crecimiento en su masa de *Penicillium roqueforti*, mientras que el Camembert y el Brie lo hacen por el desarrollo superficial de *Penicillium camemberti* o *Penicillium caseicolum*. Ambas especies son productoras de poderosos equipos enzimáticos, que incluyen proteasas intra y extracelulares capaces de degradar las caseínas α_1 y β en forma total, con producción de aminoácidos libres y productos derivados de los mismos.

Brevibacterium linens, un microorganismo característico de la flora de variedades de queso de maduración superficial, posee una fuerte actividad proteolítica, determinada por proteasas intra y extracelulares, que justifican los fuertes caracteres organolépticos de estos tipos de queso.

La función más importante de las bacterias propiónicas es la de metabolizar el lactato con producción de ácido acético, ácido propiónico y anhídrido carbónico, componentes fundamentales para la formación de ojos y generación de sabor típicos de quesos suizos tales como el Emmental y el Gruyère. Existen pocos estudios sobre las actividades proteolíticas y peptidásicas de

estos microorganismos. Varios autores han hecho estudios sobre estos sistemas, habiéndose informado la liberación de prolina por algunas cepas de *Propionibacterium*, aminoácido que tendría una gran influencia en el sabor a nuez de estos quesos.

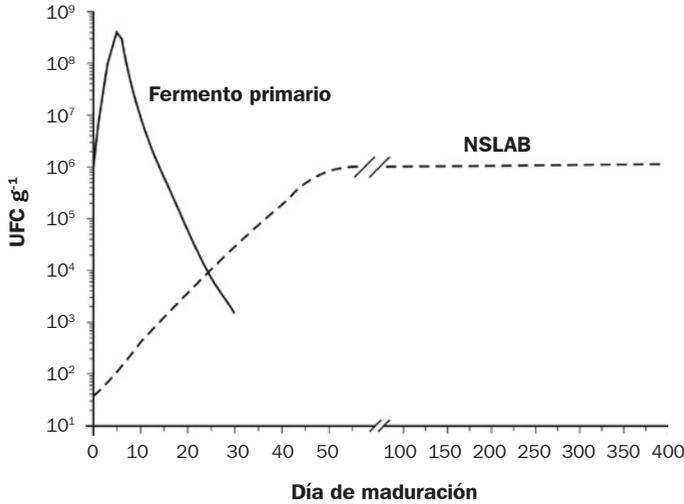
d- Evolución de los microorganismos durante la maduración

Durante la maduración del queso se producen modificaciones en la composición de la flora bacteriana presente en la masa. Las bacterias provenientes del fermento primario decrecen en forma continua durante este período, luego de haber alcanzado un número máximo de 10^9 UFC g^{-1} de queso al final de la elaboración. Este hecho se debe fundamentalmente al agotamiento de la lactosa como fuente de carbono, al aumento de la concentración de cloruro de sodio en el centro del queso y a un pH de 5,2 a 5,3, que no es el más adecuado para el crecimiento de este tipo de bacteria. Esta reducción en el número de bacterias viables va acompañado de un aumento en la cantidad de células que se lisan y, como ya se dijo, vuelcan su contenido enzimático al medio contribuyendo efectivamente a la proteólisis. La intensidad de esta lisis celular depende, por otra parte, del tipo de cepa utilizada en el fermento primario. Las bacterias lácticas no provenientes del fermento (NSLAB) en cambio, partiendo desde un número muy bajo al inicio de la maduración van aumentando a medida que encuentran condiciones favorables para su desarrollo, hasta alcanzar concentraciones tan altas como 10^7 UFC g^{-1} en ciertos tipos de quesos.

En la Figura 20 se ilustra gráficamente la evolución de los distintos tipos de microorganismos durante la maduración de quesos.

Figura 20

Evolución de los distintos tipos de microorganismos durante la maduración de quesos



Esquema general de la proteólisis durante la maduración

Resumiendo los conceptos relacionados con los cambios que sufren las proteínas inicialmente presentes, se puede hablar de una proteólisis primaria, que consiste en la degradación de las caseínas enteras a péptidos de elevado peso molecular, por acción fundamentalmente del coagulante de leche y de la proteasa natural (plasmina). Esta proteólisis primaria conduce a la formación de los péptidos $\alpha_{s1}I$ y $\alpha_{s1}(f1-23)$, derivados de la caseína α_{s1} , y las caseínas γ_1 , γ_2 y γ_3 y sus fracciones complementarias, derivadas de la caseína β . Este proceso se ha visualizado fundamentalmente por electroforesis PAGE, en donde las caseínas intactas y los productos de degradación primaria mencionados son fácilmente puestos en evidencia.

A medida que se forman los grandes péptidos derivados de las caseínas, los restantes equipos enzimáticos presentes en el queso, compuestos mayoritariamente por proteasas de origen microbiano, llevan a cabo las transformaciones ulteriores que conducen a la formación de péptidos de mediano y bajo peso molecular, aminoácidos libres y productos de transformación de estos últimos. En la Figura 21 se ilustran las secuencias de proteólisis primaria y secundaria, y en la Figura 22 están esquematizados los posibles caminos de transformación ulterior de aminoácidos (Grappin y col., 1985a y 1985b).

Figura 21

Proteólisis primaria de las caseínas durante la maduración de quesos

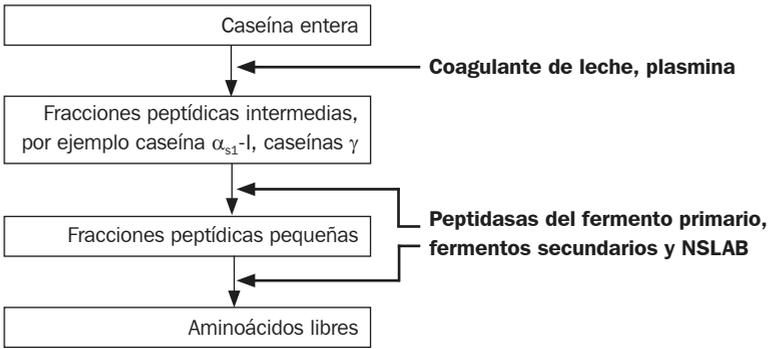
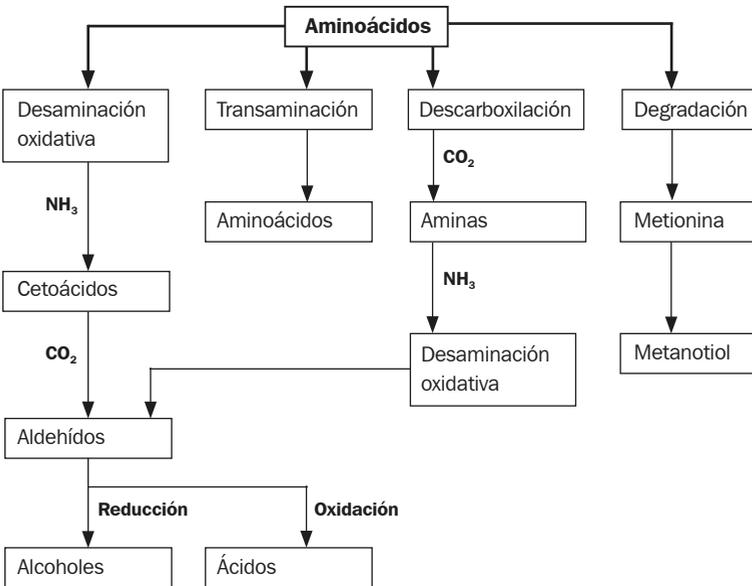


Figura 22

Rutas de transformación ulterior de aminoácidos (Zalazar, 1994)



Transformaciones de la lactosa, del lactato y del citrato

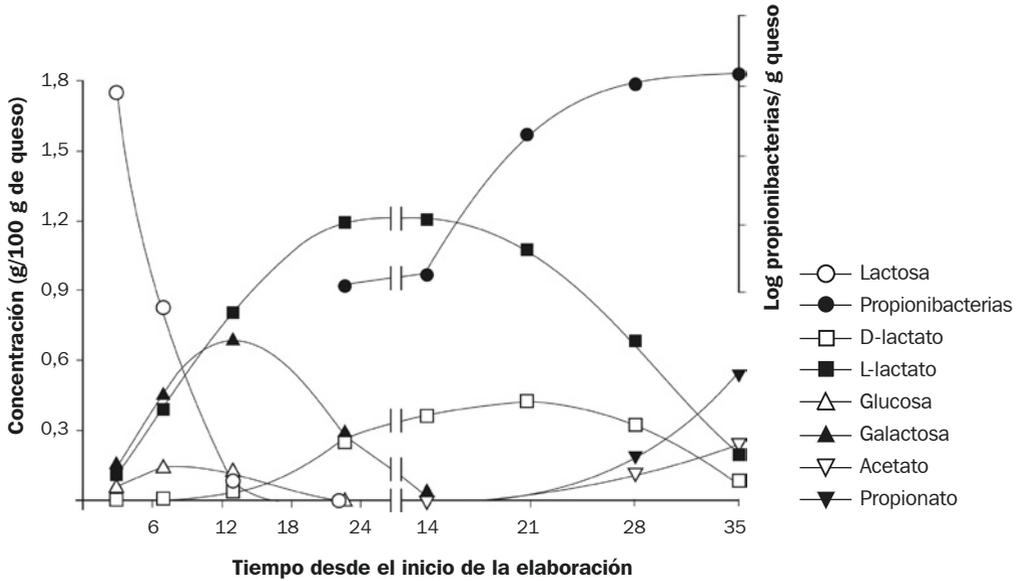
La lactosa, otro de los componentes mayoritarios de la leche, se transforma parcialmente en ácido láctico durante la elaboración de quesos, lo que constituye la función primaria de los fermentos lácticos, de gran trascendencia tecnológica ya que es el hecho que condiciona en gran medida las características finales del queso. El nivel de acidificación de la cuajada, además de ser un factor importante en la determinación del contenido de humedad es también de relevancia en la proteólisis durante la maduración, ya que fija el grado de desmineralización de la caseína, hecho que incrementa su susceptibilidad a las proteasas y establece la cantidad de enzima coagulante que queda retenida.

Se estima que el 98 % de la lactosa se pierde al separar el suero, ya sea como tal o como lactato. Luego del desuerado, en general es escasa la cantidad de lactosa remanente en la cuajada, lo que depende mucho del contenido de humedad de la misma. A las pocas horas de finalizada la elaboración desaparece rápidamente, transformándose en su totalidad a lactato, principalmente el isómero L, previo desdoblamiento en los monosacáridos glucosa y galactosa.

En la Figura 23 puede observarse la evolución del contenido de lactosa y de los principales productos derivados de ella, inmediatamente luego de la elaboración de un queso tipo Emmental. Como puede apreciarse, luego de 4 horas la lactosa ha desaparecido completamente. El hecho de que no todos los microorganismos de los fermentos primarios metabolizan la galactosa hace que este azúcar se acumule en los primeros momentos, cosa que no ocurre con la glucosa, la cual nunca alcanza niveles significativos ya que a medida que se origina es metabolizada. Se observa asimismo el aumento de la concentración de lactato total, lo que se traduce en el descenso de pH que sufre la cuajada luego de la elaboración.

Figura 23

Evolución del contenido de lactosa y de sus productos de metabolización luego de la elaboración de un queso Emmental (McSweeney y Fox, 2004)



Como se indicó anteriormente, en el caso de los quesos tipo Gouda o Edam, en los que se usan bacterias lácticas heterofermentativas como fermento primario, la lactosa metabolizada es transformada en un 50 % a ácido láctico, mientras que el 50 % restante interviene en la generación de ácido acético, etanol y anhídrido carbónico, compuestos que son los responsables del gusto típico y de la formación de ojos llamados dulces en estos tipos de quesos.

El lactato formado, como ya se indicó, puede tener distintos destinos durante la maduración, de acuerdo con el tipo de microorganismos que se encuentren presentes en la masa del queso.

En ciertos tipos de quesos elaborados con leche cruda, como los quesos duros italianos y el Cheddar, la presencia de pediococos y también de ciertos lactobacilos constituyentes de las NSLAB es responsable de la racemización del lactato con la producción de D-lactato, que es menos soluble que el L-lactato. Por esta razón se produce la formación de cristales de este compuesto, que otorgan al queso una sensación arenosa al paladar, la cual es a veces erróneamente atribuida a la presencia de aminoácidos libres. La presencia de D-lactato en el queso ha sido considerada desfavorable en ciertos casos, ya que presenta algunos problemas nutricionales, principalmente en niños.

Algunas variedades de pediococos son responsables también de la oxidación del lactato a acetato y anhídrido carbónico, compuestos que influyen sobre el aroma, sabor y textura de quesos duros y semiduros (McSweeney y Fox, 2004).

En los denominados quesos suizos, la transformación del lactato juega un rol fundamental en la determinación de sus características típicas. Como fermento primario, en estos casos se usa fundamentalmente *Streptococcus thermophilus* pero, debido a que este microorganismo metaboliza sólo la glucosa para producir lactato, debe agregarse un lactobacilo como fermento adjunto, normalmente *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que utiliza la galactosa con producción de L- y D-lactato. De esta forma se evita la acumulación de galactosa en la masa del queso, a la vez que se garantiza la presencia de cantidades adecuadas de lactato, el que es usado por los microorganismos constitutivos del otro fermento adjunto: las bacterias propiónicas. En efecto, estas bacterias fermentan el lactato con producción de propionato, acetato y anhídrido carbónico, según la siguiente reacción:



Los dos primeros compuestos son fundamentales en la producción del aroma y el último en la formación de los ojos característicos.

El metabolismo del lactato en quesos madurados por hongos como el Camembert puede conducir a la formación de anhídrido carbónico y agua, con el consiguiente aumento del pH. En los quesos azules en cambio, si bien el lactato parecería no ser metabolizado, existe poca información disponible al respecto.

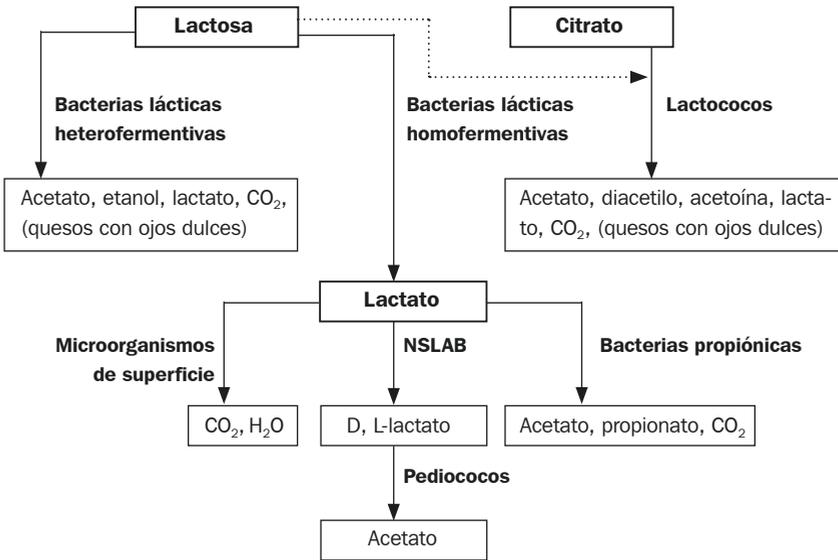
Un efecto negativo del metabolismo del lactato es la producción, a partir del mismo, de ácido butírico, ácido acético, anhídrido carbónico e hidrógeno por acción de los clostridios. Este fenómeno es conocido como hinchazón tardía y afecta principalmente a los quesos de larga maduración como los duros italianos.

En lo que respecta al citrato, debe decirse que el 90 % del presente en la leche se pierde con el suero. El restante puede ser metabolizado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a diacetilo, acetato y anhídrido carbónico, con formación de ojos y producción de aroma a manteca, en quesos tales como el Gouda y el Edam, en los cuales se utilizan como fermento estas cepas de bacterias lácticas mesófilas.

En la Figura 24 se ofrece un sumario de las distintas vías que puede seguir el metabolismo de la lactosa, del lactato y del citrato.

Figura 24

Vías metabólicas de la lactosa, lactato y citrato



Transformaciones de la materia grasa

La lipólisis consiste en la hidrólisis de los triglicéridos, componentes principales de la fracción lipídica de los quesos, por acción de las enzimas presentes durante la maduración. Como productos de la misma se generan ácidos grasos libres (AGL), glicerol, mono y diglicéridos. La definición de ácido graso abarca los ácidos monocarboxílicos alifáticos, saturados o insaturados, con número par o impar de átomos de carbono, y de cadena lineal o ramificada. Esta clasificación excluye los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico, los ácidos di y tricarboxílicos (succínico, cítrico), los ácidos ramificados de cadena corta, originados por degradación de aminoácidos (por ejemplo los ácidos isobutírico y 2,3-metilbutírico, correspondientes a los aminoácidos valina, leucina o isoleucina, respectivamente) y los ácidos aromáticos (benzoico, fenilacético, fenilpropiónico) (FIL- IDF, 1991; de la Fuente y Juárez, 1993). En los quesos elaborados utilizando fermentos primarios constituidos exclusivamente por bacterias lácticas y coagulantes tradicionales como los de bovino, o quimosina producida por fermentación, las transformaciones de la materia grasa son de poca relevancia. Sin embargo, la lipólisis es muy importante y responsable de las características de tipicidad en quesos madurados con hongos, tales como

los quesos azules y Camembert, en quesos duros como los italianos Grana y Parmigiano Reggiano, y en quesos elaborados con coagulantes especiales como el Provolone (Nelson y col., 1977).

Los ácidos grasos liberados durante la maduración de los quesos son importantes en el desarrollo de aroma y sabor, ya sea como tales o mediante la generación de compuestos aromáticos, a través de vías metabólicas no totalmente conocidas (oxidación enzimática, esterificación, decarboxilación, etc.) (Lenoir y col., 1985; Fox y col., 1993; Zalazar, 1994; Fox y McSweeney, 1998; Choisy y col., 1999; Menéndez y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2003). Si bien en los alimentos con alto contenido graso los lípidos pueden sufrir una degradación oxidativa intensa, con generación de sabores rancios, en el queso este proceso se halla fuertemente inhibido a causa del bajo potencial de óxido-reducción (-250 mV) y a la presencia de antioxidantes, por ejemplo vitamina E.

Entre los productos de transformación de los AGL presentes en el queso se encuentran los ésteres, responsables de la formación de aromas frutados y florales característicos. Los mismos se forman por la unión entre un AGL de cadena corta o media y un alcohol, derivado del metabolismo de la lactosa o ciertos aminoácidos. La esterificación es catalizada por enzimas microbianas y conlleva la eliminación de alcoholes y ácidos grasos que resultarían tóxicos para los microorganismos. En quesos Emmental, Parmigiano Reggiano y Cheddar se han encontrado numerosos ésteres metílicos, etílicos, propílicos y butílicos de ácidos grasos de cadena par de entre 2 y 10 átomos de carbono. Los ésteres etílicos de dichos ácidos grasos son abundantes en Gruyère, en quesos de pasta blanda como el Camembert, y muy importantes en el aroma del Parmigiano Reggiano (Qian y Reineccius, 2002; Collins y col., 2003).

La reacción entre AGL y grupos sulfhidrilos libres da lugar a la formación de tioésteres. Estos compuestos azufrados son característicos en Camembert y en quesos madurados con bacterias en superficie. Se ha encontrado que varias cepas de *Brevibacterium linens* y de micrococos, microorganismos característicos de esta última variedad de quesos, sintetizan S-metil tioésteres y tioésteres de cadena lineal y ramificada (Collins y col., 2003).

En quesos madurados por hongos, las principales especies empleadas (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* y *Geotrichum candidum*) poseen una enzima, la β -ceto-acil-decarboxilasa, capaz de desviar la ruta normal de β -oxidación de ácidos grasos mediante la decarboxilación de los ácidos β -cetónicos, generando metilcetonas con un carbono menos que el ácido graso de partida. Utilizando esta vía metabólica en parcial anaerobiosis los microorganismos eliminan del medio ácidos grasos que son tóxicos para su desarrollo. Por otro lado, las metilcetonas sintetizadas son los principales compuestos responsables del aroma y sabor típicos en quesos madurados con

hongos. En estas variedades, las principales metilcetonas encontradas poseen número impar de átomos de carbono (entre 3 y 15), siendo las más abundantes la 2-heptanona y 2-nonanona. Sin embargo, también se han encontrado cantidades muy bajas de metilcetonas de cadena par e insaturadas. En quesos Parmigiano Reggiano, Cheddar, Gouda y Emmental también se han aislado metilcetonas (Choisy y col., 1999; Collins y col., 2003). A su vez, las metilcetonas pueden ser reducidas rápidamente a alcoholes secundarios por la actividad reductasa de hongos y otros microorganismos. Estos compuestos se han encontrado en quesos azules, siendo los principales 2-heptanol y 2-nonanol (Urbach, 1993).

Las lactonas son ésteres que poseen una estructura de anillo y se originan por la esterificación intramolecular con pérdida de agua (ciclación) de los hidroxilácidos. Esta reacción se produce por acción del pH, microorganismos y/o calor, en presencia de agua. En quesos, la última vía de producción no está aún totalmente dilucidada. Estos compuestos son responsables de la formación de aromas frutados o almizclados que, si bien no son específicos del queso, contribuyen de manera importante al flavor global. Las δ y γ -lactonas, con anillos de 5 y 6 átomos de carbono respectivamente, son fuertemente aromáticas y muy estables, siendo las principales lactonas encontradas en quesos. Las α y β -lactonas, en cambio, no han sido detectadas en este alimento, debido probablemente a su alta reactividad. Las δ y γ -lactonas se originan a partir de los correspondientes δ y γ -hidroxilácidos, cuya vía principal de producción resulta del catabolismo normal de los ácidos grasos (β -oxidación). Otras vías de formación de hidroxilácidos están dadas por la acción de lipooxigenasas o hidratasas sobre ácidos grasos insaturados, por la reducción de cetoácidos (presentes en la grasa de leche a modo de triglicéridos) a hidroxilácidos llevada a cabo por levaduras y algunos hongos, y por la formación espontánea de los mismos en los triglicéridos seguida de su liberación por lipólisis. En quesos madurados por hongos (Camembert, Roquefort), Cheddar y Parmigiano Reggiano se encontraron cantidades apreciables de lactonas, siendo las principales δ -octalactona, δ -decalactona, δ -dodecalactona, δ -tetradecalactona, γ -decalactona y γ -dodecalactona (Banks y col., 1992; Collins y col., 2003).

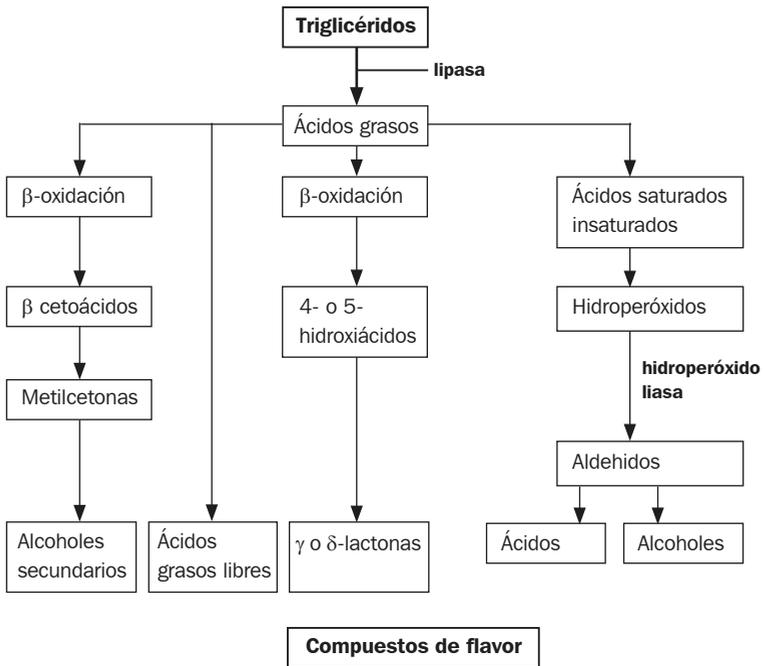
Otros compuestos encontrados en quesos son los aldehídos. Los mismos pueden provenir de la transaminación de aminoácidos, de la conversión enzimática directa de treonina y glicina a acetaldehído, o producirse a partir de hidroperóxidos originados mediante la oxidación de AGL insaturados por lipooxigenasas. Estos compuestos se encuentran de manera transitoria en quesos, ya que son transformados rápidamente en alcoholes y los correspondientes ácidos. Los principales aldehídos encontrados en Camembert son hexanal, heptanal, nonanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y benzaldehído.

También se han aislado aldehídos de cadena lineal en quesos Gruyère y Parmesano con lipólisis elevada (Menéndez y col., 1999).

A modo de resumen, en la Figura 25 se observa un esquema general de las transformaciones que pueden sufrir los triglicéridos de la materia grasa de la leche durante la maduración de quesos.

Figura 25

Transformaciones de los triglicéridos durante la maduración de quesos



Si se analizan los distintos agentes enzimáticos presentes en la masa del queso durante su maduración desde el punto de vista de la acción lipolítica que le puede caber a cada uno de ellos, deben ser considerados la lipasa natural de la leche, algunos coagulantes de ésta, las bacterias lácticas constitutivas de los fermentos primarios, los microorganismos incorporados con los fermentos secundarios y los microorganismos contaminantes, ya sean lácticos (NSLAB) o no (bacterias psicrotrofas, levaduras, hongos, etc.)

Enzimas nativas de la leche

La leche contiene una lipasa natural y algunas esterases de menor importancia. La lipasa presente en la leche es una lipoprotein lipasa (LPL) asociada con la micela de caseína, por lo que luego de la elaboración de quesos queda incorporada en la cuajada. En cuanto a su actividad hidrolítica, no es específica para el tipo de ácido graso pero sí es altamente selectiva hacia la posición *sn*-1 y *sn*-3 de los mono-, di- y triglicéridos y hacia la posición *sn*-1 de los fosfolípidos. Dada la distribución estereoespecífica que tienen los diferentes ácidos grasos en los triglicéridos de la leche, esta enzima libera preferentemente aquellos de cadena corta y media, en especial ácido butírico. Se trata de una enzima termosensible, que se inactiva casi totalmente con un calentamiento a 80 °C durante 10 s. En quesos elaborados con leche cruda la LPL realiza una contribución importante a la lipólisis, siendo en gran medida responsable de la formación de aroma y sabor en quesos con denominación de origen controlada. En quesos de pasta prensada no cocida, con flora esencialmente láctica, como por ejemplo Cheddar, esta enzima es responsable del 15 al 20 % de la lipólisis (Pinna y col., 1999). En quesos elaborados con leche pasteurizada, si bien su actividad es notablemente menor tampoco debe ser despreciada, ya que los tratamientos de pasteurización no son tan severos como para inactivar la enzima completamente. A pH inferior a 6,5 y en presencia de altas concentraciones de sal, la actividad de la LPL es prácticamente despreciable, por lo que algunos autores sostienen que esta enzima no tiene importancia en la mayoría de los quesos. Los quesos azules constituyen una excepción, ya que se elaboran con leche cruda y el pH aumenta considerablemente durante la maduración (Fox y col., 1993; Zalazar, 1994; Choisy y col., 1999; Menéndez y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000).

Enzimas coagulantes de leche

Los cuajos de ternero y de bovino adulto y la quimosina pura obtenida a partir de microorganismos genéticamente modificados son los coagulantes de leche más ampliamente utilizados. Todos ellos, al igual que las proteasas microbianas, no tienen poder lipolítico. Los coagulantes en pasta obtenidos a partir de estómagos de cabrito y corderito, que se utilizan en la elaboración de ciertos quesos duros italianos (Provolone, Romano) son, en cambio altamente lipolíticos. A diferencia de los preparados comerciales convencionales de cuajo bovino, obtenidos a partir de cuajares vacíos, lavados y secos, estos coagulantes se obtienen macerando los estómagos de cabritos o corderos mamones con su contenido (leche coagulada). Durante el amamantamiento se segrega una lipasa muy potente, la esterasa pregástrica (EPG) (Nelson y col., 1977; Salvadori del Prato y Messina, 1990; Zalazar, 1994; Deeth y Fitz-Gerald, 1995; Corradini, 1995; Fox y McSweeney, 1998; Pinna y col., 1999), la cual es transportada al

estómago junto con la leche ingerida y pasa a formar parte del preparado en pasta. La actividad hidrolítica de esta enzima se dirige específicamente hacia la posición *sn*-3 de los triglicéridos, en la cual se encuentran principalmente (en grasa de leche) ácidos grasos de bajo peso molecular. Estos últimos ejercen una marcada influencia en la determinación del aroma y sabor de los quesos. La EPG no ha sido aislada en forma homogénea pero se han caracterizado preparaciones comerciales parcialmente purificadas obtenidas a partir de cabritos y corderos (Fox y Guinee, 1987; Deeth y Fitz-Gerald, 1995; Fox y McSweeney, 1998). Aunque las EPG de ambas especies tienen especificidad para liberar ácido butírico y otros ácidos grasos de cadena corta, las dos enzimas se diferencian entre sí por la relación de ácidos producidos (AGL de cadena corta / AGL de cadena larga). Los coagulantes en pasta se consideran productos poco higiénicos, y su uso no está permitido en muchos países. De este modo, han sido reemplazados por preparaciones comerciales de EPG, que en la actualidad se utilizan para la producción controlada de aroma y sabor en quesos italianos y en otras variedades alrededor del mundo (Barzaghi y col., 1997; Pinna y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000). Sin embargo, los expertos en quesos italianos afirman que los coagulantes en pasta otorgan a estos productos sabores superiores con respecto a aquellos elaborados empleando preparaciones comerciales de EPG. Este fenómeno podría deberse a la presencia de enzimas de origen microbiano, segregadas durante la maduración previa a la maceración de los estómagos (aproximadamente 60 días), período durante el cual ocurre un considerable crecimiento bacteriano.

Enzimas aportadas por fermentos primarios

Las bacterias lácticas constitutivas de los fermentos primarios (lactobacilos, lactococos y estreptococos) son escasamente lipolíticas. Su actividad se encuentra determinada por la lisis celular que se produce durante la maduración, y la liberación de esterasas y lipasas intracelulares en la masa del queso. Estudios *in vitro* han detectado algunas actividades sobre sustratos artificiales pero, no hay evidencia de que en la masa del queso se pueda atribuir un efecto significativo a este tipo de bacterias. Sin embargo, en quesos Cheddar y tipo holandés, elaborados con leche pasteurizada, las lipasas y esterasas de dichas bacterias son los principales agentes lipolíticos. Si bien los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* tienen una baja actividad lipolítica con relación a *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*, los primeros se encuentran en altas concentraciones en los quesos, especialmente en aquellos de larga maduración, por lo que podrían ser responsables de la liberación de niveles significativos de AGL (Collins y col., 2003).

Enzimas aportadas por fermentos secundarios y microorganismos contaminantes

Dentro de los microorganismos que constituyen los fermentos secundarios y son importantes por su actividad lipolítica deben citarse muy especialmente ciertas variedades de hongos, tales como *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseicolum* y *Geotrichum candidum*. Estas especies se emplean en la producción de quesos con sabores y aromas intensos, producto de niveles de lipólisis muy elevados, además de una proteólisis muy extendida. Los hongos citados secretan lipasas extracelulares muy potentes; se ha llegado a establecer que en quesos madurados por hongos se libera un 25 % o más de los ácidos grasos presentes en la leche original. A su vez, transformaciones posteriores de los mismos que conducen a la formación de compuestos tales como cetonas (especialmente metilcetonas), lactonas, ésteres y tioésteres, conllevan al desarrollo de aroma y sabor típicos. La síntesis de dichos compuestos fue analizada en detalle en el presente capítulo. Los equipos lipolíticos de estas variedades de hongos han sido extensamente estudiados por numerosos investigadores (Lamberet y Lenoir, 1976; Gripon, 1993; Deeth y Fitz-Gerald, 1995; Choisy y col., 1999). Otros microorganismos importantes desde el punto de vista de su actividad lipolítica pertenecen al género *Propionibacterium*. Estas bacterias, denominadas propiónicas, se utilizan como fermentos adjuntos en la elaboración de quesos tipo suizo y presentan una actividad lipolítica entre 10 y 100 veces mayor que los lactobacilos. En el caso particular de quesos con manchas superficiales (Limburger), cuya aparición se debe a la presencia de bacterias coryneformes y ciertos hongos y levaduras, si bien la lipólisis es elevada existen pocos estudios referentes a los sistemas enzimáticos de aquellos microorganismos. Uno de ellos reveló que *Brevibacterium linens* (bacteria coryneforme) posee una actividad lipolítica notable debido a la acción de lipasas y estererasas intracelulares (Fox y col., 1993; Choisy y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000).

Por último, no debe olvidarse el aporte que realizan a la lipólisis las bacterias lácticas no provenientes del fermento (NSLAB) y los microorganismos de origen no caseario (contaminantes). Los lactobacilos heterofermentativos facultativos que dominan la microflora NSLAB (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum*) tienen una actividad lipolítica débil. *Micrococcus* y *Pediococcus*, a pesar de ser débilmente lipolíticos, son más activos que los anteriores (Fox y col., 1993; Choisy y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000), y se los ha responsabilizado de la producción de aromas y sabores a partir de la grasa en quesos elaborados con leche cruda como el Cheddar. Asimismo, estos tipos de bacterias pueden incorporarse al queso a través de fermentos naturales, tanto de suero como de leche, y son también las responsables de las características organolépticas típicas en variedades tales como el Parmigiano Reggiano y algunos productos frescos italianos. Las

bacterias psicrotrofas se destacan dentro de los contaminantes de origen no caseario. Las mismas, cuando se encuentran en concentraciones elevadas en la leche, secretan lipasas que se adsorben en la superficie de los glóbulos grasos, concentrándose en el queso. Se trata de enzimas extremadamente termorresistentes, que resisten tratamientos térmicos muy superiores a la pasteurización y cuya actividad lipolítica es muy pronunciada, originando muchas veces la aparición de sabores rancios (Fox y col., 1993; Menéndez y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000).

Clasificación de los quesos según su nivel de lipólisis

Es difícil establecer la contribución que realizan los AGL al aroma y sabor de los quesos, debido a la influencia de factores tales como características físico-químicas de la pasta, pH, contenido de calcio, repartición de ácidos grasos entre las fases grasa y acuosa y su asociación con proteínas y péptidos. Además, como ya se dijo anteriormente, los AGL son precursores de un sinnúmero de metabolitos secundarios y su concentración, sobre todo si es muy alta, puede disminuir durante la última etapa de la maduración. Por esta razón, la determinación de este parámetro en el queso ya maduro no siempre refleja fielmente el proceso general de lipólisis. Sin embargo, éste continúa siendo uno de los análisis de caracterización y clasificación más usados, ya que da una idea acertada de la extensión de la lipólisis en la mayoría de los quesos. Desde este punto de vista se pueden distinguir tres grandes categorías. En una primera se tienen aquellos productos que no superan los 1.000 mg AGL kg⁻¹ queso, que es el caso en donde no se utiliza ningún agente lipolítico en la elaboración. Se trata de productos con características organolépticas suaves, tales como Gouda, Comté o Cheddar, en donde la extensión de la lipólisis no excede al 2 % de los triglicéridos (1,5 % para Gouda, 2 % Comté y de 0,25 a 2 % para Cheddar), y los quesos blandos y semiduros argentinos. La segunda categoría está formada por quesos con una lipólisis más elevada, entre 1.000 y 10.000 mg AGL kg⁻¹, provocada por el uso de agentes medianamente lipolíticos como pueden ser los coagulantes en pasta, ciertos microorganismos que forman parte de lo que se ha definido como NSLAB, bacterias propiónicas u otras bacterias constitutivas de fermentos secundarios. Aquí se encuentran variedades de quesos duros italianos (Provolone, Pecorino Romano, Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Fiore Sardo), quesos madurados con bacterias en superficie (Limburger, Tilsit), quesos elaborados con leche de cabra, y quesos duros argentinos en los que se adicionaron lipasas exógenas durante el proceso de elaboración (Gripon, 1993; Fox y col., 1993; Zalazar, 1994; Deeth y Fitz-Gerald, 1995; Fox y McSweeney, 1998; Menéndez y col., 1999; Pinna y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000). La tercera categoría la forman los quesos en los cuales se han introducido agentes fuertemente lipolíticos,

de manera de provocar una hidrólisis de la materia grasa que se traduce en valores de más de 10.000 mg AGL kg⁻¹ queso (Poveda y col., 1999; Zalazar y Bernal de Zalazar, 1983). En esta categoría encontramos los quesos madurados por hongos, en los cuales también el nivel de proteólisis es muy elevado. En Camembert, el nivel de hidrólisis de los triglicéridos está entre el 5 y el 10 % del total (3-5 % para el clásico y 6-10 % para el de la región de Normandía). Este porcentaje asciende hasta un 20 % para quesos azules (8-10 % para el Roquefort), habiéndose encontrado valores de hasta el 25 % para Danish Blue. Los AG liberados tienen en su mayoría entre 4 y 20 átomos de carbono y provienen del metabolismo fúngico, aunque también se ha encontrado una baja cantidad de ácidos grasos de 4 y 6 carbonos, que estarían originados por la degradación de la lactosa y algunos aminoácidos. A pesar de la lipólisis tan elevada que sufren estos quesos, no se perciben sabores rancios, debido a la neutralización de los ácidos grasos libres a pH elevado (Lenoir y col., 1985; Fox y col., 1993; Gripon, 1993; Zalazar, 1994; Deeth y Fitz-Gerald, 1995; Conte y col., 1997; Fox y McSweeney, 1998; Choisy y col., 1999).

La Tabla 5 presenta valores de concentraciones de AGL en distintos tipos de quesos, donde pueden observarse las marcadas diferencias existentes entre ellos.

Tabla 5

Ácidos grasos libres en algunas variedades de quesos (adaptado de Perrotti, 2003)

Variedad de queso	Ác. grasos libres (mg kg ⁻¹ de queso)
Edam	356
Mozzarella	363
Por Salut	700
Cheddar	1.028
Gruyère	1.481
Limburger	4.187
Provolone	2.118
Parmesano	4.993
Roquefort	32.453
Blue	32.230

Influencia de la lipólisis en el sabor y aroma de distintas variedades de quesos

De acuerdo con la teoría del balance de los componentes, propuesta por Mulder en 1952 y aceptada en la actualidad, el aroma y sabor característicos de cada tipo de queso no se deben a la presencia de un único o unos pocos compuestos, como se pensaba en un principio sino al correcto balance de concentraciones de un gran número de sustancias, entre las que se encuentran los AGL y sus productos de transformación posterior. No obstante, para algunas variedades de quesos se estableció que un determinado grupo de compuestos es responsable casi totalmente del flavor (Lenoir y col., 1985; Fox y col., 1993; Deeth y Fitz-Gerald, 1995; Fox y McSweeney, 1998; Menéndez y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000). En Cheddar y variedades similares, si bien aún no se conoce con exactitud la contribución de diversos componentes al flavor, el rol de los AGL no parece ser importante. Por otro lado, niveles moderados de AGL (2.000 a 7.000 mg kg⁻¹ queso) realizan un aporte significativo al aroma de quesos Emmental, tanto en aquellos elaborados con leche cruda como con leche pasteurizada. En quesos madurados por hongos, si bien las metilcetonas son los compuestos que más se destacan desde el punto de vista organoléptico, los AGL también contribuyen en forma trascendente. Las elevadas concentraciones de los mismos encontradas en quesos azules (24.000 a 67.000 mg kg⁻¹ queso) se deben principalmente a la actividad fúngica, y en menor medida a la actividad de la lipasa de la leche y otras lipasas microbianas. Los quesos con desarrollo superficial de hongos, tales como Camembert y Brie, tienen una cantidad bastante alta de AGL, pero menor que los quesos azules. La explicación de este fenómeno reside en que en estos últimos el hongo se desarrolla en el interior de la masa del queso y, por lo tanto las lipasas fúngicas están más en contacto con la grasa. En Parmigiano Reggiano la lipólisis está causada principalmente por enzimas aportadas por bacterias lácticas, ya sean del fermento de suero natural o de contaminación (NSLAB). En esta variedad se identificaron ácidos grasos de entre 2 y 18 átomos de carbono, siendo los AGL de hasta 10 átomos de carbono los principales determinantes del flavor. No obstante, también se han encontrado ácidos grasos ramificados, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, lactonas, ésteres y compuestos heterocíclicos y aromáticos (Ha y Lindsay, 1991; Qian y Reineccius, 2002). Cabe destacar que en este tipo de queso la concentración de AGL aumenta con el tiempo de maduración pero, debido a la baja especificidad de las lipasas de origen bacteriano, el porcentaje relativo de cada uno se mantiene constante y cercano al correspondiente a la composición en ácidos grasos de la grasa de leche (Caboni y col., 1988; Sandri y col., 1997). La lipólisis elevada en Provolone, Peccorino Romano y Fiore Sardo se debe a la acción de la EPG, presente en los coagulantes en pasta empleados en la elaboración de estos que-sos (Barzaghi y col., 1997; Pinna y

col., 1999). En Fiore Sardo se observa un aumento general en la concentración de AGL durante la maduración pero, a diferencia del Parmigiano Reggiano, este incremento se acentúa para los AGL de cadena corta, lo que revela la especificidad de la EPG por estos sustratos. En quesos elaborados con leche termizada se encontraron cantidades menores de ácidos grasos de cadena corta y media que en quesos elaborados con leche cruda, debido a la destrucción parcial de la lipasa nativa de la leche (Pinna y col., 1999).

Referencias bibliográficas

- Banks, J.; Muir, D.; Brechany, E. y Law, A. (1992).** The production of low fat hard ripened cheese. Proc. 3rd. Cheese Symposium, National Dairy Products Research Centre, Moorepark, pp. 67-80.
- Barzaghi, S.; Davoli, E.; Rampilli, M. y Contarini, G. (1997).** La lipolisi nel formaggio Provolone: ruolo del caglio in pasta. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 48 (2), pp. 146-156.
- Bastian, E.; Lo, G. y David, K. (1997).** Plasminogen activation in cheese milk: influence on Swiss cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 245-251.
- Bergamini, C.; Candiotti, M.; Hynes, E. y Zalazar, C. (2005).** "Perfiles de proteólisis de quesos semiduros adicionados con distintas cepas probióticas". Proc. del Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, San Rafael, Mendoza.
- Bernal, S.; Palma, C.; Hynes, E. y Perotti, M. (2001).** Determinación de fracciones nitrogenadas para el seguimiento de la maduración de quesos. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 20, pp. 9-18.
- Bernal, S.; Palma, S. y Perotti, M. (2000).** Metodología rápida y precisa para la determinación de proteína en leche y productos lácteos. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 19, pp. 23-43.
- Bernal, S.; Perotti, M.; Zalazar, C.S.; Cardell, D. y Zalazar, C.A. (1998).** Evaluación de ácidos grasos libres en quesos argentinos. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 17, pp. 35-48.
- Büttkofer, U.; Rüeegg, M. y Ardö, Y. (1993).** Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technology*, vol. 26, pp. 271-275.
- Caboni, M.; Zannoni, M. y Lercker, G. (1988).** *Lipolisi del grasso del Parmigiano-Reggiano. Atti giornata studio composizione e caratteristiche Parmigiano-Reggiano*. Ed. Cons. Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia.
- Carles, C. y Ribadeau Dumas, B. (1985).** Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond on bovine α_{s1} -casein. *FEBS Letters*, vol. 185, pp. 282-286.
- Choisy, C.; Desmazeaud, M.; Gripon, J.; Lamberet, G.; Lenoir, J. y Tourneur, C. (1999).** Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. En: Eck, A. (ed.), *El Queso*, Parte 1. Editorial Omega, Barcelona.
- Coker, C.; Creamer, L.; Burr, R. y Hill, J. (1999).** The hydrolysis of the α_{s1} -casein A, B and C variants by plasmin and chymosin. *International Dairy Journal*, vol. 9, pp. 371-372.
- Collins, Y.; McSweeney, P. y Wilkinson, M. (2003).** Lipolysis and free fatty acids catabolism in cheese: a review of the current knowledge. *International Dairy Journal*, vol. 13, pp. 841-866.
- Conte, L.; Boschelle, O. y Koprivnjak, O. (1997).** Evoluzione della frazione diglicerida durante la maturazione del formaggio Gorgonzola. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 48 (2), pp. 171-180.
- Corradini, C. (1995).** *Chimica e tecnologia del latte*. Tecniche Nuove, Milano.
- Corradini, C. y Zalazar, C. (1990).** La valoración analítica de los coagulantes de leche. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 3, pp. 31-45.
- Creamer, L. (1991).** Electrophoresis of cheese. En: Monograph on chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. International Dairy Federation, Bulletin N° 261, pp. 14-28.
- Deeth, H. y Fitz-Gerald, C. (1995).** Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. En: Fox, P. (ed.), *Advanced Dairy Chemistry*. Vol. 2: Lipids. Chapman & Hall, London.

- de Jong, L. (1976).** Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1. Proteolysis and consistency of Norhollandse Meshanger cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 30, pp. 242-253.
- de Jong, L. (1978).** The influence of the moisture content on the consistency and protein breakdown of cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 32, pp. 1-14.
- de la Fuente, M. y Juárez, M. (1993).** Revisión: Determinación de ácidos grasos libres en productos lácteos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 33, pp. 247-269.
- Dulley, J. (1976).** The utilization of cheese slurries to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 31, pp. 143-148.
- El Soda, M.; Madkor, S. y Tong, P. (2000).** Adjunct cultures: recent developments and potential significance to cheese industry. *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 609-619.
- Engels, W.; Dekker, R.; de Jong, C.; Neeter, R. y Visser, S. (1997).** A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, vol. 7, pp. 255-263.
- Farkye, N. y Landkammer, C. (1992).** Milk plasmin activity influence on Cheddar cheese quality during ripening. *Journal of Food Science*, vol. 57, pp. 622-624.
- Fernández, V.; Candiotti, M.; Perotti, M.; Bernal, S. y Zalazar, C. (2004).** "Determinación de la actividad de plasmina en quesos típicos argentinos". Libro de resúmenes del Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos (editado en CD), Córdoba.
- FIL-IDF (1999).** Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation (Part 2). International Dairy Federation, Bulletin N° 337.
- FIL-IDF (1992).** Bovine rennets. Determination of total milk-clotting activity. International Dairy Federation, Standard 157.
- FIL-IDF (1991).** Determination of free fatty acids in milk and milk products. International Dairy Federation, Bulletin N° 265.
- Fox, P. y Guinee, T. (1987).** Italian cheese. En: Fox, P. (ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 2, Major Cheese Groups. Chapman & Hall, London.
- Fox, P.; Law, J.; McSweeney, P. y Wallace, J. (1993).** Biochemistry of cheese ripening. En: Fox, P. (ed.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 1, General aspects. Chapman & Hall, London.
- Fox, P. (1988).** Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnology and Applied Microbiology*, vol. 10, pp. 522-535.
- Fox, P. (1989).** Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 1.379-1.400.
- Fox, P. y McSweeney, P. (1995).** Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. En: Law, B. (ed.), *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Blackie Academic & Professional, London.
- Fox, P. y McSweeney, P. (1996).** Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, vol. 12, pp. 457-509.
- Fox, P. y McSweeney, P. (1998).** *Cheese ripening in dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic & Professional, London, pp. 403-415.
- Fox, P. y Stepaniak, L. (1993).** Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 509-530.
- Giraffa, G. y Olivari, G. (1992).** Impiego di glucono delta lattone nella fabbricazione di formaggi. Nota II: mozzarella. *L'Industria del Latte*, vol. 28, pp. 59-72.
- Gouldsworthy, A.; Banks, J.; Law, A. y Leaver, J. (1999).** Casein degradation in Cheddar cheese monitored by capillary electrophoresis. *Milchwissenschaft*, vol. 54, pp. 620-623.
- Grappin, R.; Rank, T. y Olson, N. (1985a).** Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*, vol. 68, pp. 531-540.
- Grappin, R.; Rank, T. y Olson, N. (1985b).** Secondary proteolysis of cheese during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*, vol. 68, pp. 801-805.
- Gripon, J. (1993).** Mould - ripened cheeses. En: Fox, P. (ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 2, Major cheese groups. Chapman & Hall, London.
- Grufferty, M. y Fox, P. (1988).** Milk alkaline protease. *Journal of Dairy Research*, vol. 55, pp. 609-630.
- Ha, J. y Lindsay, R. (1991).** Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian

- cheese flavors. *Journal of Food Science*, vol. 56, pp. 1.241-1. 250.
- Huck, J. y Zalazar, C. (1971/72).** Determinación de las condiciones óptimas de proceso para la producción industrial de cuajo en polvo. I. Estudios preliminares. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, 40/41, pp. 185-194.
- Hynes, E. (1998).** Estudio de la proteólisis durante la maduración de quesos blandos. Cremoso argentino. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Hynes, E.; Bergamini, C.; Suárez, V. y Zalazar, C. (2003).** Proteolysis on Reggiano Argentine cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 3831-3840.
- Hynes, E.; Delacroix-Bouchet, A.; Meinardi, C. y Zalazar, C. (1999a).** Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheeses. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 54, pp. 24-27.
- Hynes, E.; Delacroix-Bouchet, A. y Zalazar, C. (2001a).** Influence of milk-clotting enzyme in proteolysis during ripening of Cremoso Argentine cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 56, pp. 208-212.
- Hynes, E.; Meinardi, C.; Sabbag, N.; Cattaneo, T.; Candiotti, M. y Zalazar, C. (2001b).** Influence of milk-clotting enzyme concentration on the α_{s1} -casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 1335-1340.
- Hynes, E.; Ogier, J. y Delacroix-Bouchet, A. (2000a).** Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 733-737.
- Hynes, E. y Zalazar, C. (2000b).** Acción de la enzima coagulante durante la elaboración y maduración de quesos. Una revisión. Primera parte. *Industria Lechera*, vol. 724, pp. 8-14.
- Hynes, E. y Zalazar, C. (2000c).** Acción de la enzima coagulante durante la elaboración y maduración de quesos. Una revisión. Segunda parte. *Industria Lechera*, vol. 725, pp. 48-54.
- Hynes, E.; Zalazar, C. y Delacroix-Bouchet, A. (1999b).** Proteolysis during ripening of soft cheese. II. Effect of milk-clotting enzyme on Cremoso Argentine cheese ripening. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 17, pp. 199-205.
- Hynes, E.; Zalazar, C. y Meinardi, C. (1999c).** Maduración de quesos blandos. Descripción sencilla de un proceso complejo. *Industria Lechera*, vol. 720, pp. 8-16.
- Jang, H-D. y Lee, H-J. (1985).** Fermentation characteristics of cheese slurry prepared from caseinates. *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol. 17, pp. 389-398.
- Jonsson, M. y Fredriksson, S. (1978).** Isoelectric focusing of the phosphoprotein in rat-incisor dentin in ampholine and acid pH gradients. *Journal of Chromatography*, vol. 157, pp. 235-242.
- Kleter, G. (1975).** Apparatus for making cheese under strict aseptic conditions. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 29, pp. 295-302.
- Kleter, G. (1976).** The ripening of Gouda cheese made under strict aseptic conditions. 1. Cheese with no other bacterial enzymes than those from a starter streptococcus. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 30, pp. 254-270.
- Lamberet, G. y Lenoir, J. (1976).** Les caracteres du systeme lipolytique de l'espece *Penicillium casei-column*. Nature du systeme. *Le Lait*, vol. 56, pp. 119-134.
- Lawrence, R.; Creamer, L. y Gilles, J. (1987).** Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 70, pp. 1748-1760.
- Lenoir, J.; Lamberet, G.; Schmidt, J. y Tourneur, C. (1985).** La maitrise du bioréacteur fromage. *Biofutur*, Décembre, pp. 23-50.
- Lecanu, L.; Ducruet, V.; Jouquand, C.; Gratedoux, J. y Feigenbaum, A. (2002).** Optimization of head-space solid-phase microextraction (SPME) of the odor analysis of surface-ripened cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 50, pp. 3810-3817.
- McSweeney, P. y Fox, P. (1993).** Cheese: methods of chemical analysis. En: Fox, P. (ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 1, General aspects. Chapman & Hall, London.
- McSweeney, P. y Fox, P. (2004).** Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. En: Fox, P.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T. (eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 1, General aspects. Elsevier Ltd., London.

- McSweeney, P.; Fox, P. y Law, J. (1993a).** Contribution of cell wall-associated proteinases of *Lactococcus* to the primary proteolysis of β -casein in Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, vol. 48, pp. 319-321.
- McSweeney, P.; Olson, N.; Fox, P.; Healy, A. y Højrup, P. (1993b).** Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Research*, vol. 60, pp. 401-412.
- McSweeney, P. y Sousa, M. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: a review. *Le Lait*, vol. 80, pp. 293-324.
- Meinardi, C.; Alonso, A.; Hynes, E. y Zalazar, C. (2002).** Influence of milk clotting enzymes on the acidification rate of natural whey starters. *International Journal of Dairy Technology*, vol. 55, pp. 139-144.
- Meinardi, C.; Hynes, E.; Garnero, D. y Zalazar, C. (1998).** Methodology and equipment for making rennet-free cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 53, pp. 149-151.
- Menéndez, S.; Godínez, R. y Rodríguez-Otero, J. (1999).** Fenómenos bioquímicos durante la maduración del queso. *Alimentación, equipos y tecnología*, julio-agosto, pp. 97-105.
- Minkiewicz, P.; Slangen, C.; Dziuba, J.; Visser, S. y Mioduszewska, H. (2000).** Identification of peptides obtained via hydrolysis of bovine casein by chymosin using HPLC and mass spectrometry. *Milchwissenschaft*, vol. 55, pp. 14-17.
- Miralles, B.; Ramos, M. y Amigo, L. (2000).** Application of capillary electrophoresis to the characterization of processed cheeses. *Journal of Dairy Research*, vol. 67, pp. 91-100.
- Mulvihill, D. y Fox, P. (1979).** Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} casein. *Journal of Dairy Research*, vol. 46, pp. 641-651.
- Nelson, J.; Jensen, R. y Pitas, R. (1977).** Pregastric esterase and other oral lipases. A review. *Journal of Dairy Science*, vol. 60, pp. 327-362.
- Noonen, A. (1978a).** Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). 1. Activity of milk protease. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 32, pp. 26-47.
- Noonen, A. (1978b).** Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). 2. Activity of calf rennet. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 32, pp. 49-68.
- O'Farrel, P. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, pp. 4007-4021.
- Ollikainen, P. y Kivela, T. (1989).** The importance of plasmin in Swiss-type cheese ripening. *Milchwissenschaft*, vol. 44, pp. 204-206.
- Perotti, M. (2003).** Influencia del reemplazo de suero fermento natural por cepas seleccionadas, sobre el proceso de lipólisis de quesos duros típicos argentinos. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Pinna, G.; Pirisi, A.; Piredda, G.; Addis, M. y Di Salvo, R. (1999).** Effetto della termizzazione del latte sul fromaggio dop Fiore Sardo: andamento della lipolisi nel corso della maturazione. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 50 (5), pp. 366-377.
- Politis, I.; Barbano, D. y Gorewit, R. (1992).** Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, vol. 75, pp. 1402-1410.
- Poveda, J.; Pérez-Coello, M. y Cabezas, L. (1999).** Evolution of the free fatty acid fraction in Manchego cheese during ripening. *Milchwissenschaft*, vol. 54, pp. 685-687.
- Qian, M. y Reineccius, G. (2002).** Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 1362-1369.
- Qian, M. y Reineccius, G. (2003).** Quantification of aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese by a dynamic headspace gas chromatography-mass spectrometry technique and calculation of odor activity value. *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 770-776.
- Rampilli, M. y Raja, V. (1998).** Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 49, pp. 341-350.
- Righetti, P. (1977).** Isoelectric focusing of milk-clotting enzymes. *Journal of Dairy Research*, vol. 44, pp. 69-72.
- Ross, R.; Fitzgerald, G.; Collins, J. y Stanton, C. (2002).** Cheese delivering biocultures-probiotic

- cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 57, pp. 71-78.
- Salvadori del Prato, O. (1998).** Il caglio e i coagulanti del latte. Caratteristiche e impiego. *Il Latte*, vol. 23, pp. 60-73.
- Salvadori del Prato, O. y Messina, G. (1990).** *Il Provolone e altre paste filate*. Istituto Sperimentale Lattiero-Caseario, Lodi.
- Sandri, S.; Fossa, E.; Pecorari, M.; Summer, A. y Mariani, P. (1997).** Osservazioni sull'andamento della lipolisi nel corso della maturazione del Parmigiano Reggiano. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 48 (3), pp. 243-252.
- Shakeel-Ur-Rehman; Feeney, E.; McSweeney, P. y Fox, P. (1998).** Inhibition of residual coagulant in cheese using pepstatin. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 987-992.
- Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P.; McSweeney, P.; Madsen, S. y Farkye, N. (2001).** Alternatives to pilot plant experiments in cheese-ripening studies. *International Journal of Dairy Technology*, vol. 54, pp. 121-126.
- Shalabi, S. y Fox, P. (1987).** Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology*, vol. 11, pp. 135-151.
- Stanton, C.; Gardiner, G.; Lynch, P.; Collins, J.; Fitzgerald, G. y Ross, R. (1998).** Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, vol. 8, pp. 491-496.
- Tavaria, F.; Dahl, S.; Carballo, F. y Malcata, F. (2002).** Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 2462-2470.
- Trieu-Cout, P. y Gripon, J. (1983).** Etude électrophorétique de la protéolyse au cours de l'affinage des fromages à pâte persillée du type bleu d'Auvergne. *Le Lait*, vol. 63, pp. 116-128.
- Urbach, G. (1993).** Relations between cheese flavor and chemical composition. *International Dairy Journal*, vol. 31, pp. 389-422.
- Vassal, L.; Monnet, V.; Le Bars, D.; Roux, C. y Gripon, J. (1986).** Relation entre le pH, la composition et la texture des fromages de type Camembert. *Le Lait*, vol. 66, pp. 341-351.
- Vicente, M.; Ibáñez, F.; Barcina, Y. y Barron, L. (2000).** Casein breakdown during ripening of Idiazábal cheese: influence of starter and rennet type. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 8, pp. 210-215.
- Visser, F. (1976).** Method for the manufacture of rennet-free cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, vol. 30, pp. 41-54.
- Visser, S. (1993).** Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 329-350.
- Weber, K. y Osborn, M. (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, pp. 4406-4412.
- Weckx, M. y Vanderpoorten, R. (1973).** Protein breakdown during the ripening of Herve cheese investigated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Milchwissenschaft*, vol. 28, pp. 332-338.
- Zalazar, C. y Bernal de Zalazar, S. (1983).** Estudio sobre las características de los quesos madurados con la adición de hongos. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, vol. 43, pp. 25-31.
- Zalazar, C.; Meinardi, C.; Candiotti, M.; Bernal, S. y Hynes, E. (1995).** La maduración del queso Cremoso Argentino. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 11, pp. 59-72.
- Zalazar, C. (1994).** Bioquímica de la maduración de quesos. En: Ciencia y tecnología de los productos lácteos. Medios Audiovisuales y Gráficos CERIDE, Santa Fe.

Capítulo 2

Rol de las NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) en la maduración de quesos

Erica R. Hynes y Carina V. Bergamini

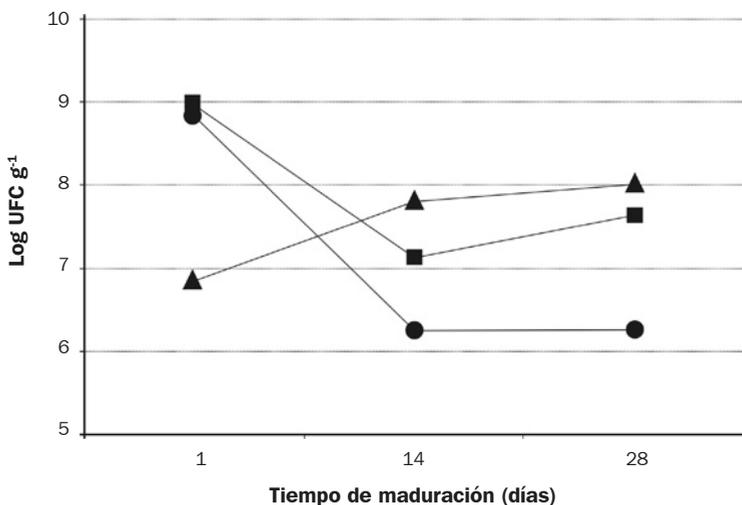
Durante la fabricación del queso, las bacterias lácticas del “starter”, fermento primario o cultivo iniciador, fermentan la lactosa para dar ácido láctico, lo que constituye su rol tecnológico principal, ya que el descenso de pH favorece la coagulación y preserva el producto final de contaminaciones con microorganismos no lácticos indeseables. El fermento láctico influye además en el desarrollo del aroma y sabor del queso durante la maduración (Choisi y col., 1997). Las bacterias del fermento primario son agregadas a la leche en altas concentraciones y los recuentos alcanzan 10^8 - 10^9 UFC g^{-1} de cuajada después de la manufactura, pero luego comienzan a morir y a sufrir lisis a una velocidad que depende de la especie y de la cepa (Chapot-Chartier y col., 1994).

Mientras la población del fermento declina, otro importante grupo microbiano incrementa su número en el queso. Se trata de la flora secundaria, denominada generalmente NSLAB por sus siglas en inglés: “non starter lactic acid bacteria”, bacterias lácticas no provenientes del fermento. En quesos fabricados con leche pasteurizada las NSLAB son bacterias lácticas que contaminan la leche ya sea después de la pasteurización, o bien que sobreviven al tratamiento térmico aun en baja proporción o en un estado no cultivable (Turner y col., 1986). Probablemente, las principales fuentes de contaminación son la leche cruda y una flora residente en la planta láctea, que entra en contacto con la leche a través de superficies de equipos o del aire, y que tiene

origen en la misma leche cruda (Naylor y Sharpe, 1958). Se ha mencionado también que la existencia de biofilmes en las superficies puede contribuir a la aparición de este grupo microbiano en el queso (Somers y col., 2000). Las NSLAB crecen a partir de recuentos muy bajos (10 a 10^4 UFC mL^{-1} , según se trate de leche pasteurizada o cruda) hasta 10^7 - 10^8 UFC g^{-1} de queso durante las primeras semanas de la maduración, y por lo tanto se convierten en la flora dominante una vez que la población de bacterias del fermento primario comienza a declinar (Figura 1). La flora no proveniente del fermento de los quesos elaborados con leche pasteurizada está formada casi exclusivamente por lactobacilos mesófilos, pero se han detectado también pediococos y enterococos (Peterson y Marshall, 1990; McSweeney y col., 1993; Lynch y col. 1996; Lane y col., 1997; Corsetti y col., 1998; Perreard, 1998). Los quesos elaborados con leche cruda también presentan una flora secundaria compuesta principalmente por estos géneros, aunque las proporciones varían según el tipo de queso y su origen (McSweeney y col., 1993; Berthier y col., 2001; Tavaría y Malcata, 2003, entre otros).

Figura 1

Evolución de las poblaciones del fermento primario (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2) y del fermento adjunto (*Lactobacillus casei* CNRZ 1244) en un queso modelo miniatura de pasta lavada (Hynes y col., 2003b)



●: recuento de *L. lactis* en queso testigo (sin lactobacilos); ■: recuento de *L. lactis* en queso experimental (con lactobacilos); ▲: recuento de lactobacilos en queso experimental

Factores que influyen en la velocidad de crecimiento y número de las bacterias lácticas no provenientes del fermento y en sus actividades bioquímicas

Fermento primario o de acidificación

El género, especie y cepa de las bacterias utilizadas como fermento primario o iniciador en la fabricación del queso parecen tener una importante influencia en la velocidad de crecimiento y en el número final alcanzado por la población de bacterias lácticas no provenientes del fermento, así como en sus actividades bioquímicas durante la maduración del queso. Thomas (1987) demostró que varias cepas de lactobacilos aisladas de queso podían crecer en un medio compuesto únicamente por células de lactococos sometidas a tratamientos para producir la lisis bacteriana, y basándose en estos resultados sugirió que las células del fermento primario proveían los nutrientes necesarios para el crecimiento de las NSLAB. Thomas (1987) y otros autores sugieren que el factor limitante para el crecimiento de la flora secundaria en el queso es la fuente de carbono y no la de nitrógeno, ya que se trata de un medio con muy poca cantidad de azúcares fermentables pero con mayor disponibilidad de péptidos y aminoácidos libres. Sin embargo, también se ha postulado que el uso de fermentos primarios que mueren y sufren lisis permite la liberación de enzimas peptidasas a la masa del queso, lo que a su vez se traduce en un mayor contenido de aminoácidos libres y en un mayor crecimiento de la flora secundaria (Martley y Crow, 1993; Crow y col., 1995). A pesar de la importancia de este tema, existen muy pocos trabajos de investigación que abordan la temática de la interacción entre el fermento primario de acidificación y la flora secundaria (Lane y col., 1997; Hynes y col., 2001).

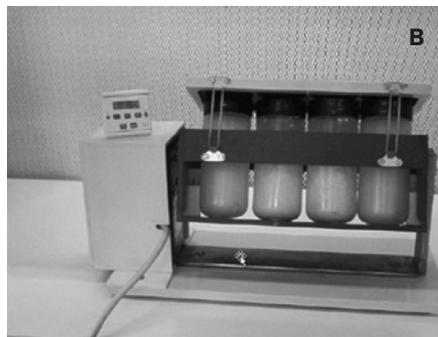
Lane y col. (1997) estudiaron el efecto de la cepa de fermento primario en la velocidad de crecimiento de las bacterias no fermento autóctonas en queso Cheddar. La flora secundaria se incrementó significativamente más rápido en quesos elaborados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3 o 303, que en aquellos preparados con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 o AM2. La población de los dos primeros fermentos se mantuvo elevada durante toda la maduración (mayor a $10^8 - 10^9$ UFC g^{-1}) mientras que en los dos segundos descendió rápidamente a $\sim 10^5$ UFC g^{-1} , lo que indica que la muerte y posterior lisis del cultivo iniciador no beneficiaron el crecimiento de las bacterias de la flora secundaria.

Por otra parte, la cepa de *Lactobacillus plantarum* CNRZ1572, aislada de queso, fue estudiada por Hynes y col. (2001) como fermento adjunto en presencia de tres fermentos primarios distintos, en un modelo consistente en quesos miniatura de pasta lavada obtenidos en condiciones microbiológicas

controladas (Figura 2, Hynes y col., 2000). Los fermentos fueron *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL416, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP, que muestran diferentes características: el primero posee varios mecanismos de resistencia al ataque de fagos (Cluzel y col., 1991), el segundo hospeda un profago que produce una rápida lisis luego de la fabricación del queso (Chapot-Chartier y col., 1994), y el tercero ha sido calificado como un fermento que produce quesos amargos (O'Donovan y col., 1996). En este estudio se verificó que la cepa lítica (AM2) no favorecía el crecimiento de los lactobacilos, que alcanzaron el mismo nivel que en el queso elaborado con IL416, cuya población se mantuvo en 10^9 UFC g^{-1} durante toda la maduración (Figura 3, a y b). Otro hecho interesante es que la población de AM2 fue mayor en quesos experimentales, es decir, con fermento adjunto de lactobacilos, lo que sugiere que dicho fermento favoreció la supervivencia de esta cepa lítica en las condiciones estudiadas (Hynes y col., 2001). La cepa de *L. lactis* HP posee únicamente proteasa de pared tipo P_I, caracterizada por hidrolizar la caseína β en forma relativamente rápida y extensa para dar los fragmentos β (f176-182) y β (f194-209) y los componentes de alto peso molecular β I y β II (Visser, 1993). En los quesos elaborados con este fermento el crecimiento de los lactobacilos fue más lento, pero mostró el mayor valor alcanzado al final de la maduración (Figura 3c) (Hynes y col., 2001).

Figura 2

Elaboración de quesos miniatura en condiciones microbiológicas controladas. **A:** material de elaboración: potes grandes para coagulación y pequeños para moldeo, leche, fermento, coagulante, liras miniatura, etc. **B:** agitación por inversión de los potes. **C:** quesos miniatura después del trasvasado a potes más pequeños y centrifugado. **D:** quesos miniatura en cajas estériles, antes y después del parafinado (Hynes y col., 2000)



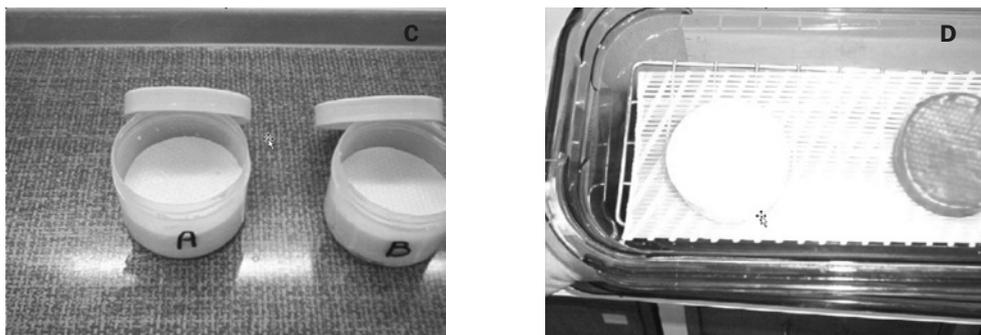
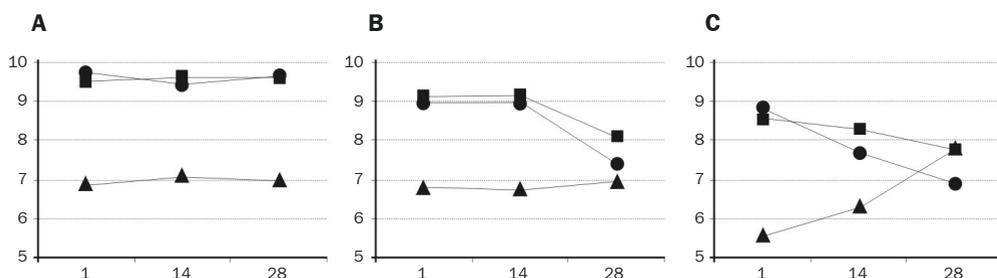


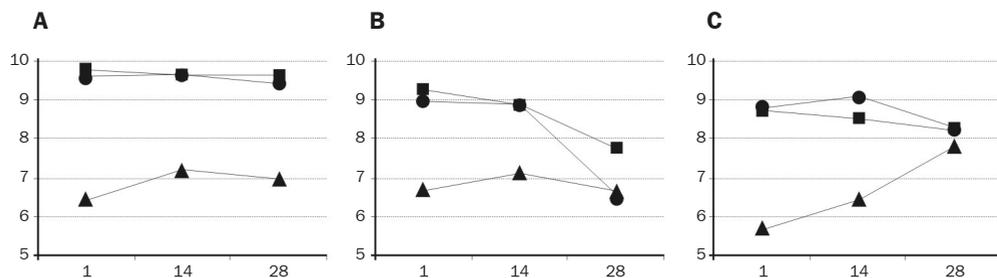
Figura 3

Evolución de las poblaciones fermento primario y fermento adjunto en quesos experimentales y testigos miniatura de pasta lavada. **A:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL416. **B:** *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. **C:** *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP (Hynes y col., 2001)

Experiencia 1



Experiencia 2

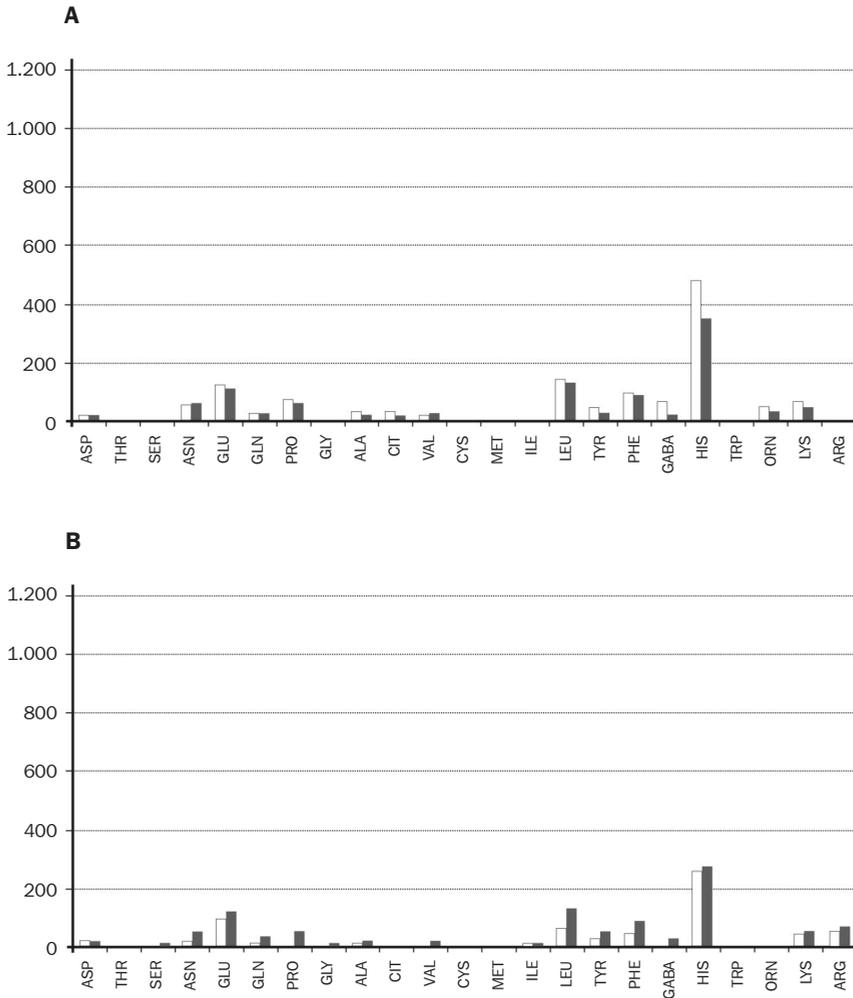


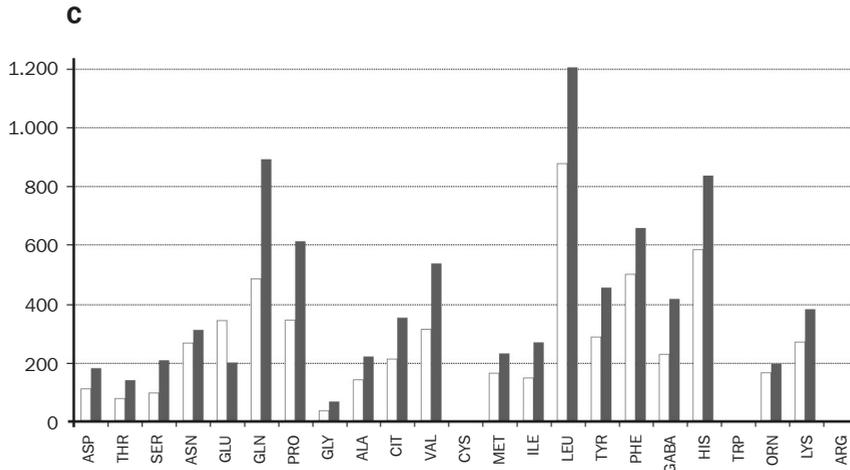
●: recuento de *L. lactis* en queso testigo (sin lactobacilos); ■: recuento de *L. lactis* en queso experimental (con lactobacilos); ▲: recuento de lactobacilos en queso experimental

El fermento primario mostró interacción con los lactobacilos no solamente desde el punto de vista del crecimiento; también se registraron diferencias en los productos finales de proteólisis de los quesos modelo elaborados. En efecto, el perfil de aminoácidos libres se modificó de acuerdo con la combinación lactococo-lactobacilo utilizada (Figura 4).

Figura 4

Perfil de aminoácidos libres (AAL) en: □: quesos testigo (sin lactobacilos) y; ■: quesos experimentales (con lactobacilos), a los 28 días de maduración. **A:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL416. **B:** *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. **C:** *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP (Hynes y col., 2001)





Un estudio reciente se ha centrado en la investigación de la influencia de proteasas de pared parcialmente purificadas provenientes de distintos fermentos sobre el crecimiento de la cepa de *Lactobacillus plantarum* DPC2741, demostrando que todas las proteasas ensayadas favorecían el crecimiento de los lactobacilos y aumentaban su actividad bioquímica, aunque las proteinasas aisladas de *Lactobacillus helveticus* PR4 y de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ST2 fueron las más efectivas (Di Cagno y col., 2003).

Los estudios citados permitieron clarificar la interacción entre la flora fermento y no fermento en el queso, ya que en los casos estudiados las proteasas de pared parecen jugar un rol más determinante que la lisis del fermento primario, asociada con la liberación de peptidasas. El mecanismo propuesto, entonces, consiste en la liberación de oligopéptidos por parte de las proteasas del fermento, cuyo tipo, tamaño, facilidad de ingreso en la célula y velocidad de producción modularían el crecimiento y las actividades bioquímicas de la flora NSLAB durante la maduración (Di Cagno y col., 2003).

Si bien los progresos realizados en el estudio de las interacciones bacterianas fermento láctico-NSLAB son de gran importancia, se trata de una línea de investigación que necesita mayor desarrollo, especialmente en el estudio de la interacción entre fermentos primarios termófilos, como los que se utilizan en nuestro país, y cepas de lactobacilos mesófilos.

Factores ambientales

El queso constituye un medioambiente hostil para el desarrollo bacteriano. En efecto, las condiciones ambientales promedio se caracterizan por pH bajo (4,8

- 5,4), ausencia o muy bajas concentraciones de azúcares fermentables, humedad relativamente reducida (40 al 60 %), presencia de sal (2 a 6 % de sal en la humedad) y bajas temperaturas de maduración (7° a 12 °C aproximadamente). Sin embargo, en estas condiciones la población de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento se incrementa desde valores muy reducidos hasta números elevados, que se mantienen durante tiempos de maduración prolongados.

Fuente de energía

La lactosa residual que queda en la cuajada ha sido señalada como el primer sustrato de las NSLAB en queso, que provee la energía necesaria para el crecimiento inicial de las mismas, y que luego de su agotamiento es reemplazada por otras fuentes aún no totalmente esclarecidas (Williams y col., 2000). Lane y Fox (1996), y Lynch y col. (1997) elaboraron quesos acidificados biológicamente con un cultivo primario o químicamente con δ -lactona del ácido glucónico, un compuesto acidógeno que se hidroliza lentamente para dar ácido glucónico, produciendo una curva de pH similar a la que se verifica al usar un fermento. Estos autores comprobaron que los lactobacilos adventicios contaminaron rápidamente el queso acidificado químicamente, que contenía mayor cantidad de lactosa, mientras que en el queso elaborado con un cultivo primario, prácticamente libre de lactosa residual, el crecimiento de las NSLAB fue más lento.

En los quesos elaborados con fermentos primarios compuestos por *Streptococcus thermophilus* puede producirse una acumulación de galactosa en el producto ya que la mayoría de las cepas de esta especie utilizan solamente la glucosa proveniente de la hidrólisis de la lactosa, pero no son capaces de metabolizar la unidad de galactosa. En quesos Cheddar elaborados con *Streptococcus thermophilus* se encontró una estrecha correlación entre la desaparición de la galactosa en el queso y el crecimiento de los lactobacilos adventicios o agregados como fermento adjunto, lo que sugiere que este carbohidrato puede ser utilizado como fuente de energía por las NSLAB (Michel y Martley, 2001).

La utilización de la galactosa residual por flora adventicia ha sido señalada como fuente de defectos en quesos tipo suizo, como Gruyère o similares, que requieren el desarrollo de flora propiónica. En efecto, existe la hipótesis de que si se produce un desequilibrio en el ecosistema del fermento de acidificación, generalmente compuesto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus*, éste llevará a la consecuente acumulación de galactosa en el producto. En estas condiciones se vería favorecido el crecimiento de los lactobacilos mesófilos adventicios (flora NSLAB). Si dicha flora se vuelve dominante podría a su vez causar problemas en el posterior desarrollo de los propiónicos, por ejemplo provocando la racemización del L-lactato, sustrato de la fermentación propiónica, a D-lactato, que la flora propiónica metaboliza con dificultad (Fox y

col., 1993). Se ha informado asimismo que *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum* podrían tener un efecto inhibitorio sobre bacterias propiónicas y enterococos en el queso, aunque el mecanismo de inhibición no fue explicado. El hecho de que la inhibición se verificara solamente en extracto de queso y no en otros medios, donde incluso se detectó estimulación de la flora propiónica por parte de estos lactobacilos, sugiere que no se trata de una inhibición por bacteriocinas sino probablemente de una competencia por los metabolitos limitantes. Por otra parte, en numerosos estudios llevados a cabo en quesos tipo suizo se ha comprobado que es normal que las NSLAB alcancen altas densidades durante la incubación en cámara tibia, sin que por ello aparezcan defectos asociados (Beresford y col., 2001). Probablemente, el orden en que cada flora se establece en el queso, y no su sola presencia o ausencia en el producto, esté relacionada con la aparición de defectos.

Si bien varias cepas de lactobacilos aislados de quesos fueron capaces de metabolizar el citrato en presencia o ausencia de azúcares fermentables a pH similar al del queso, no lo utilizaron como fuente de energía. La racemización del L-lactato a D-lactato, producida por muchas cepas de NSLAB tampoco parece ser útil para la obtención de energía por parte de la célula (Beresford y col., 2001). Una hipótesis indica que las NSLAB podrían obtener energía de los carbohidratos de alto peso molecular asociados con la membrana del glóbulo graso o a las micelas de caseína o provenientes de las células del fermento, ya que algunas cepas demostraron actividad glicosido hidrolasa (Williams y Banks, 1997). Sin embargo, esta hipótesis requiere de mayor información para ser probada. Por otra parte, algunas de las sustancias mencionadas como potenciales fuentes de energía, por ejemplo el ácido N-acetil neuramínico (NANA), se encuentran en la leche, medio en el cual las NSLAB en general no crecen bien, y aparecen en concentraciones extremadamente reducidas en queso, donde por el contrario estas bacterias se desarrollan rápidamente.

Temperatura

La temperatura es uno de los factores que impacta de manera más significativa en el crecimiento bacteriano en todos los tipos de queso. Lane y col. (1997) estudiaron la influencia de varios factores ambientales en el incremento de la población de bacterias no fermento en queso Cheddar, y determinaron que dicha flora se desarrolla más rápidamente a temperaturas más elevadas. Las poblaciones promedio alcanzadas por la flora adventicia que no proviene del fermento fueron de 1×10^8 , 1×10^7 y 8×10^4 UFC g^{-1} en quesos madurados a 12°, 8° y 4 °C respectivamente, a los seis meses de maduración. La temperatura también modificó la viabilidad del fermento, que decreció más rápidamente a mayores temperaturas, aunque los autores no obtuvieron resultados reproducibles en este aspecto de su estudio.

Shakeel-Ur-Rehman y col. (2000a) encontraron 3 órdenes logarítmicos menos de bacterias no fermento en quesos Cheddar madurados a 1 °C, con respecto a las muestras maduradas a 8 °C, a los 4 meses de maduración. Al final de la maduración (6 meses) la diferencia fue de 2 órdenes logarítmicos. Estos autores encontraron que la disminución de la temperatura era el medio más eficaz para mantener un queso libre de NSLAB durante largos períodos de maduración, incluso más que el agregado de antibióticos o la elaboración aséptica, que se han utilizado con fines experimentales para determinar el rol de esta flora en la maduración. Sin embargo, a temperaturas de maduración tan bajas los fenómenos bioquímicos se vuelven lentos, y los autores encontraron que a 1 °C los quesos de cuatro y seis meses eran muy similares y mostraban un grado de proteólisis netamente inferior a los quesos almacenados en cámaras a 8 °C. Esto significa que, si bien disminuir la temperatura de maduración para mantener un queso libre de bacterias no fermento puede ser interesante desde un punto de vista científico, no es una estrategia apropiada desde el punto de vista industrial ya que provocaría un alargamiento del período de maduración. Esto no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que una de las estrategias propuestas para acelerar la maduración del queso Cheddar, por ejemplo, es elevar a 15 °C la temperatura de maduración. Según lo demostrado por Shakeel-Ur-Rehman la temperatura de maduración es un factor que influye radicalmente en la bioquímica de la maduración y la calidad del producto final, tanto como el tiempo de maduración y la existencia o no de un tratamiento térmico (pasteurización) en la leche de elaboración.

Humedad

Las bacterias no fermento muestran una etapa de latencia más corta en quesos con humedad elevada pero, luego de esta etapa la velocidad de crecimiento es similar y aparentemente independiente de la humedad. Después de 12 semanas, varios quesos Cheddar preparados con distintos grados de humedad mostraron igual número de NSLAB (Lane y col., 1997).

Sal en la humedad

A valores normales no se encontraron diferencias en el número alcanzado o la velocidad de crecimiento de las bacterias no fermento (2,85 - 5,37 % de sal en la humedad). A valores mayores (6,09 %) las bacterias no fermento crecieron lentamente, pero alcanzaron números finales similares a los otros quesos a los seis meses de maduración. Se ha sugerido que las NSLAB soportan mejor que las bacterias lácticas del fermento las concentraciones elevadas de sal en la humedad del queso, razón por la cual los quesos excesivamente salados podrían constituir un medioambiente favorable al crecimiento de esta flora

adventicia (Fox y col., 1993). Sin embargo, esto depende de la especie y la cepa del fermento de acidificación utilizado (Lane y col., 1997).

pH

El estudio de la influencia del pH en el crecimiento de la flora que no proviene del fermento no puede inferirse de los trabajos de investigación existentes, ya que a diferentes valores de pH corresponden diferentes cantidades de lactosa residual en el queso (Lane y col., 1997). En efecto, si se detiene la fermentación del cultivo primario o se agregan cantidades menores de éste, para obtener quesos con pH más elevados que lo usual, la lactosa residual es mayor que en el queso estándar e influye en el comportamiento de la flora no perteneciente al fermento. Una alternativa para el estudio de la influencia del pH en el crecimiento de las NSLAB sería la utilización de modelos casearios con el pH ajustado después de la metabolización completa de la lactosa, o bien pseudo cuajadas preparadas con caseinato y llevadas a pH con acidificantes químicos.

Actividades enzimáticas de la flora láctica no proveniente del fermento

En comparación con los trabajos de investigación llevados a cabo para el género *Lactococcus*, existe poca información sobre las capacidades enzimáticas de los lactobacilos mesófilos del grupo II, heterofermentantes facultativos, principales componentes de la flora NSLAB. Recientemente, numerosos estudios se han concentrado en la investigación de las actividades proteolíticas, peptidolíticas y estererasas en lactobacilos y otros microorganismos no fermento aislados de queso (Williams y Banks, 1997; Crow y col., 2001; Tavaría y Malcata, 2003, entre otros). Asimismo, se han desarrollado varios proyectos de investigación sobre aminotransferasas en lactobacilos (Gummalla y Broadbent, 1999; Gummalla y Broadbent, 2001; Hansen y col., 2001).

Williams y Banks (1997) estudiaron numerosas cepas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus pentosus* entre otros, para determinar sus actividades hidrolíticas. La mayoría de las cepas mostraron una actividad proteolítica débil sobre el caseinato, lo que coincide con estudios anteriores que ya daban cuenta de la baja actividad proteolítica de las cepas NSLAB (Fox y McSweeney, 1996). Esta baja actividad se evidencia en el pobre crecimiento y acidificación que las bacterias no fermento muestran en la leche.

Por otra parte, la actividad de las endopeptidasas (enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en el interior de la cadena polipeptídica) fue

positiva en todos los aislamientos cuando se ensayó sobre reactivos sintéticos, mostrando grandes variaciones de actividad entre especies y de una cepa a otra de la misma especie. También se detectó actividad aminopeptidasa, es decir, la liberación de un aminoácido desde el extremo N terminal del péptido, y peptidasa (di y tripeptidasas, que hidrolizan di y tripéptidos) en la gran mayoría de los aislamientos estudiados.

Finalmente, la actividad aminotransferasa es de gran importancia para el desarrollo de “flavor” en el producto final a lo largo de la maduración. En efecto, los aminoácidos libres producidos en el queso por proteasas y peptidasas no forman parte del aroma y sabor como tales sino como precursores de otros compuestos que influyen en estos atributos. Se ha comprobado que las bacterias lácticas del fermento primario poseen enzimas denominadas aminotransferasas que catalizan reacciones de transaminación por medio de las cuales los aminoácidos libres se degradan a α -cetoácidos, que posteriormente se transforman en compuestos de aroma y sabor tales como aldehídos, alcoholes, ésteres y tioésteres. Actualmente se considera que esta etapa, y no la proteólisis, es la limitante en el desarrollo del flavor en el queso (Yvon y Rijnen, 2001). La actividad aminotransferasa, que se investigó en primer lugar en *Lactococcus lactis*, se ha encontrado asimismo en algunas cepas no fermento aisladas de queso, pertenecientes a las especies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum* (Yvon y Rijnen, 2001; Gumalla y Broadbent, 2001; Hansen y col., 2001; Martínez-Cuesta, 2001).

La actividad esterasa fue positiva en la mayor parte de las bacterias no fermento estudiadas, especialmente sobre sustratos sintéticos que contienen ácidos grasos de cadena corta. Las cepas con mayor actividad peptidolítica fueron también las de mayor actividad esterasa.

Por último, se determinó que muchas cepas de bacterias lácticas no provenientes del fermento poseen actividad glicósido hidrolasa. La más frecuente fue la β -galactosidasa, mientras que la α -galactosidasa fue baja y poco frecuente.

Teniendo en cuenta las capacidades enzimáticas que se conocen hasta el momento de las bacterias lácticas no provenientes del fermento, se puede proponer la siguiente secuencia para describir su crecimiento y actividad bioquímica en el queso: en primer lugar, durante la fabricación, las bacterias lácticas aportadas por el fermento crecen en la leche y en la cuajada, degradando las caseínas y aportando péptidos medianos y pequeños gracias a la acción de sus proteasas de pared. Asimismo, la enzima coagulante retenida en la cuajada y las proteasas nativas de la leche participan en la degradación de las caseínas, para dar péptidos medianos, con mayor o menor intensidad según el tipo de queso. Durante las primeras semanas de la maduración, las bacterias lácticas no pertenecientes al fermento comienzan a crecer, utilizando como fuente de energía la lactosa residual y otras fuentes aún no esclarecidas. Como fuente

de nitrógeno, las bacterias lácticas no provenientes del fermento utilizan los péptidos liberados por el fermento gracias a su complejo sistema de peptidasas, y eventualmente otros provenientes de la acción de otros agentes proteolíticos. La velocidad de crecimiento de las NSLAB, así como el número final que alcanzan, depende de la cepa de fermento utilizada, posiblemente debido a diferencias en las proteasas de pared que éstas poseen. Al mismo tiempo que las bacterias lácticas no provenientes del fermento aumentan, la población del fermento primario comienza a declinar a una velocidad que depende de la especie y de la cepa. Ambas poblaciones de bacterias lácticas intervienen en la degradación de péptidos a aminoácidos libres y en la transformación de estos productos para dar compuestos de sabor y aroma. Los productos finales dependen del fermento, de la población no fermento, de las interacciones entre ambas y de las condiciones ambientales (Hynes y col., 2001; Di Cagno y col., 2003).

Influencia de las bacterias lácticas no provenientes del fermento en la maduración del queso

Las bacterias lácticas no provenientes del fermento son un grupo microbiano adventicio (y por lo tanto no controlado) que se vuelve dominante durante la maduración de todos los quesos, artesanales e industriales, y su influencia en la calidad del producto final todavía es incierta, a pesar del gran número de trabajos de investigación dedicados a este tema en la última década. ¿La población NSLAB es perjudicial, banal, benéfica? No es posible generalizar, ya que la composición de dicha flora varía con el tipo de queso, la ubicación geográfica de la planta quesera, la estación, e incluso dentro de un mismo queso se modifica a lo largo de la maduración. Los efectos de las NSLAB en el queso pueden ser positivos, negativos o neutros, según las especies y cepas predominantes y el número que alcancen en el producto (Martley y Crow, 1993; Fox y col., 1998; Crow y col., 2001).

Existen varias alternativas para el estudio *in situ* de la influencia de la flora no perteneciente al fermento en la maduración de quesos, entre las cuales puede citarse la elaboración de quesos sin NSLAB que, por comparación con los quesos estándares permiten caracterizar la actividad de la flora adventicia. Para evitar el crecimiento de las NSLAB en el queso se ha empleado cloroformo o antibióticos, o se ha recurrido a la manipulación de la temperatura de maduración. Otra opción es la elaboración de quesos experimentales con agregado de cepas seleccionadas de origen no fermento, que se comparan con quesos testigo que sólo tienen el fermento de acidificación. Las experiencias se llevan a cabo tanto en quesos elaborados en planta piloto como en pseudo cuajadas

o “cheese-slurries” (pastas de queso o cuajada esterilizadas y adicionadas con las bacterias en estudio), en quesos elaborados en condiciones bacteriológicas controladas, quesos miniatura, etc. (Hynes y col., 2000; Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000b; Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001). Kleter (1977) sugirió que el estudio de la influencia de bacterias lácticas en quesos sólo puede llevarse a cabo en condiciones bacteriológicas estrictamente controladas, ya que las contaminaciones espontáneas enmascaran los resultados. En efecto, en el caso del estudio de la población NSLAB debe minimizarse todo lo posible la contaminación de los quesos testigo con bacterias adventicias (Lynch y col., 1997; Hynes y col., 2000). Este requisito no es sencillo de cumplir y se han presentado estudios en los cuales las NSLAB superaban 10^5 UFC g^{-1} en quesos testigo luego de un mes de maduración, e igualaban el recuento de los quesos experimentales al final de la misma (Broome y col., 1990, Trépanier y col., 1991). En estos casos es difícil saber si las diferencias de proteólisis, lipólisis o metabolismo de los carbohidratos detectadas entre los quesos testigo y experimentales obedecen a la flora NSLAB o a falta de reproducibilidad entre las réplicas. Por otra parte, se debe eludir la presencia de fagos, que cambian los niveles de proteólisis de manera proporcional al nivel de contaminación, aun cuando ésta no comprometa la acidificación (Chapot-Chartier y col., 1994).

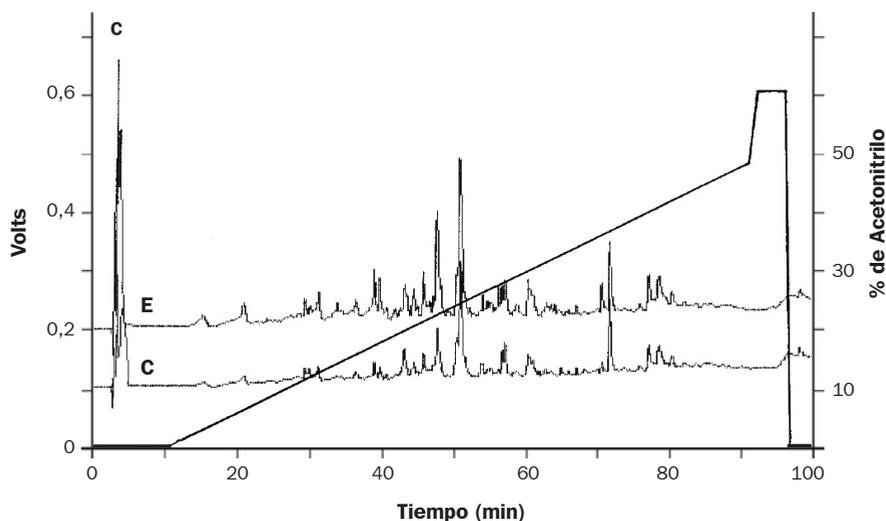
Son escasos los estudios donde las cepas de origen NSLAB se han ensayado en modelos experimentales cercanos a la matriz alimentaria real, frente a distintos fermentos primarios. Este tipo de estrategia es muy importante ya que como se ha visto anteriormente el crecimiento y la expresión bioquímica de la flora NSLAB varía con las condiciones ambientales (Lane y col., 1997, Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000a) y el fermento primario utilizado (Thomas y col., 1987, Hynes y col. 2001).

La mayoría de los trabajos de investigación en quesos experimentales desarrollados hasta la fecha ha demostrado que las NSLAB no participan en la proteólisis primaria, esto es, en la hidrólisis de las caseínas en grandes fragmentos, lo que no resulta sorprendente si se tiene en cuenta la baja actividad proteínasa detectada en cepas de este origen. Lane y Fox (1996) encontraron diferentes perfiles de proteólisis primaria en quesos Cheddar elaborados con y sin un fermento adjunto de lactobacilos pero, las diferencias sólo fueron significativas en el caso de quesos acidificados químicamente, en los que no había fermento primario, posiblemente porque los pequeños aportes a la proteólisis primaria realizados por la flora no perteneciente al cultivo iniciador fueron mejor detectados en ausencia del mismo.

Por otra parte, las bacterias lácticas no provenientes del fermento intervienen en la proteólisis secundaria gracias a su complejo sistema de peptidasas, hidrolizando los péptidos provenientes de la proteólisis primaria y modificando los perfiles de péptidos y aminoácidos libres (Figuras 4 y 5). En general, se ha comprobado que la flora no proveniente del fermento aumenta la cantidad de aminoácidos libres y la intensidad del flavor del producto final, aunque no siempre este aumento de intensidad está relacionado con una mejor calidad o mayor preferencia del producto por parte de los consumidores (Puchades y col., 1989, Lee y col., 1990, Broome y col., 1990, McSweeney y col. 1994, Lynch y col. 1999, Hynes y col., 2003a; Hynes y col., 2003b).

Figura 5

Perfiles peptídicos obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) del extracto de queso soluble en etanol 70 % v/v, para quesos miniatura pasta lavada elaborados con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2, con (E) y sin (C) un fermento adjunto de *Lactobacillus plantarum* CNRZ1310 (Hynes y col., 2003b)



Con respecto al metabolismo de los hidratos de carbono, muchas cepas no fermento son capaces de isomerizar el L-lactato a D-lactato y de formar aberturas como consecuencia del metabolismo de la lactosa o del citrato, fenómenos que a veces se consideran indeseables (Di Cagno y col., 2003), aunque en otros casos pueden ser positivos. Por ejemplo, en queso Cheddar algunos consumidores perciben los cristales de D-lactato como un índice de madurez, lo que les otorga un valor positivo, mientras que en otros casos estos cristales forman manchas blancas que se consideran defectos. En variedades como Pategrás y Holanda las pequeñas aberturas formadas por la flora heterofermentante, acompañadas por el desarrollo de un suave aroma láctico-diacetilo, son características y deseables, mientras que en otros quesos como el Cremoso o el Barra la presencia de ojos es problemática. Las vías metabólicas mediante las cuales se forman muchos compuestos volátiles que afectan el flavor todavía no se han esclarecido completamente, pero se han encontrado mayores cantidades de acetoína, diacetilo, etanol y ácido acético, entre otros, en quesos con lactobacilos agregados que en quesos sin lactobacilos (Hynes y col., 2003a). Se considera que el fermento primario no es capaz de producir algunos compuestos volátiles hallados en queso, como la butanona, y que éstos aparecen en el mismo como consecuencia de la actividad de la flora que no proviene del fermento (Urbach, 1993; McSweeney y Sousa, 2000).

Ciertas cepas NSLAB se han señalado como responsables de generar off-flavors a partir de los aminoácidos aromáticos, vía reacción de transaminación (Gummalla y Broadbent, 1999; Gummalla y Broadbent, 2001). Sin embargo, muchos de los compuestos volátiles formados a partir de los aminoácidos libres aromáticos y ramificados son componentes del flavor que pueden ser tanto positivos como negativos, según la concentración en la que se encuentren y el balance con otros compuestos presentes (Urbach, 1993; Urbach, 1995). Finalmente, se ha señalado que algunas cepas NSLAB son capaces de producir aminas, que en ciertos casos pueden ser perjudiciales para la salud ya que tienen actividad vasopresora (Leuscher y col., 1998).

Se puede concluir que, en general, la flora no proveniente del fermento no es positiva o negativa sino que estas cualidades dependen de la especie y de la cepa, del número alcanzado, la velocidad de crecimiento y, sobre todo, de las condiciones ambientales y del fermento primario utilizado. Así, una cepa cuyas propiedades tecnológicas la hacen indeseable para determinado tipo de queso puede ser sumamente positiva para otra variedad. Por esta razón es necesario controlar la flora secundaria de los quesos producidos a gran escala, ya que se ha señalado que su carácter adventicio la convierte en la causa de hasta el 80 % de los defectos (Ross y col., 2000; Crow y col., 2001).

Los fermentos adjuntos de quesería basados en la flora láctica no perteneciente al fermento

Como se mencionó anteriormente, la flora no proveniente del fermento podría ser la causa de la mayoría de los defectos en quesos obtenidos a escala industrial (Ross y col., 2000; Crow y col., 2001). Fabricar quesos completamente libres de NSLAB no parece ser una alternativa posible para superar este problema ya que sólo pueden obtenerse en condiciones de laboratorio y, además, se ha comprobado que desarrollan un sabor aceptable pero no completamente maduro (Crow y col., 2001). Por otra parte, productores, consumidores y evaluadores coinciden en señalar que los quesos industriales de buena calidad y sin defectos han perdido las características organolépticas intensas que eran propias de estos productos en décadas anteriores (Nantet, 1994). La calidad microbiológica de la leche, la pasteurización y la higiene en las plantas lácteas han reducido la importancia de la flora autóctona, que daba tipicidad a estos productos. En este marco, el uso de fermentos adjuntos parece ser la solución más indicada para la obtención de quesos de calidad satisfactoria y constante, con notas de sabor y aroma más distintivas.

Los fermentos adjuntos o secundarios son cultivos microbianos que se agregan al queso con un fin diferente de la acidificación.¹ En el caso de fermentos adjuntos de bacterias lácticas de origen NSLAB su utilización está destinada a controlar el crecimiento de NSLAB adventicias y potencialmente perjudiciales y contribuir con la formación de compuestos de sabor y aroma. Los fermentos adjuntos de bacterias lácticas, para ser adecuados, no deben contribuir a la acidificación durante la elaboración del queso; deben crecer rápidamente y mantener altas densidades en las condiciones fisiológicas y nutricionales que prevalecen en el ecosistema cuajada-queso, ser competitivos contra la microflora adventicia y ejercer un efecto complementario con el fermento, de manera de producir un balance de efectos deseables y ningún defecto en el producto final. Para lograr estos objetivos suele ser necesario un fermento constituido por más de una cepa (Crow y col., 2001; Di Cagno y col., 2003).

Los fermentos adjuntos generalmente se obtienen a partir de cepas de origen no fermento aisladas de quesos de buena calidad, que se purifican e identifican por técnicas bioquímicas y/o biomoleculares y luego se seleccionan basándose en distintos criterios. Hasta el momento, la manera más utilizada para determinar las propiedades tecnológicas de una determinada cepa es estudiar sus actividades enzimáticas por medio de ensayos *in vitro* y en modelos experimentales casearios (Hynes y col., 2003a; Hynes y col., 2003b). La validación de los resultados obtenidos mediante estas aproximaciones en elaboraciones de quesos a escala piloto es de suma importancia para posibilitar la transferencia de los resultados al medio industrial. En efecto, si bien

el agregado de fermentos adjuntos para mejorar el sabor ya es una práctica industrial bastante habitual, dichos cultivos generalmente están formulados por varias cepas sobre la base de información básica, surgida de estudios de las cepas individuales llevados a cabo *in vitro*. Los cultivos se aplican y luego se produce una retroalimentación de los resultados obtenidos a escala industrial al proveedor de los fermentos. De esta manera se logra una aproximación pragmática al conocimiento de una fórmula determinada y sus aplicaciones, pero la mayor parte de las veces no se conoce qué cepas permanecen viables a lo largo de la maduración y cuáles tienen un efecto real sobre la misma. Esta práctica eleva los costos y no necesariamente mejora los productos, razón por la cual el estudio sistemático de cepas NSLAB en matrices casearias reales, individualmente y junto con otros microorganismos, es de suma importancia para el conocimiento del ecosistema cuajada-queso y la aplicación de los nuevos conocimientos en el sector lácteo.

Nota

¹ El término fermento adjunto generalmente se reserva para los fermentos lácticos de origen NSLAB, y se prefiere el término fermento secundario para todos los otros tipos, como cultivos de *Brevibacterium linens* o fermentos de hongos. Sin embargo, esta nomenclatura no es universal por lo que debe aclararse en cada caso de qué tipo de cultivos se trata.

Referencias bibliográficas

- Beresford, T.; Fitzsimons, N.; Brennan, N. y Cogan, T. (2001).** Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 259-274.
- Berthier, F.; Beauvier, E.; Dasen, A. y Grappin, R. (2001).** Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive ad species-specific primers. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 293-305.
- Broome, M.; Krause, D. y Hickey, M. (1990).** The use of non starter lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 45, pp. 67-73.
- Chapot-Chartier, M.; Deniel, C.; Rousseau, M.; Vassal, L. y Gripon, J. (1994).** Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *International Dairy Journal*, vol. 4, pp. 251-269.
- Choisi, C.; Desmazeaud, M.; Gripon, J.; Lamberet, G. y Lenoir, J. (1997).** La Biochimie de l'affinage. En: Eck, A. y Gillis, J. (eds.), *Le Fromage*. Lavoisier, Paris, pp. 86-161.
- Cluzel, J.; Chopin, A.; Dusko Ehrlich, S. y Chopin, M. (1991).** Phage abortive infection mechanism from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, expression of which is mediated by an Iso-ISS1 element. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, pp. 3547-3551.
- Corsetti, A.; Gobetti, M.; Smacchi, E.; De Angelis, M. y Rossi, J. (1998).** Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. *Journal of Dairy Research*, vol. 65, pp. 631-642.
- Crow, V.; Coolbear, T.; Goparl, P.; Martley, F.; McKay, L. y Riepe, H. (1995).** The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, vol. 5, pp. 855-875.
- Crow, V.; Curry, B. y Hayes, M. (2001).** The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 275-283.
- Di Cagno, R.; De Angelis, M.; Upadhyay, V.; Mc Sweeney, P.; Minervini, F.; Gallo, G. y Gobetti, M. (2003).** Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *International Dairy Journal*, vol. 13, pp. 145-157.
- Fox, P.; Law, J.; McSweeney, P. y Wallace J. (1993).** Biochemistry of cheese ripening. En: Fox, P. (ed.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 1, General aspects. Chapman & Hall, London, pp. 389-438.
- Fox, P. y McSweeney, P. (1996).** Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, vol. 12, pp. 457-509.
- Fox, P.; McSweeney, P. y Lynch, C. (1998).** Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 53, pp. 83-89.
- Gummalla, S. y Broadbent, J. (1999).** Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavor adjuncts. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 2070-2077.
- Gummalla, S. y Broadbent, J. (2001).** Tyrosine and Phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 1011-1019.
- Hansen, B.; Houlberg, U. y Ardö Y. (2001).** Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 225-233.
- Hynes, E.; Bach, C.; Lamberet, G.; Ogier, J.; Son, O. y Delacroix-Buchet, A. (2003a).** Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteo-

- lysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese. *Le Lait*, vol. 83, pp. 31-43.
- Hynes, E.; Ogier, J. y Delacroix-Buchet, A. (2000).** Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses in controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 733-737.
- Hynes, E.; Ogier, J. y Delacroix-Buchet, A. (2001).** Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 587-597.
- Hynes, E.; Ogier, J.; Son, O. y Delacroix-Buchet A. (2003b).** Influence of starter and adjunct lactobacilli culture on ripening of miniature washed-curd cheeses. *Le Lait*, vol. 83, pp. 17-29.
- Kleter, G. (1977).** The ripening of Gouda cheese made under strictly aseptic conditions. 2. The comparison of the activity of different starters and the influence of certain *Lactobacillus* strains. *Netherlands Milk Dairy Journal*, vol. 31, pp. 177-187.
- Lane, C. y Fox, P. (1996).** Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, vol. 6, pp. 715-728.
- Lane, C.; Fox, P.; Walsh, E.; Folkertsma, B. y McSweeney, P. (1997).** Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Le Lait*, vol. 77, pp. 561-573.
- Lee, B.; Laleye, L.; Simard, R.; Holley, R.; Emons, D. y Giroux, R. (1990).** Influence of homo-fermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, vol. 55, pp. 386-390.
- Leuscher, R.; Kurihara, R. y Hammes, W. (1998).** Effect of enhanced proteolysis during formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 44, pp. 15-20.
- Lynch, C.; McSweeney, P.; Fox, P.; Cogan, T. y Drinan, F. (1996).** Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, vol. 6, pp. 851-867.
- Lynch, C.; McSweeney, P.; Fox, P.; Cogan, T. y Drinan, F. (1997).** Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Le Lait*, vol. 77, pp. 441-459.
- Lynch, C.; Muir, D.; Banks, J.; McSweeney, P. y Fox, P. (1999).** Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 82, pp. 1618-1628.
- Martley, F. y Crow, V. (1993).** Interaction between nonstarter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 461-483.
- Martínez-Cuesta, M.; Fernández de Palencia, P.; Requena, T. y Peláez, C. (2001).** Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavor development in cheese. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 577-585.
- McSweeney, P.; Fox, P.; Lucey, J.; Kordan, K. y Cogan, T. (1993).** Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 613-634.
- McSweeney, P. y Sousa, M. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, vol. 80, pp. 293-324.
- McSweeney, P.; Walsh, E.; Fox, P.; Cogan, T.; Drinan, F. y Castelo-Gonzalez, M. (1994).** A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agricultural Food Research*, vol. 33, pp. 183-192.
- Michel, V. y Martley, F. (2001).** *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese - production and fate of galactose. *Journal of Dairy Research*, vol. 68, pp. 317-325.
- Nantet, B. (1994).** *Le goût du fromage*. Flammarion, Paris.
- Naylor, J. y Sharpe, M. (1958).** Lactobacilli in Cheddar cheese. III. The source of lactobacilli in cheese. *Journal of Dairy Research*, vol. 25, pp. 431-438.
- O'Donovan, C.; Wilkinson, M.; Guinee, T. y Fox, P. (1996).** An investigation of the autolytic properties of three lactococcal strains during cheese ripening. *International Dairy Journal*, vol. 6, pp. 1149-1165.

- Perreard, E. (1998).** Fromagerie d'emmental. Flore lactique "secondaire" ou d'affinage, *Revue Laitière Française*, vol. 1, p. 12.
- Peterson, S. y Marshall, R. (1990).** Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 395-1410.
- Puchades, R.; Lemieux, L. y Simard R. (1989).** Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *Journal of Food Science*, vol. 54, pp. 885-888.
- Ross, P.; Stanton, C.; Hill, C.; Fitzgerald, G. y Coffey, A. (2000).** Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 11, pp. 96-104.
- Shakeel-Ur-Rehman; Banks, J.; McSweeney, P. y Fox, P. (2000a).** Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 45-53.
- Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P. y McSweeney, P. (2000b).** Methods used to study non-starter microorganisms in cheese: a review. *International Journal of Dairy Technology*, vol. 53, pp. 113-119.
- Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P.; McSweeney, P.; Madkor, S. y Farkye, N. (2001).** Alternatives to pilot plan experiments in cheese-ripening studies. *International Journal of Dairy Technology*, vol. 54, pp. 121-126.
- Somers, E.; Johnson, M. y Wong, A. (2000).** Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 1926-1936.
- Thomas, T. (1987).** Cannibalism among bacteria found in cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, vol. 22, pp. 215-219.
- Tavaria, F. y Malcata, F. (2003).** Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 33, pp. 236-243.
- Trépanier, G.; Simard, R. y Lee, B. (1991).** Lactic acid bacteria relation to accelerated maturation of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, vol. 56, pp. 1238-1254.
- Turner, K.; Lawrence, R. y Lelievre, J. (1986).** A microbiological specification for milk for aseptic cheesemaking. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, vol. 21, pp. 249-254.
- Urbach, G. (1993).** Relations between cheese flavor and chemical composition. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 389-422.
- Urbach, G. (1995).** Contribution of lactic acid bacteria to flavor compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, vol. 5, pp. 877-903.
- Visser, S. (1993).** Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 329-350.
- Williams, A. y Banks, J. (1997).** Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal*, vol. 7, pp. 763-774.
- Williams, A.; Withers, S. y Banks, J. (2000).** Energy sources of non starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 17-23.
- Yvon, M y Rijnen, L. (2001).** Cheese flavor formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 185-201.

Capítulo 3

Maduración acelerada

Carlos A. Zalazar, Carlos A. Meinardi y Mario C. Candiotti

El desarrollo que ha alcanzado la industria en nuestros días hace que la competitividad juegue un rol muy importante en la oferta de productos. Dentro de esa oferta en continuo aumento, aquellos elementos que brindan calidad a menor precio serán sin duda los que gozarán de la preferencia de los consumidores.

Ante este estado de cosas se hace necesario efectuar para cada producto un detallado análisis de costos, tratando de poner en evidencia los factores de mayor incidencia en la composición de los mismos. Debe tenerse presente, sin embargo, no realizar nada que vaya en detrimento de la calidad, sobre todo si ésta ya ha sido impuesta por una tradición.

La industria lactocasearia no escapa, por supuesto, a estos razonamientos, y hoy en día debe esforzarse por mejorar su producción disminuyendo gastos ya que la competencia, tal como se mencionó, también en esta rama está desempeñando un rol trascendente. El queso, uno de sus productos más tradicionales, presenta una etapa, la maduración, donde la inmovilización de grandes capitales atenta sobre los costos. Esto se agrava en aquéllos que por sus características precisan de un largo estacionamiento, que en ciertos casos puede llegar a medirse en años.

No hay duda de que toda reducción de este período incidirá en forma directa y positiva sobre el valor del producto final.

El problema mayor radica en que de ninguna manera se puede resignar cali-

dad. Para que esto no ocurra se debe tener un acabado conocimiento del proceso de maduración y así actuar consecuentemente en la dirección correcta.

Este conocimiento total está por ahora distante, aunque se disponga de elementos parciales que cada vez se perfeccionan más. Se han realizado intentos semiempíricos que deben ser confirmados por la práctica pero, sólo en ciertas ocasiones han conducido a resultados alentadores.

No obstante, el interés que el tema presenta, mantenido siempre vivo por una industria ansiosa de conclusiones, hace que se trabaje en él con intensidad y con mejores criterios.

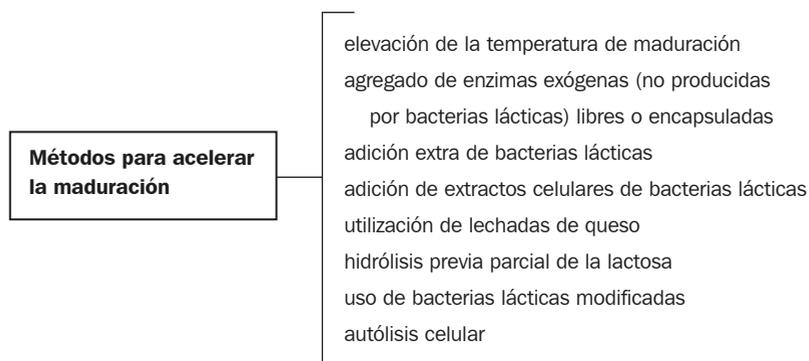
Este trabajo intenta hacer una revisión de los logros alcanzados hasta el momento en lo que se conoce como maduración acelerada de quesos, exponiendo los resultados generados en todo el mundo y las perspectivas que el tema presenta.

Métodos para acelerar la maduración

A partir de la década del 60 comienzan a aparecer referencias en la bibliografía acerca de las posibilidades de acelerar el proceso de maduración de quesos. Habiéndose ya establecido con cierta seguridad el papel que desempeñan en el afinado los equipos enzimáticos provenientes de las bacterias lácticas, del coagulante y de otras fuentes de menor importancia, las metodologías ensayadas con distintos resultados según las referencias aportadas por la bibliografía (Law, 1983; Law, 1980; Fox y col., 1996) se pueden agrupar como se indica en la Figura 1.

Figura 1

Métodos para acelerar el proceso de maduración de quesos



Elevación de la temperatura de maduración

Este recurso aparece como el más económico y simple de los métodos ensayados hasta el presente. Se basa en el hecho de que aumentando la temperatura de maduración se aumenta paralelamente la velocidad de todas las reacciones que tienen lugar durante la maduración. Sin embargo, este efecto no se produce de forma homogénea, lo que puede conducir a un desbalance en la formación de los compuestos responsables de la textura, del aroma y del sabor. Por otra parte, no es posible aumentar la temperatura por encima de los 20 °C, ya que a estos niveles se produce la exudación de la materia grasa y se corre el riesgo de fomentar peligrosamente la proliferación de microorganismos no casearios, como los hongos y las levaduras.

Las temperaturas de maduración varían mucho con el tipo de queso. De esta forma, a los quesos duros italianos que se maduran entre 22 y 24 °C muy difícilmente se les pueda aplicar una elevación de temperatura. En cambio el queso Cheddar, que se madura a temperaturas del orden de los 6 a 8 °C, ofrece posibilidades interesantes.

Son numerosos los trabajos publicados referidos a la posibilidad de aumentar la temperatura de maduración para este queso. En general, los resultados obtenidos son coincidentes al afirmar que se pueden obtener buenos efectos en cuanto a la aceleración, con temperaturas del orden de los 13 °C, con las que se consiguen características organolépticas no sólo en un tiempo menor sino también más relevantes que las de los productos madurados a menores temperaturas.

El método de elevación de temperatura ha sido ensayado también para ciertos tipos de quesos franceses y para queso Manchego. En este último se probaron temperaturas de 16 y 20 °C que, si bien aumentaron la velocidad de proteólisis y lipólisis, tuvieron un efecto negativo sobre la calidad del queso (Gaya y col., 1990).

Debe destacarse, sin embargo, que cualquier elevación por sobre la temperatura normal de maduración que se desee implementar debe ir acompañada de rigurosas medidas de higiene en el proceso productivo, de manera de disminuir la posibilidad de contaminaciones con microorganismos indeseables que puedan reproducirse rápidamente. Con los procesos mecánicos automatizados de la actualidad, estas condiciones son más fáciles de conseguir que con los procesos manuales. El método es permitido oficialmente en Francia para acelerar la maduración de quesos, y utilizado en escala industrial para el queso de Cantal.

Agregado de enzimas exógenas

La disponibilidad en el mercado de una extensa variedad de proteasas y lipasas de características muy diversas ha animado a los investigadores a efectuar con ellas pruebas tendientes a acelerar la maduración de quesos.

El primer problema a resolver es la manera de efectuar el correspondiente agregado. Al respecto se han ensayado cuatro vías:

- adición directa a la leche;
- agregado de la enzima en polvo, directamente a la cuajada;
- inyección líquida a alta presión en la cuajada preformada y
- encapsulamiento de las enzimas.

La práctica de la adición directa en la leche tiene la ventaja de provocar una muy buena distribución del material, haciendo que la enzima se encuentre en forma perfectamente homogénea en el queso. Sin embargo, con esta metodología se dan pérdidas en el suero del orden del 40 y hasta del 60 % del total agregado, lo que atenta contra la economía del proceso, sobre todo si la enzima agregada, como sucede la mayoría de las veces, es de costo alto. Otra desventaja es que el suero que se tiene como subproducto lleva las enzimas adicionadas y, según el uso al que se lo destine, éstas deberán ser previamente inactivadas.

El agregado de la enzima en polvo vehiculizada con sal directamente a la cuajada evita el problema de las pérdidas pero no posibilita una correcta homogeneización. Esto se puede resolver favorablemente en escala piloto, pero no en la industria.

La inyección a alta presión de la enzima líquida en el queso ya formado se ha practicado satisfactoriamente en Mozzarella, pero debido a que la penetración no es alta (unos 10 cm) el método sólo es aplicable a quesos pequeños. Otro inconveniente lo constituye el hecho de que para lograr buenos resultados se debe trabajar a más de 43 °C, lo que no es compatible con todos los tipos de quesos.

También se ha realizado el intento de encerrar las enzimas en microcápsulas que se agregan a la leche y permanecen en ella sin disolverse, y por lo tanto quedan retenidas en la cuajada distribuyéndose bien en ella. Se ha experimentado con tres tipos de estas microcápsulas, que se denominan liposomas: vesículas multilaminares, unilaminares y vesículas evaporadas en fase inversa. Los liposomas se agregan a la leche y las enzimas recién se liberan durante la maduración; los resultados obtenidos por esta vía en queso Cheddar son promisorios. La cobertura de las cápsulas se diseñó en un trabajo con Mozzarella para que funda a la temperatura de hilado de 45 °C liberando su contenido (Skeie, 1994).

La lista de enzimas exógenas utilizadas por distintos investigadores en el intento de acelerar la maduración de quesos de diversos tipos es extensa.

Pueden ser de origen animal, como por ejemplo las enzimas digestivas de cordero o las gástricas de ternero, la pancreatina, etc., o tratarse de productos de origen microbiano, hongos o bacterias, o también extraídos de vegetales, como ciertos coagulantes de leche. Estas enzimas incluyen proteasas ácidas y neutras, peptidasas, lipasas, decarboxilasas, esterasas, etc.

En general puede decirse que se logra un mejor efecto de aceleración de la maduración y características finales del producto utilizando una combinación de dos o más enzimas en lugar de una sola, y también que cada tipo de queso tiene una combinación de enzimas exclusiva que no necesariamente produce efectos positivos en otros productos.

Con relación a esto se ha encontrado que en quesos fuertes o picantes como algunos franceses o italianos duros la adición de lipasas constituye una muy buena vía para provocar la intensificación de aroma y sabor en tiempos menores (Nelson y col., 1977; Fox y Stepaniak, 1993).

Así, se han usado lipasas de *Aspergillus* en quesos azules y algunas lipasas de origen animal en Provolone y Gorgonzola, llegándose en este último caso a la práctica industrial difundida.

El efecto positivo se debería a una acción combinada producida por el aumento de los ácidos grasos libres y los β -cetoácidos, que son precursores de las metilcetonas, y de los δ -hidroxiácidos, que lo son de las δ -lactonas, de las que se sabe que mejoran la calidad organoléptica de los quesos azules.

El-Hofi e Ismail (1998, 2000) ensayaron el agregado de una lipasa de papaya, que había sido previamente purificada y caracterizada, a un *slurry* de queso Ras, un producto de origen egipcio. Los resultados indicaron que los índices de maduración (pH, acidez, nitrógeno soluble y ácidos grasos volátiles solubles totales) de todos los *slurries*, elaborados con y sin el agregado de la enzima, aumentaron con el tiempo, como también las características sensoriales. El *slurry* elaborado con una dosis de lipasa de 2 mL / 100 g de cuajada a los 3 días de maduración a 37 °C y el elaborado con el doble de esta dosis luego de un día de maduración, también a 37 °C, presentaron características sensoriales similares al control a los 7 días de maduración. Al final de ese período el *slurry* con 4mL de enzima presentó el mayor contenido de ácidos grasos volátiles totales y también el mejor puntaje de caracteres organolépticos.

En otros quesos en los que la acción lipásica no juega un rol de trascendencia se debe trabajar sobre la proteólisis de la caseína. Aquí las cosas no son tan sencillas y evidentes, ya que las vías de su demolición pueden ser numerosísimas y por supuesto, no todas conducen al resultado deseado. En estos casos resulta imprescindible mantener un adecuado balance entre aroma, sabor y textura. Este balance se altera porque debido a la inadecuada producción de determinados compuestos se llega a los defectos típicos de rancidez, sabor amargo, pastas demasiado blandas, etc.

El queso Cheddar es un ejemplo sobre el cual se ha trabajado intensamente y del que se tienen algunas conclusiones preliminares en cuanto al tipo y cantidad de enzimas a utilizar, efectos sobre la maduración, etc.

Estos datos se deben fundamentalmente a los trabajos de Sood y Kosikowski (1979), cuyo objetivo fue determinar con la mayor resolución posible las cantidades y combinaciones óptimas de enzimas microbianas, proteolíticas y lipolíticas necesarias para acelerar el proceso de maduración del queso Cheddar y mejorar sus características organolépticas.

Se obtuvieron quesos Cheddar de buena calidad con un período de maduración de 3 meses a 10 °C utilizando las siguientes combinaciones y concentraciones de enzimas:

- proteasa fúngica 31 000 (Miles) 0,005 %;
- lipasa fúngica-MY (Meito) 0,00005 % a 0,0002 % y
- proteasa fúngica P53 (Rohm & Haas) 0,0035 % - lipasa fúngica-MY (Meito) 0,00005 % a 0,0002 %.

Los quesos tratados con estas enzimas desarrollaron más aminoácidos y más ácidos grasos volátiles libres y presentaron mejores características organolépticas y mayor aceptabilidad que los controles.

Las proteasas microbianas incorporadas contribuyeron a la demolición de las caseínas, especialmente de la caseína β . La caseína α_{s1} -I y los aminoácidos libres también se encontraron en mayor proporción.

Los quesos tratados enzimáticamente pero madurados a 4-5 °C no mostraron ninguna aceleración con respecto al control. Esto podría ser de utilidad para frenar la acción acelerante en aquellos madurados a 10 °C.

A pesar de los alentadores resultados de este estudio, el éxito de la adición de enzimas microbianas a las cuajadas sigue dependiendo de la correcta selección de tipos y concentraciones para cada variedad particular de queso.

De cualquier manera, y teniendo en cuenta esta última afirmación, cada enzima con potencialidad de uso en aceleración de maduración debería ser sometida en primer lugar a una serie de estudios *in vitro* con el objeto de delinear en forma general sus características, y luego emplearla usando esta información en la elaboración de quesos a escala piloto o industrial. Esta metodología fue seguida por Cabrini y col. (1983) para el ensayo del producto comercial Novozyme 099, que es un preparado obtenido a partir de *Bacillus subtilis*.

La caracterización parcial *in vitro* de la proteasa permitió establecer las condiciones óptimas de su actividad caseinolítica: concentración $0,66 \cdot 10^{-5}$ AU mL⁻¹ de enzima y pH 6,6. Después de 3 días a 30 °C en caseinato de sodio se tiene una notable producción de fracción soluble aminoácida, de nitrógeno no caseínico (NNC) y de nitrógeno no proteico (NNP), y una acentuada degradación de las fracciones α_{s1} y β del residuo caseínico. Esta actividad es

todavía notable a 5 y a 15 °C, aunque con tiempos de reacción mayores.

Por otra parte, los tratamientos térmicos de 63 °C por 30', 72 °C por 15" y 80 °C por 10" reducen la actividad enzimática pero no la anulan. Lo mismo puede decirse con respecto a soluciones de NaCl de 0,5, 1, 3 y 5 %. Estos datos son muy útiles para conocer el comportamiento de la enzima durante la caseificación.

La enzima no evidenció poder lipolítico en agar tributirina pero en cambio demostró una elevada actividad coagulante.

En pruebas de caseificación de quesos blandos el uso de la proteasa ha determinado siempre un incremento del grado de maduración, con variaciones de NNC y NNP. También se produjo un desdoblamiento de la caseína α_{s1} con formación de fracciones polipeptídicas de diferente movilidad electroforética. La caseína β en cambio, no fue degradada nunca.

En los distintos tipos de quesos elaborados no se evidenciaron anomalías organolépticas, sobre todo de sabor amargo.

Se concluyó que la enzima estudiada puede ser empleada con buenos resultados, sobre todo en la producción de quesos blandos.

Existen numerosos trabajos sobre la acción de enzimas en el proceso de maduración de distintos tipos de quesos.

Así por ejemplo, Frick y col. (1984) se refieren al uso de la lipasa de *Aspergillus oryzae* en queso Cheddar, estableciendo que se obtiene un sabor típico y una mayor liberación de ácidos grasos de cadena larga que con otras lipasas.

Ridha y col. (1984b) informan sobre los resultados obtenidos agregando una proteasa neutra de *Bacillus subtilis* mezclada con NaCl a la cuajada de queso Cheddar. Encontraron que los quesos elaborados con la proteasa contenían más nitrógeno soluble que los controles, siendo esta diferencia muy significativa ya a los 2 meses. La proteólisis aumentada se tradujo en quesos con textura más blanda y aroma y sabor más intensos que, sin embargo no fueron los típicos de un Cheddar de alta calidad. La adición de la enzima se asoció con algunos defectos como el gusto amargo.

Como conclusión, y teniendo en cuenta todos los resultados analizados, puede decirse que el uso de enzimas exógenas en la aceleración de la maduración de quesos es una posibilidad interesante. Sin embargo, debe aclararse que en forma previa deberán determinarse para cada tipo de queso, clases y concentraciones a utilizar mediante ensayos *in vitro* y elaboraciones piloto perfectamente planificadas. Sin embargo, cuando se trata de quesos que presentan exigencias en calidad organoléptica o que deben mantener una tipicidad estricta el sistema no ofrece por ahora soluciones viables, ya que los productos que se obtienen, si bien son aceptables en muchos casos, resultan con diferencias de textura, aroma y sabor que pueden pasar inadvertidas sólo cuando se trata de quesos de consumo rápido y masivo.

Se han realizado también intentos para acelerar el proceso de maduración mediante la adición de plasmina. Esta enzima, que forma parte de las proteasas naturales de la leche, interviene activamente en la maduración de quesos, sobre todo en los que fueron sometidos a un proceso de cocción a alta temperatura, ya que de esa forma se inactiva el inhibidor del activador del plasminógeno, tal como fue visto anteriormente. Si bien los ensayos han dado resultados positivos, no es viable el uso industrial debido a su alto costo. Las posibilidades de empleo aumentarían en forma importante en la medida en que se la pueda producir por manipulación genética (Srinivasan y Lucey, 2002).

Zalazar y col. (1994) estudiaron la influencia de proteasas comerciales en la aceleración del proceso de maduración del queso Pategrás Argentino. Una proteasa líquida y otra en polvo de *Bacillus subtilis* y una proteasa en polvo de *Aspergillus oryzae* fueron agregadas directamente a la leche de elaboración en dosis diferentes, seleccionadas alrededor de los valores indicados por cada fabricante. Los quesos con agregados de proteasas mostraron, en todas las dosis ensayadas, mayor producción de fracciones nitrogenadas solubles a pH 4,6 y en ácido tricloroacético al 2 y 12 % que los quesos testigo elaborados sin proteasas. No obstante, cuando fueron utilizadas las dosis más altas, los quesos fueron inaceptables por el desarrollo de un intenso gusto amargo. Como conclusión final se recomienda el uso de la proteasa en polvo de *Aspergillus oryzae* a un nivel de 6 g por cada 100 litros de leche de elaboración. Con este agregado se consiguió una notable aceleración en la producción de las distintas fracciones nitrogenadas y no fue detectada la aparición del sabor amargo.

Adición extra de bacterias lácticas

Partiendo de la base de que el cultivo láctico empleado en la elaboración de quesos es una de las fuentes más importantes de las enzimas que intervienen en la maduración, es lógico pensar que si por alguna vía se aumenta el número de bacterias lácticas presentes, se podrá obtener una aceleración en la misma.

Si se trabaja con cultivos lácticos líquidos convencionales, normalmente se adiciona en las elaboraciones un 2 % del mismo con una concentración celular de aproximadamente 10^9 UFC mL⁻¹, para obtener en la leche 10^7 UFC mL⁻¹. Si se deseara aumentar el número de microorganismos aumentando el volumen de cultivo agregado, para alcanzar en tina un nivel de 10^9 UFC mL⁻¹ habría que agregar tanto cultivo como leche de elaboración, o quizás más, por lo que por esta vía el hecho resulta impracticable. Por otra parte, se estaría agregando una cantidad tal de ácido láctico que desvirtuaría totalmente la caseificación.

Consecuentemente, se debe pensar en primer lugar en desarrollar las bacterias lácticas en medios distintos de la leche, y efectuar luego una concentración de células por centrifugación. De esta manera se logran preparados con 10^{11} bacterias mL^{-1} , los que agregados en lugar del fermento normal, posibilitan un positivo incremento del número de microorganismos en la leche.

Pero ahora se presenta el segundo problema: una leche tan cargada de bacterias lácticas desarrolla acidez mucho más rápidamente. Para subsanar este inconveniente se han utilizado dos vías: se neutraliza el exceso de acidez con un álcali o se trabaja con mayor rapidez.

Una experiencia llevada a cabo según el primer sistema (Law, 1981) se basó en el uso de un cultivo iniciador concentrado y en un largo período de maduración de la leche antes de agregar el cuajo, de manera que la cuajada terminada contenía de 2 a 3 veces más bacterias que lo normal. La cantidad extra de ácido producido se neutralizó agregando hidróxido de sodio. A los dos meses los quesos testigo aún no habían madurado pero los experimentales habían desarrollado características organolépticas muy pronunciadas.

No se presentan datos organolépticos cuantitativos, pero se hace referencia a un sabor “nuevo” presumiblemente atípico.

El método presenta la ventaja de usar fuentes enzimáticas que son propias del queso, pero las diferencias operativas que requiere podrían ser de difícil implementación a nivel industrial.

Vasaal y Mocquot (1967) realizaron experiencias utilizando dos suspensiones de bacterias lácticas, conteniendo una de ellas $5 \cdot 10^{11}$ UFC mL^{-1} de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y la otra 10^{11} UFC mL^{-1} de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, en proporciones variables del 0,1 al 5 %.

Como resultado se tuvo una más rápida evolución del pH a medida que aumentaba la cantidad de células agregadas. En consecuencia, las operaciones de caseificación debieron realizarse más aceleradamente. Sin embargo, en la prueba en la que se usó la dosis más elevada el queso resultó diferente: la caída del pH fue inmediata y el operador no pudo realizar las etapas a tiempo. El queso obtenido en este caso tuvo las mismas características que una caseína isoeléctrica, con estructura pulverulenta y desuerado lento e incompleto.

Los quesos en donde la dosis de bacterias extras adicionadas no fue la máxima, maduraron más rápido, adquiriendo las características organolépticas finales en menos tiempo.

Los autores, por otra parte, muestran la importancia de este sistema en las elaboraciones mecanizadas, en las cuales todas las etapas se suceden con mayor rapidez.

Adición de extractos celulares de bacterias lácticas

Esta metodología tiene la ventaja con respecto a la anterior, de que al no adicionar microorganismos vivos evita el problema de la sobreproducción de ácido láctico, y agrega todo el equipo enzimático proteolítico propio de la maduración normal de un queso. La preparación del extracto celular requiere, sin embargo, de una técnica particular.

En el trabajo de El Soda y col. (1982) referente a la acción de extractos celulares de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* sobre la maduración del queso Cheddar, se informa que luego de la rotura, y durante el salado, una parte de la cuajada recibió el extracto libre de células obtenido de un cultivo de $1,07 \cdot 10^5$ UFC g^{-1} de *Lactobacillus helveticus*, o una cantidad equivalente de extracto de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Los quesos se analizaron cada 15 días durante 3 meses. Las experiencias evidenciaron una aceleración de la maduración ya que se observaron mayores valores de hidrólisis de proteínas y de formación de ácidos volátiles en los experimentales que en los testigos. Los mayores índices de maduración fueron obtenidos con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Sin embargo, el panel del test organoléptico detectó, a partir del segundo mes, sabor amargo en todos los quesos elaborados con extractos, que se tornó muy pronunciado al final del tercer mes.

Una interesante variación de este método consiste en la posibilidad de encapsular sistemas enzimáticos complejos extraídos de bacterias lácticas. Se ha logrado preparar microcápsulas de extractos enzimáticos de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, que se agregaron a la leche de elaboración (Fox, 1988). La concentración de acetoína y de diacetilo resultó ocho veces mayor respecto del control. En los quesos con extractos encapsulados, durante los primeros 5-7 días de estacionamiento se formaron de 9 a 12 $\mu g g^{-1}$ de diacetilo y de acetoína. Esto sucede luego de la liberación del sistema enzimático de la cápsula y en presencia de un adecuado sustrato de reacción. Para este fin, la cápsula se prepara con una mezcla a base de grasa de leche y otros elementos, cuyo punto de fusión es superior a 35 °C.

Utilización de slurries o lechadas de queso

Consiste en el agregado, ya sea a la leche o a la cuajada, de una cierta cantidad de una suspensión o slurry en la que se ha desarrollado, por una técnica especial, un activo equipo enzimático que puede llegar a acelerar el proceso de maduración (Kristofferson y col., 1967).

La técnica de preparación del slurry presenta variaciones según la fuente que se considere, pero en forma general puede resumirse de la siguiente manera.

Se prepara el coágulo con la metodología convencional del queso en el que se piensa usar el slurry. A continuación se lo corta y se lo mezcla con una solución al 5 % de NaCl y 3 % de sorbato de sodio hasta obtener una pasta semilíquida. La mezcla puede ser luego pasada por una trituradora para dar un producto que contiene aproximadamente un 40 % de sólidos totales y 3,5 % de sal. Todo el equipo utilizado debe ser prolijamente lavado con solución de hipoclorito de sodio. Los slurries así obtenidos se almacenan en recipientes estériles y bien cerrados durante 7 a 17 días y a temperaturas entre 25 y 30 °C. En esta etapa deben extremarse los cuidados con la asepsia, para evitar especialmente el desarrollo de microorganismos nocivos, principalmente hongos. De no ser utilizados inmediatamente, los slurries deben ser almacenados a -10 °C. Según los distintos investigadores, el porcentaje a agregar en un queso normal, ya sea a la leche o a la cuajada, es del 1 al 6 %.

Recientemente también se han obtenido buenos resultados utilizando los slurries como ingrediente que sustituye a los quesos maduros en la mezcla de elaboración de quesos fundidos. Los ensayos han sido realizados específicamente en los quesos Cheddar procesados.

Los slurries pueden asimismo ser deshidratados por el sistema spray, y el polvo obtenido utilizarse en la fabricación de productos en los que el queso es un ingrediente, tales como galletitas, cremas o pastas, artículos de panadería, etc. De esa manera se puede lograr el mismo efecto que agregando un queso bien madurado.

Hidrólisis parcial previa de la lactosa mediante β galactosidasa

La aplicación de esta enzima en particular en la caseificación provoca el desarrollo de características organolépticas más pronunciadas en menor tiempo (Law, 1980).

Es sabido que la β galactosidasa produce la hidrólisis de la lactosa escindiéndola en glucosa y galactosa, y también que los microorganismos usan preferentemente y más rápidamente la glucosa que la lactosa o la galactosa. En principio, esto podría sugerir que en la leche en la cual se ha hidrolizado previamente en forma parcial la lactosa los microorganismos se desarrollarían más rápidamente, y así, en iguales tiempos, se tendría en quesos elaborados con esta leche una mayor cantidad de gérmenes presentes, lo que provocaría una mayor producción de enzimas y una aceleración en la maduración.

Sin embargo, las opiniones tienden actualmente a encontrar la explicación por vías distintas. En un caso se dice que prácticamente todas las lactasas

utilizadas en las pruebas realizadas estaban contaminadas en diferentes grados con proteasas. Estas proteasas serían las verdaderas responsables de la mayor producción de nitrógeno soluble observada.

Por otra parte, está la explicación que dice que efectivamente las proteasas de contaminación serían las causantes de una demolición previa de las proteínas de la leche, pero que esto provocaría la presencia de un sustrato más fácil de asimilar por las bacterias lácticas del fermento primario, las que así se multiplicarían más rápidamente.

Se puede concluir entonces que la hidrólisis de la lactosa no sería la verdadera responsable de la aceleración y, según lo manifiestan algunos autores, el mismo efecto se lograría usando la proteasa contaminante.

Diversos trabajos de investigación han arribado a conclusiones que confirman esta suposición. Se ha establecido, por ejemplo, que la adición a la leche de un preparado comercial de lactasa aislada de *Kluyveromyces lactis* no provoca un aumento en la producción de ácido por lactobacilos termófilos. Contrariamente, esto sí sucede con el *Streptococcus thermophilus*; sin embargo, se ha demostrado que esta estimulación no se debe a la hidrólisis de la lactosa. En efecto, la adición a la leche de β -D-galactosidasa purificada o de una mezcla de glucosa y galactosa, simulando una hidrólisis parcial, no produjo estimulación. El efecto causado por el empleo de la lactasa comercial se debe probablemente a una ligera hidrólisis de las proteínas de la leche provocada por enzimas presentes al estado de impurezas (El Soda y Pandian, 1991).

Ridha y col. (1984a) estudiaron la acción de la hidrólisis de la lactosa sobre la maduración de queso Cheddar. Para ello utilizaron dos preparados de β -D-galactosidasa, cuyas especificaciones generales se pueden ver en la Tabla 1.

Tabla 1

Preparados de β -D-galactosidasa utilizados para estudiar el efecto de la hidrólisis de la lactosa sobre la maduración de queso Cheddar (Ridha y col., 1984a)

	Unidades de lactasa por gramo	Unidades proteolíticas por gramo	Estado
Preparado 1	5.200	77	líquido
Preparado 2	2.500	15.000	liofilizado

En la Tabla 2 se observa la evolución del porcentaje de nitrógeno soluble durante la maduración de los quesos Cheddar elaborados con y sin agregado de β -D-galactosidasa (preparados y controles respectivamente).

Tabla 2

Nitrógeno soluble en quesos Cheddar elaborados con y sin agregado de β -D-galactosidasa. Evolución durante la maduración (Ridha y col., 1984a).

Un día	% de nitrógeno soluble			% de hidrólisis de la lactosa en la leche de elaboración	
	2 meses	4 meses	6 meses		
Control	1,15	3,17	3,96	4,86	--
Preparado 1	1,23	3,30	4,24	4,92	43,60
Control	1,03	3,47	3,50	5,37	--
Preparado 2	1,08	3,91	4,57	6,21	61,19

De los resultados de la Tabla 2 puede deducirse que cuando se trabajó con leche cuya lactosa estaba parcialmente hidrolizada se producía una mayor proporción de fracciones nitrogenadas solubles durante la maduración, más significativa cuanto mayor era el nivel de hidrólisis inicial del azúcar y cuanto más unidades proteolíticas tenía el preparado.

La electroforesis del residuo caseínico reveló también diferencias en las bandas de baja movilidad y en las correspondientes a las caseínas α_{s1} y β , siendo mayor la proteólisis en los quesos elaborados con leche parcialmente hidrolizada.

Meinardi y col. (1981) también encontraron una notable aceleración en la evolución del grado de maduración del queso Pategrás cuando el mismo era elaborado con leche parcialmente hidrolizada con un crudo enzimático de levadura que contenía proteasas naturales. Los quesos no mostraron alteraciones organolépticas.

Uso de bacterias lácticas modificadas

Como ya fue establecido, es de esperar que el incremento en el número de microorganismos lácticos presentes en el queso durante la maduración tenga sobre ésta un efecto acelerante.

Sin embargo, en los quesos en los cuales las velocidades de formación de ácido y de expulsión de suero son críticas cualquier intento por aumentar la cantidad de cultivo láctico podría influir en el proceso de elaboración y dar lugar a un producto atípico.

En vista de esto se han desarrollado diversos métodos para incrementar la concentración de enzimas del cultivo iniciador en el queso, por medio del agregado de preparados tratados para evitar la producción de ácido durante la caseificación pero que mantienen intacta su capacidad proteolítica.

Los métodos utilizados para obtención de cultivos lácticos no productores de ácido son los siguientes:

- selección de variantes que han perdido la capacidad espontáneamente;
- tratamiento de las células con lisozima;
- tratamiento térmico subletal y
- tratamiento con solventes.

Greve y col. (1983 a, b) aislaron variantes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que habían perdido espontáneamente su capacidad de fermentar la lactosa, y las utilizaron en forma de concentrados para acelerar la maduración del queso Cheddar. Este concentrado de especies mutantes contenía 10^{11} UFC mL⁻¹. Como resultado se obtuvieron quesos con mayor nivel de aminoácidos libres y con 12 semanas de avance en el desarrollo de características organolépticas respecto de los testigos, de mejor calidad y sin desarrollo de gusto amargo.

El uso de lisozima para prevenir la producción de ácido por los cultivos primarios es un método utilizado esencialmente en investigación. En efecto, su empleo a escala industrial sería antieconómico, tanto por el costo del tratamiento como por las relativamente escasas ventajas que otorga.

El tratamiento térmico subletal a 59° ó 69 °C hace perder sustancialmente la capacidad de acidificación, tanto de cultivos lácticos mesófilos como de lactobacilos o estreptococos termófilos, reduciendo su actividad proteolítica sólo entre un 10 y un 30 %, tal como fue informado por Pettersson y Sjöström (1975).

Finalmente, se ha indicado que tratando ciertas células de cultivos iniciadores con solventes orgánicos se produce la activación de algunas enzimas proteolíticas de la membrana. En un desarrollo posterior se obtuvieron células que no producen ácido láctico pero que tienen actividades peptidásicas más de 10 veces mayores que las células normales. Estas células podrían ser utilizadas junto con cultivos tradicionales.

Asimismo se han ensayado métodos de selección de bacterias lácticas por medios naturales, a fin de utilizar en los fermentos aquellas que presentan mayor capacidad de generar enzimas proteolíticas.

Autólisis celular

Numerosos autores han investigado la influencia de la lisis de las células microbianas provenientes de los fermentos primarios y secundarios sobre la profundidad de la proteólisis llevada a cabo durante la maduración de quesos. Crow y col. (1995) observaron, en quesos Cheddar elaborados bajo las mismas condiciones, con composiciones similares e igual tiempo de maduración, mayor producción de ciertos péptidos, alanina, ácido glutámico y aminoácidos de cadena ramificada con una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* de rápido decrecimiento en su viabilidad que con una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* de menor decrecimiento en la viabilidad.

La conclusión más obvia es que las peptidasas intracelulares liberadas al medio por la autólisis celular aceleran las etapas de peptidólisis, contribuyendo a aumentar los niveles de aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular presentes en el queso. Otra observación importante estuvo relacionada con el sabor amargo. Éste es producto del desbalance entre la presencia de los compuestos de él responsables y la desaparición de los mismos como consecuencia del trabajo de las peptidasas. Al aumentar la concentración de peptidasas por lisis celular, los sabores amargos son menos perceptibles.

La lisis celular puede aumentarse por varias vías; una de ellas, selección natural de las cepas que presentan una mayor capacidad espontánea. Esto se ha aplicado al queso Cheddar, para el cual se demostró que las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sobreviven mejor y por lo tanto son menos autolíticas que las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, indicadas cuando se quiere lograr una mayor rapidez en la maduración.

La adición deliberada de fagos a la leche de elaboración de quesos se ha utilizado con el fin de lisar las células del fermento. La lisis provocada por fagos resulta en la liberación de enzimas escasamente diferentes de las de una lisis normal. El procedimiento ofrece la ventaja de no tener que recurrir a una bacteria distinta como en el caso anterior, en el que las condiciones de maduración pueden verse afectadas por dicho cambio.

La autólisis celular puede ser influenciada también por tratamientos térmicos subletales de las células, por la concentración de cloruro de sodio y por la temperatura de cocción de la cuajada. Sin embargo, queda claro que si se varían estas condiciones operativas en la fabricación de los quesos se estarán también cambiando las condiciones de maduración, con lo que el producto resultante puede diferir del normal.

Una interesante revisión recientemente publicada sobre el agregado de cultivos adjuntos, atenuados o no, analiza su efecto sobre la maduración y la posibilidad de acelerar la misma (El Soda y col., 2000). El citado artículo repasa los trabajos más recientes en lo relacionado con cultivos adjuntos, con parti-

cular atención en el hecho de si contienen o no células viables, proponiendo áreas de estudio en las cuales es necesaria una investigación mayor.

Conclusiones

Si bien existe por parte de la industria un fuerte interés en el tema y se ha podido detectar una avidez notable por los resultados, aún no se ha llegado a aplicar ninguna metodología en gran escala. No es posible que un solo método resuelva todos los casos; lo más factible es que se llegue a aplicar más de un sistema de los que ofrecen las mejores perspectivas.

Resulta evidente que cualquier técnica de aceleración sólo podrá ser aplicada con éxito a determinados tipos de quesos. En los casos en donde la tradición de tipicidad ha llegado a la imposición de estrictas características organolépticas es muy difícil que alterando la evolución normal de la maduración se pueda llegar a los mismos resultados.

Para que un método de aceleración tenga posibilidades de ser adoptado por la industria, además de eficaz debe ser sencillo y económico.

El camino más correcto en la búsqueda de una metodología satisfactoria es, en primer lugar, caracterizar indudablemente al producto cuya maduración se desea acelerar, por medio de pruebas organolépticas, determinaciones físicas, químicas y bioquímicas, y luego, con estos datos, comparar las evoluciones de los productos experimentales para determinar si se ajustan o no al modelo original.

Referencias bibliográficas

- Cabrini, A.; Di Capua, E.; Muchetti, G. y Neviani, E. (1983).** Impiego di sistemi enzimatici in caseificazione. *Il Latte*, vol. 8, pp. 247-258.
- Crow, V.; Coolbear, T.; Gopal, P.; Martley, F.; McKay, L., y Riepe, H. (1995).** The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, vol. 5, pp. 855-875.
- El Hofi, M. y Ismail, A. (1998-2000).** Utilization of purified and characterized lipase from papaya (*Carica papaya*) in acceleration of Ras cheese slurry. *Egyptian Journal of Food Science*, vol. 26-28, pp. 61-72.
- El Soda, M.; Desmazeaud, M.; Aboudonia, S. y Badran, A. (1982).** Acceleration of cheese ripening by the addition of extracts from *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* to the cheese curd. *Milchwissenschaft*, vol. 37, pp. 325-327.
- El Soda, M.; Madkor, S. y Tong, S. (2000).** Adjunct cultures. Recent developments and potential significance to cheese industry. *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 609-619.
- El Soda, M. y Pandian, S. (1991).** Recent developments in accelerated cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 74, pp. 2317-2335.
- Fox, P. (1988/89).** Acceleration of cheese ripening. *Food Biotechnology*, vol. 2, pp. 133-185.
- Fox, P. y Stepaniak, L. (1993).** Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 509-530.
- Fox, P.; Wallace, J.; Morgan, S.; Lynch, C.; Niland, E. y Tobin, J. (1996).** Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, pp. 271-297.
- Frick, C.; Hicks, C. y O'Leary, J. (1984).** Use of fungal enzymes to accelerate cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 67, pp. 89-95.
- Gaya, P.; Medina, M.; Rodríguez-Marín, M. y Núñez, M. (1990).** Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, vol. 73, pp. 26-32.
- Greve, P. y Dulley, J. (1983a).** Use of *Streptococcus lactis* LAC-mutants for accelerating Cheddar cheese ripening. Part II. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 38, pp. 49-54.
- Greve, P.; Lockie, B. y Dulley, J. (1983b).** Use of *Streptococcus lactis* LAC-mutants for accelerating Cheddar cheese ripening. Part I. *Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 38, pp. 10-13.
- Kristofferson, T.; Mikolajcik, E. y Gould, I. (1967).** Cheddar cheese flavor. IV. Directed and accelerated ripening process. *Journal of Dairy Science*, vol. 50, pp. 292-297.
- Law, B. (1980).** Accelerated ripening of cheese. *Dairy Industries International*, 45, 15, 17, 19, 20, 22, 48.
- Law, B. (1981).** Accelerated ripening of cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35, 313-317.
- Law, B. (1983).** Accelerated ripening of cheese and cheese products. *International Dairy Federation, Bulletin Doc. 157*, Part 4.
- Meinardi, C.; Zalazar, C. y Pomar, F. (1981).** Maturazione del formaggio Pategrás ottenuto da latte trattato con lattasi. *Il Latte*, vol. 17, pp. 15-20.
- Nelson, J.; Jensen, R. y Pitas, R. (1977).** Pregastric esterase and other oral lipases – A review. *Journal of Dairy Science*, vol. 60, pp. 327-362.
- Petterson, H. y Sjöström, G. (1975).** Accelerated cheese ripening: a method for increasing the number of lactic acid bacteria in cheese without detrimental effect to the cheese-making process and its effect on

the cheese ripening. *Journal of Dairy Research*, vol. 42, pp. 313-326.

Ridha, S.; Crawford, R. y Tamime, A. (1984a). Comparative studies of casein breakdown in Cheddar cheese manufactured from lactose-hydrolysed milk. *Journal of Food Protection*, vol. 47, pp. 381-387.

Ridha, S.; Crawford, R. y Tamime, A. (1984b). Neutral protease food grade in Cheddar cheese accelerated ripening. *Egyptian Journal of Dairy Science*, vol. 12, pp. 63-76.

Skeie, S. (1994). Developments in microencapsulation science applicable to cheese research and development. A review. *International Dairy Journal*, vol. 4, pp. 573-595.

Sood, V. y Kosikowski, F. (1979). Accelerated Cheddar cheese ripening by added microbial enzymes. *Journal of Dairy Science*, vol. 62, pp. 1865-1872.

Srinivasan, M. y Lucey, J. (2002). Effect of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science*, vol. 85, pp. 1070-1078.

Vasaal, L. y Mocquot, G. (1967). Fermentation lactique accélérée en fromagerie grâce à l'emploi d'un nombre très élevé de bactéries. *La technique laitière*, vol. 22, pp. 9-13.

Zalazar, C.; Meinardi, C. y Candiotti, M. (1994). The effect of microbial proteases on Pategrás cheese ripening. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 12, pp. 295-301.

Capítulo 4

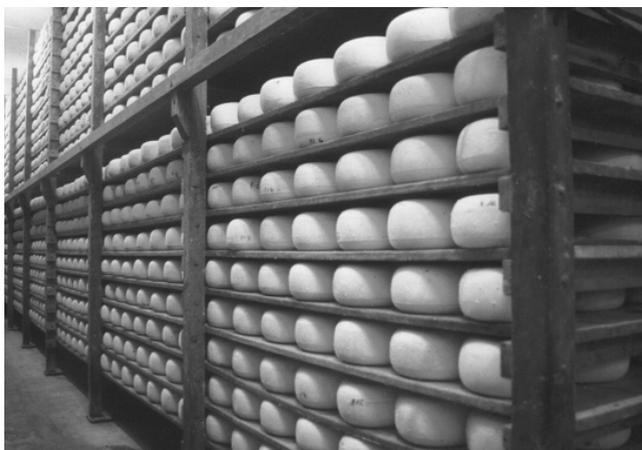
Defectos producidos durante la maduración

Carlos A. Zalazar, Mario C. Candiotti y Carlos A. Meinardi

El deseo de todo fabricante de quesos es obtener productos que se caractericen por su alta calidad, reflejada en una correcta apariencia y en características organolépticas sobresalientes (Figura 1).

Figura 1

Quesos sin defectos



Sin embargo, durante la elaboración y maduración de los quesos pueden ocurrir procesos diferentes de los cambios normales. Ello trae como consecuencia la aparición, tanto en la superficie como en la masa, de los denominados defectos, que conspiran en forma negativa en el aspecto, sabor y aroma de los productos (Carminati, 1993).

En los casos más benignos los quesos pueden ser comercializados a menor valor o bien destinarse al proceso de fusión, siempre y cuando no existan problemas de contaminaciones microbiológicas de carácter patógeno. En los casos más graves los defectos conducen a la pérdida total del lote.

Por estas razones, que atañen tanto a la calidad como al aspecto económico, se debe prestar especial atención durante la elaboración y maduración para que estos defectos no se produzcan.

Es fundamentalmente durante la elaboración que se deben arbitrar los cuidados necesarios en la calidad microbiológica y fisicoquímica de la leche, de los insumos utilizados y de la higiene del proceso, aunque durante la maduración también deben ser constantemente vigiladas las condiciones de temperatura y humedad de cámara, el volteo de los quesos y la posible presencia de insectos, roedores, ácaros, etc.

En lo que respecta a los factores que se deben cuidar durante la elaboración para evitar la aparición de defectos, es importante evitar la presencia en la leche de sustancias que puedan inhibir el desarrollo de las bacterias constitutivas de los fermentos lácticos o bien el normal proceso de coagulación y desuerado.

La presencia de todo tipo de antimicrobianos en la leche, provenientes del tratamiento de animales enfermos y/o de la limpieza de equipos de ordeño, puede provocar la inhibición de los fermentos. Otro factor importante a tener en cuenta es la existencia de bacteriófagos en el ambiente de elaboración. Esto es poco frecuente cuando se utiliza leche cruda y fermentos naturales pero bastante común cuando se trabaja con leche pasteurizada y fermentos seleccionados.

Un mal proceso de coagulación, la obtención de un coágulo débil y que desuera mal son sin duda elementos que conducirán a defectos durante la maduración. Los agentes causantes de estos problemas deben buscarse en el empleo de leches mastíticas o que han sufrido un elevado aumento de su carga de bacterias psicrotrofas durante la conservación en frío (Mahaut y col., 2000).

Los defectos más comunes que se originan por las causas mencionadas son de índole variada. A continuación se describen brevemente los principales y sus características más importantes.

Hinchazón precoz

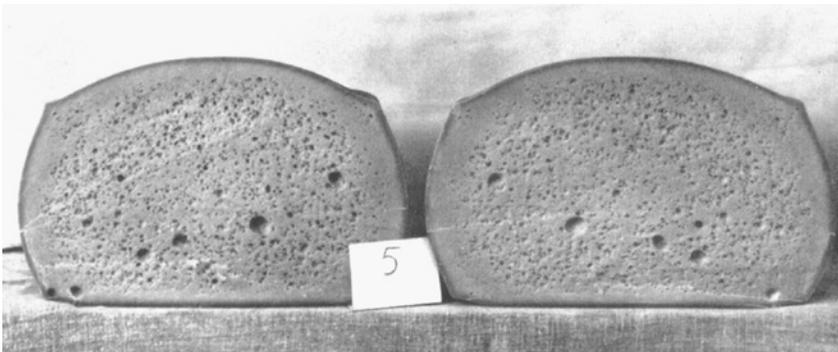
Aparece durante las primeras etapas que siguen a la elaboración, esto es durante el prensado y el salado y consiste en la formación de un gran número de pequeños ojos similares a la pinchadura de un alfiler. El problema es de naturaleza microbiológica y se debe a la explosiva proliferación de bacterias coliformes o de levaduras provenientes de la leche de elaboración. Es denominado efecto esponja o de “mil ojos” por las características que presenta la masa del queso y al aspecto desagradable que no corresponde con el tipo de queso elaborado se asocia un sabor no típico, generalmente conocido como “sabor a sucio”.

Las causas de este problema deben buscarse en el uso de leche no pasteurizada, mal pasteurizada o contaminaciones importantes con leche cruda. Asimismo, la contaminación puede estar asociada con un fermento de desarrollo muy lento que no produce a tiempo la acidez necesaria para provocar el bloqueo del desarrollo de los microorganismos anticasearios mencionados.

Los quesos blandos son los más afectados debido a la cantidad elevada de agua que presenta la cuajada, aunque el problema también puede producirse en quesos duros. En la Figura 2 se muestra el caso de una masiva contaminación de levaduras y bacterias coliformes que ha conducido a una pasta totalmente llena de pequeños ojos.

Figura 2

Hinchazón precoz en queso duro causada por una contaminación masiva con levaduras y bacterias coliformes



Hinchazón tardía

De origen microbiológico, aunque con características totalmente distintas del anterior, este defecto es propio de quesos de largo período de maduración, tal como los quesos duros italianos y el Reggianito Argentino. Se caracteriza por la aparición de grietas grandes, a veces verdaderos huecos, con olores desagradables; en casos extremos se llega a producir el reventado de la horma. Por lo general conduce al descarte del producto afectado pero si el problema no es tan significativo, sobre todo desde la óptica organoléptica, se lo puede derivar a rallado o fundido.

La causa de este defecto es la germinación de esporos de clostridios con producción de ácido butírico y anhídrido carbónico. Esto ocurre cuando el recuento de bacterias esporuladas en la leche de partida supera los 200 por litro, lo que ocurre con frecuencia cuando el ganado lechero es alimentado con forrajes ensilados.

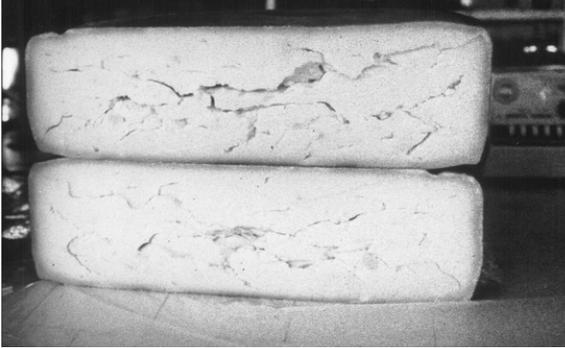
Para impedir la germinación de esporos se recurre al agregado de ciertas sustancias como la lisozima, que ha sido permitida para la elaboración del queso Grana Padano. La dosis máxima establecida es para este caso de 25 ppm en la leche de elaboración, lo que da como resultado unas 300 ppm en el queso terminado. Esta dosis es suficiente para impedir el desarrollo del *Clostridium tyrobutyricum*, si el número de esporos no supera el orden de algunos centenares por litro de leche (Corradini, 1995). La acción se ejerce sobre la forma vegetativa, durante la fase de crecimiento del espora en germinación. En la dosis indicada esta sustancia parece no tener efecto inhibitorio sobre las bacterias lácticas ni sobre los parámetros de la coagulación, como tampoco sobre las características organolépticas del queso.

La bactofugación, que consiste en un tratamiento de centrifugación diferencial calibrado para la sedimentación de microorganismos, ha sido propuesta también para reducir el número inicial de esporos presentes en la leche debido a su mayor densidad. Esta técnica permite la reducción del 96 al 98 % del número de esporos presentes en la leche, y no es eficaz cuando el número es de algunos miles por litro.

En la Figura 3 puede observarse un queso en el que la fermentación butírica ha producido un gran número de grietas.

Figura 3

Hinchazón tardía y grietas producidas por desarrollo de clostridios en quesos duros



Arricotado

Es un defecto típico de los quesos blandos. En estos productos se persigue la obtención de una pasta blanda y cremosa que presente buenas características de extensión por acción del calor. En los productos arricotados el queso no sufre ningún cambio por efecto de la temperatura, lo que constituye un problema importante ya que estos quesos son usados muy a menudo en la preparación de platos calientes.

El defecto se presenta cuando hay un excesivo desarrollo de acidez en la cuajada antes de su ingreso a salmuera, por ejemplo cuando se alcanza un pH inferior a 4,9-5,0. En estos niveles de acidez la estructura caseínica de la leche ha perdido gran parte de su tramado original y las micelas se encuentran en una considerable proporción como submicelas aisladas, con la consiguiente desmineralización (pérdida de calcio) y falta de agua ligada en su entorno. Por estas razones el queso pierde humedad en los primeros días y se torna duro posteriormente.

Este defecto puede ser causado asimismo por un fermento demasiado rápido que no se pueda detener por inmersión de la cuajada en salmuera fría, o bien por el empleo de bacterias mesófilas en épocas veraniegas. En la Figura 4 puede observarse un queso Cremoso argentino normal, mientras que en la Figura 5 se muestra el mismo tipo de queso en el que se ha manifestado el defecto de arricotado.

Figura 4

Queso Cremoso Argentino normal

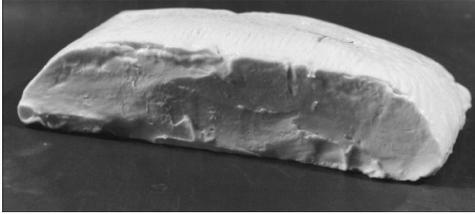


Figura 5

Queso Cremoso Argentino presentando el defecto de arricotado



Presencia de manchas blanquecinas y gomosas en la superficie

Se trata de un problema típico de quesos duros. En la superficie de los mismos aparecen, generalmente después del primer mes de maduración, zonas blanquecinas que exudan un líquido pegajoso.

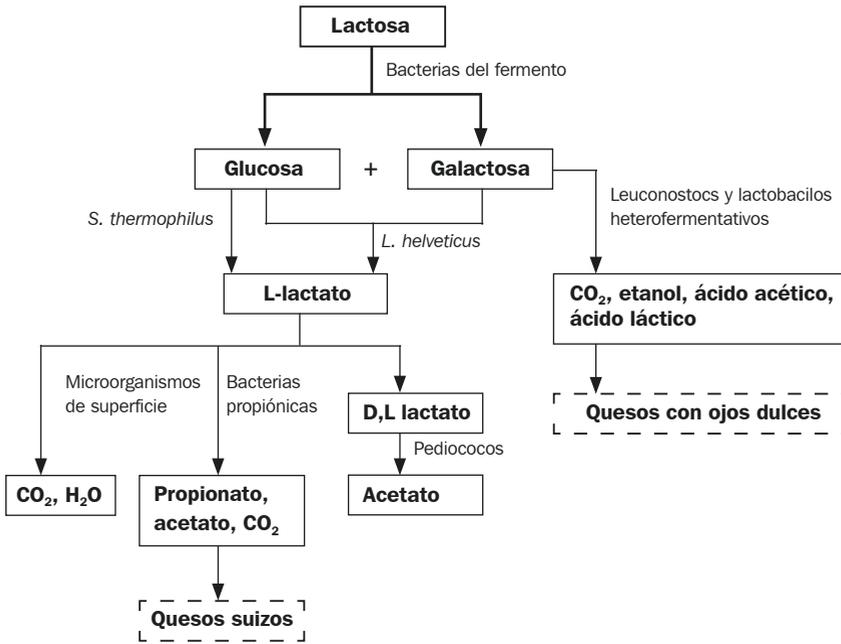
En la mayoría de los casos la causa del problema es la utilización de leche proveniente de animales con mastitis. En efecto, los elevados recuentos de células somáticas, la presencia de gérmenes no casearios y el desequilibrio entre las proteínas de suero y las caseínas dan origen a este defecto.

Ausencia de ojos

Durante el proceso de maduración pueden formarse en los quesos dos tipos de ojos. Por una parte se tienen los denominados dulces, característicos de quesos suaves como el Gouda o el Pategrás, que se originan por la fermentación de la lactosa luego de ser hidrolizada a glucosa y galactosa, por acción de bacterias heterofermentativas tales como leuconostocs y lactobacilos heterofermentativos, con producción de anhídrido carbónico, etanol y ácidos acético y láctico. Por otro lado están los ojos picantes, originados por la fermentación del lactato a propionato, acetato y anhídrido carbónico que llevan a cabo las bacterias propiónicas y que son característicos de los quesos tipo suizo, como el Gruyère y el Emmental. En la Figura 6 se esquematizan las vías de metabolismo de la lactosa que conducen a la formación de los dos tipos de ojos citados, como así también a otros compuestos.

Figura 6

Vías de metabolización de la lactosa durante la maduración de quesos



En los quesos con ojos dulces la falta de ojos puede ser consecuencia del uso de leche con una carga baja o inexistente de bacterias heterofermentativas, la conducción del proceso de pasteurización a temperaturas demasiado elevadas, el empleo excesivo de nitratos en la leche, o bien la ejecución de una elaboración demasiado ácida que inhibe el desarrollo de las bacterias heterofermentativas. Actualmente existen fermentos heterofermentativos directos seleccionados, con lo cual puede resolverse fácilmente la ausencia de estas bacterias en la leche de elaboración.

En el caso de quesos tipo suizo, en los que los ojos son producidos por bacterias propiónicas, la ausencia de estos ojos puede ser debida a la poca disponibilidad de lactato, que es su sustrato específico. Esta poca disponibilidad puede estar asociada con el uso exclusivo de *Streptococcus thermophilus* como fermento primario, que no posee la capacidad de fermentar la galactosa a lactato. Por esta razón, en este tipo de queso debe agregarse siempre una cierta dosis de fermento natural de suero o en su defecto algún lactobacilo termófilo seleccionado capaz de metabolizar dicho sustrato.

Otro problema que suele aparecer en el caso de quesos suizos es la formación

de grietas o rasgaduras, defecto asociado con una pasta demasiado dura que se quiebra por efecto de la presión ejercida por el anhídrido carbónico. Dicha pasta es el resultado de un bajo nivel de proteólisis ejercido por el coagulante y las bacterias del fermento primario antes de que el queso sea ingresado a la cámara “caliente” para que se lleve a cabo la fermentación propiónica. En la Figura 7 puede observarse un queso que presenta este defecto.

Figura 7

Queso Emmental con grietas y rasgaduras asociadas a una masa demasiado dura y quebradiza, junto con una fermentación propiónica excesiva



Defectos originados en el salado

Cuando la cuajada permanece en la salmuera más tiempo que el correspondiente al tipo de queso que se está elaborando, el defecto se traduce en la formación de una capa de color blanquecino muy salada inmediatamente debajo de la superficie. Esta alta concentración zonal de sal impide que las enzimas presentes en el queso puedan llevar a cabo su trabajo de proteólisis, quedando por lo tanto esta región sin madurar. Por esta razón y por el secado debido a la rápida evaporación del agua en la parte superficial, esta parte aparece como seca, dura, quebradiza y de pronunciado sabor salado.

Cuando la salmuera no está saturada pueden ocurrir problemas, que se agudizan a medida que la concentración de sal baja. Por lo general, el inconveniente se manifiesta con la aparición sobre la superficie del queso de una capa de consistencia gomosa, que es debida a la proteólisis ocasionada por las levaduras que se desarrollan en ausencia de una concentración de sal convenientemente elevada. En los casos más graves pueden ocurrir desarrollos microbianos tan importantes que conducen a la putrefacción del queso.

Defectos de coloración

El problema de la aparición de una coloración rosada en quesos duros ha sido largamente observado desde hace mucho tiempo. En el caso particular de los quesos duros italianos las primeras comunicaciones al respecto datan de la década del 60, informadas por Bottazzi y Corradini (1966).

Las causas probables propuestas son variadas e incluyen posibles reacciones químicas de colorantes agregados a la leche tales como el annato; el crecimiento de bacterias cromógenas; la presencia de nitritos, nitratos y bacterias reductoras de nitratos; ciertos tipos de bacterias termófilas; la presencia de algunos tipos de cepas de bacterias propiónicas, etc.

Otros autores han estudiado la posibilidad de extraer el colorante por diversos medios, llegando a la conclusión de que el color rosado puede deberse a un compuesto unido en forma covalente con la proteína, o bien a una modificación química de la misma.

Shanon y Olson (1968) llegaron a la conclusión de que la aparición de la coloración rosada estaba relacionada con la capacidad de ciertas bacterias de ejercer efectos sobre el potencial de óxido-reducción del queso. Se llegó así a establecer que algunas especies termófilas, como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*, eran productoras de coloración, mientras que otras como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* o *Streptococcus thermophilus* no la producían.

Este último concepto fue retomado recientemente. Bottazzi y col.(2000), con el aporte de nuevos métodos analíticos estudiaron la aparición de coloración rosada en queso Grana Padano. Para ello elaboraron dos quesos distintos: uno empleando un cultivo monocepa de *Lactobacillus helveticus* y otro con fermento natural de suero.

Luego de ocho meses de maduración se practicaron distintos tipos de análisis. Una observación visual indicó la formación de coloración rosada a unos 5 cm por debajo de la cáscara del queso monocepa, mientras que el queso con fermento natural de suero no presentó coloración. En el queso monocepa resultó también evidente la formación de cristales de tirosina, observables a simple vista.

El grado de maduración del queso monocepa fue también superior: 34,58 % contra 31,25 % del queso elaborado con fermento natural, constatándose asimismo una mayor producción de aminoácidos libres, sobre todo de treonina, triptofano, leucina, lisina, ácido glutámico, tirosina, valina y fenilalanina. Todos estos factores estarían revelando una mayor actividad proteolítica de la cepa de *Lactobacillus helveticus*, la cual, pese a ser el componente mayoritario del fermento natural, ejerce un efecto menor al presentarse asociada con otras cepas.

Estos autores plantean la posibilidad de que la tirosina dé lugar, por acción

de una tirosinasa, a la aparición de compuestos coloreados. En los quesos con fermento natural, el índice menor de este aminoácido evitaría el problema. Teniendo en cuenta estas consideraciones, plantean finalmente la necesidad de realizar estudios adecuados para alcanzar una profunda caracterización bioquímica y molecular de las cepas, a fin de conocer las acciones sinérgicas que se originan en sus asociaciones y evaluar sus propiedades tecnológicas antes de resolver su empleo en la elaboración de quesos.

En vista de los datos recogidos puede decirse que algunas bacterias termófilas constitutivas de fermentos podrían ser la causa de la coloración rosada, preferentemente cuando actúan solas, aunque no se descarta que podrían producir el mismo efecto en menor magnitud cuando se presentan asociadas con otros microorganismos, tal como sucede en los sueros fermento naturales. En estos casos lo recomendable sería cambiar el suero por otro de distinta procedencia.

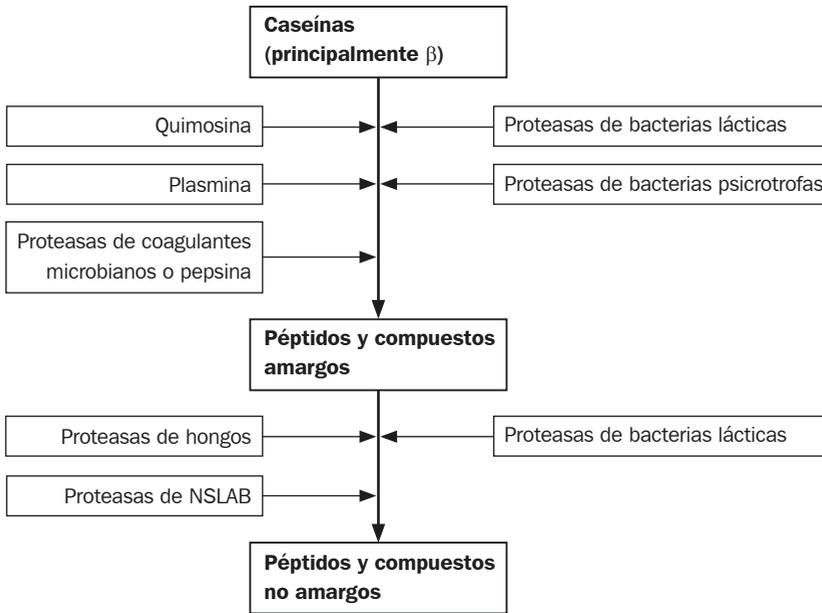
Defectos de sabor

La aparición de sabor amargo es un defecto bastante común en los quesos y se manifiesta en forma más intensa en aquellos productos de sabor suave, ya que en los de sabor intenso puede quedar enmascarado. Por lo general se debe a la acumulación durante la maduración de péptidos de bajo peso molecular, alrededor de 6.000 dalton, que derivan principalmente de la caseína β y tienen un elevado grado de hidrofobicidad. También han sido señalados como causantes de este defecto compuestos tales como ciertos aminoácidos, aminas, amidas, cetonas de cadena larga y monoglicéridos.

En realidad, los compuestos responsables del sabor amargo se forman siempre durante la maduración de quesos pero, cuando el defecto no se manifiesta es porque existe un equilibrio entre sus velocidades de formación y de desaparición por degradación a péptidos de menor peso molecular u otros compuestos no amargos. Solamente aparece cuando la velocidad de formación es superior a la de su desaparición. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se elaboran quesos con leches que han sido mantenidas en frío por largo tiempo, ya que en este caso su elevada carga de bacterias psicrotrofas produce la liberación de enzimas proteolíticas capaces de producir el desbalance mencionado anteriormente. Este desbalance se puede producir también cuando son empleados coagulantes de leche fuertemente proteolíticos, como lo son los de origen microbiano y los que tienen pepsina en elevadas proporciones en su composición. En la Figura 8 se puede apreciar un esquema de la formación y desaparición de compuestos del sabor amargo.

Figura 8

Esquema de formación y desaparición de compuestos responsables de sabor amargo durante la maduración de quesos



Los sabores rancios son producidos a partir de las transformaciones que sufren los ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos libres son generados por lipasas de distintos orígenes y, cuando su producción es demasiado elevada aparece el defecto de enranciamiento. También en este caso, la presencia de lipasas provenientes de bacterias psicrotrofas puede causar este defecto.

Por las razones apuntadas, en la elaboración de quesos debe evitarse el uso de leche que ha sido mantenida en frío por más de 48 horas.

Desarrollo de hongos y bacterias en la superficie

Diversos tipos de microorganismos no casearios pueden desarrollarse en la superficie durante la permanencia de los quesos en la sala de maduración. Este desarrollo se ve favorecido por la buena cantidad de nutrientes que proporciona el queso y por las condiciones de humedad y temperatura de la sala.

Los hongos son los microorganismos más comunes causantes de este defecto y pueden ser evitados con una buena limpieza de los quesos o bien recurriendo

al pintado con sustancias antifúngicas incorporadas. En la Figura 9 se muestra la aparición incipiente de hongos sobre la superficie, mientras que en la Figura 10 se observa una invasión más extensa a causa de la ausencia de tareas preventivas. En la Figura 11 en cambio, se muestra el caso del desarrollo de una bacteria superficial que ha producido una coloración rosada sobre la corteza.

Ácaro del queso

Se trata de un arácnido sumamente pequeño, de aproximadamente 0,5 mm de longitud. El mismo roe la cáscara de los quesos maduros y de pasta dura y penetra al interior dejando un agujero y generando un polvillo muy sutil, que cae sobre los estantes, especialmente en época de verano (Parisi, 1971). El polvillo, que en ocasiones forma un verdadero velo sobre el queso dando la impresión de que el mismo está rodeado de una especie de “barba”, tal como puede apreciarse en la Figura 12, hace que los quesos pierdan valor comercial por el aspecto que presentan. La Figura 13 muestra un esquema del ácaro causante del defecto.

Este problema, de difícil erradicación si avanza porque se instala no sólo en el queso sino en las estanterías y en general en toda la sala de maduración, no aparece cuando los quesos son bien tratados en su superficie y se mantiene una correcta limpieza en la sala de maduración.

Figura 9

Desarrollo incipiente de hongos en la superficie de quesos duros



Figura 10

Extenso desarrollo de hongos en la superficie de quesos blandos



Figura 11

Coloración rosada producida por contaminación bacteriana sobre la superficie de quesos



Figura 12

Quesos contaminados con ácaros donde se puede observar la formación de polvillo en la superficie

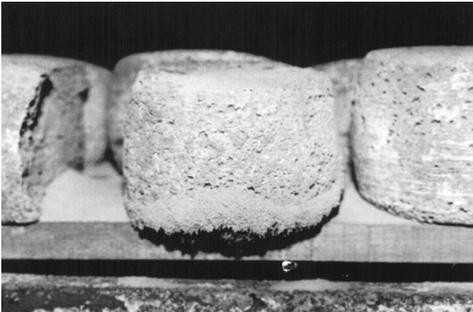
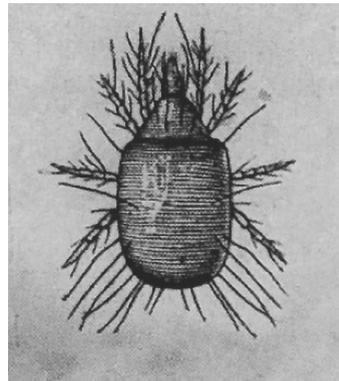


Figura 13

Ácaro del queso



Referencias bibliográficas

- Bottazzi, V.; Cappa, F.; Scolari, G. y Parisi, M. (2000).** Comparsa di colorazione rosa in formaggio grana prodotto con starter monocultura. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 51, 67-75.
- Botazzi, V. y Corradini, C. (1966).** Sulla comparsa di colorazione rosa nel formaggio grana. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 17, 384-386.
- Carminati, D. (1993).** Il contenimento dei difetti. *L'industria del latte*, 29, 97-106.
- Corradini, C. (1995).** *Chimica e Tecnologia del Latte*. Tecniche Nuove, Milano, 201.
- Mahaut, M.; Jeantet, R. y Brulé, G. (2000).** *Initiation à la technologie fromagère*. Editions Tec & Doc., Paris.
- Parisi, O. (1971).** *Il formaggio Grana*. Società Tipografica Editrice Modenese, Modena.
- Shanon, E. y Olson, N. (1968).** Pink discoloration in Italian varieties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 51, 613-614.

Sección 6

**Avances en el conocimiento
de la maduración de los
quesos duros argentinos**

Si bien en los últimos años la industria quesera ha experimentado en nuestro país importantes avances, todavía es poco lo que se conoce en lo referente a la tecnología de elaboración y maduración y a las características y parámetros de calidad de cada variedad de queso. El estudio de estos aspectos es de gran importancia para conocer el producto y estandarizar su calidad a través del establecimiento de parámetros de tipicidad, consiguiéndose además sumar valor agregado a través de certificaciones, sellos de calidad, apelaciones de origen, etc. (Zalazar y col., 1999b).

En el presente capítulo se describen los avances más recientes en el estudio de la bioquímica de la maduración del queso Reggianito Argentino, la variedad de queso duro de mayor producción en nuestro país, que han sido enfocados hacia varios de los aspectos menos conocidos de este proceso, en algunos casos confirmando las hipótesis más aceptadas y en otros agregando nuevos elementos de discusión.

A pesar de que los quesos duros han sido poco estudiados, existen varias hipótesis sobre la bioquímica de su maduración que son generalmente aceptadas. A partir de la experiencia general, el conocimiento sobre otras variedades y diversos estudios *in vitro*, se considera que la enzima coagulante residual no interviene significativamente en la proteólisis y que la plasmina juega un rol preponderante en la misma. Por otra parte, el uso de fermentos naturales de suero para la elaboración de quesos duros argentinos es una práctica muy arraigada que hasta el momento no ha sido reemplazada, debido probablemente a la falta de información básica sobre la influencia de las bacterias lácticas en la elaboración y la calidad del producto final.

Capítulo 1

Avances en el conocimiento de la maduración de los quesos duros argentinos

Erica R. Hynes, María C. Perotti, Susana M. Bernal, Mario C. Candiotti, Carina V. Bergamini, Diego J. Mercanti

Influencia de la enzima coagulante residual

La enzima coagulante es un importante agente proteolítico en la maduración de la mayor parte de las variedades de queso. Después de la elaboración, en la cuajada se conserva una baja proporción de la actividad del coagulante agregado a la leche, en un rango que varía entre el 0 y el 15 % (Sousa y col., 2001). A pesar de que la cantidad retenida es relativamente baja, ya que la mayor parte se pierde con el suero, esta proporción minoritaria de enzima coagulante puede causar una degradación extensiva de las caseínas que conforman la matriz proteica del queso, tal como ha sido evidenciado en quesos blandos y semiduros (Noomen, 1978; O'Keefe y col., 1978; Hynes y col., 2001, entre otros). En los quesos duros, generalmente se considera que la proporción de actividad de enzima coagulante retenida es muy baja o nula, debido a que la misma se inactiva en gran medida durante la etapa de la cocción (Gaiaschi y col., 2000; Sousa y col., 2001; Gagnaire y col., 2001), aunque se desconoce la magnitud y el grado de reversibilidad de esta desnaturalización.

La caseína α_{s1} es hidrolizada por acción de la quimosina en el sitio primario Phe₂₃-Phe₂₄ para dar dos péptidos, el $\alpha_{s1}(f1-23)$ y el $\alpha_{s1}(f24-199)$, también llamado α_{s1} - I (Carles y Ribadeau Dumas, 1985; McSweeney y col., 1993).

Esta hidrólisis reviste gran importancia, ya que se considera que la caseína α_{s1} hace un aporte estructural significativo a la matriz proteica del queso, y su degradación favorece el ablandamiento del mismo debido a la rotura de la red y a la mayor hidrofiliidad del péptido α_{s1} -I con respecto a la caseína de origen (Hynes y col., 2001). Dicha transformación ha sido detectada en etapas tempranas de la maduración en quesos blandos y semiduros, lo que es coherente con la actividad residual relativamente alta de la quimosina en estas variedades (de Jong, 1978). Sin embargo, el péptido α_{s1} -I también se encontró en quesos duros, donde su presencia es más difícil de explicar.

Existen varias hipótesis para justificar la aparición del péptido α_{s1} -I en quesos duros, aunque todavía no se cuenta con evidencia concluyente para probarlas. Delacroix-Buchet y Fournier (1992) demostraron que un incremento en la temperatura de cocción desde 52 hasta 56 °C disminuía el grado de hidrólisis de la caseína α_{s1} en quesos Gruyère franceses, lo que sugiere que la enzima coagulante residual hace un aporte a la producción de α_{s1} -I en esta variedad. Kindstedt y col. (1995) encontraron que la proteólisis estaba significativamente disminuida en quesos Mozzarella cuando se utilizaba una dosis reducida de coagulante, lo que indica que la enzima retiene cierta actividad durante la maduración a pesar de las altas temperaturas de cocción. Otros investigadores postularon que el péptido α_{s1} -I es producido por la quimosina en la tina, durante la elaboración y antes del calentamiento de la cuajada (Gaiaschi y col., 2000; Chianese y col., 1996).

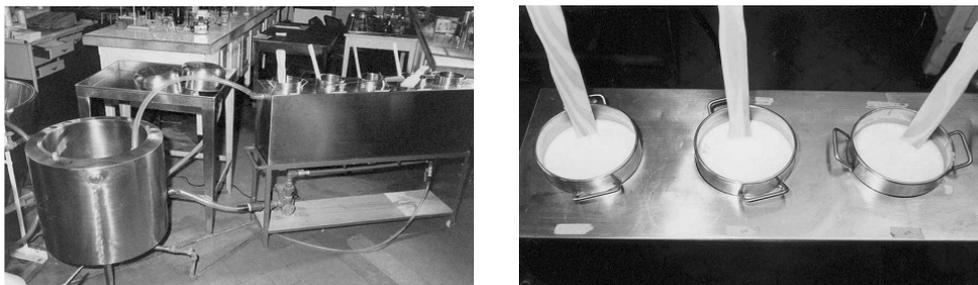
A su vez, Visser y de Groot-Mostert (1977) detectaron la formación de α_{s1} -I en queso Gouda con cuajo inactivado, después de seis meses de maduración. Se sugirió que la presencia de α_{s1} -I se debía ya sea a la acción de la proteasa ácida nativa de la leche, catepsina D, o a pequeñas cantidades de cuajo residual (Larsen y col., 2000). Estos últimos detectaron α_{s1} -I en queso feta elaborado sin cuajo, a las 39 semanas de almacenamiento, lo que fue probablemente resultado de la actividad de la catepsina D sobre la caseína α_{s1} . Hurley y col. (2000a) también informaron que la hidrólisis de la caseína α_{s1} en queso tipo Quarg elaborado sin cuajo y sin fermento podía ser atribuida a la catepsina D; sin embargo, estos autores no detectaron el péptido α_{s1} -I en Quarg de 12 semanas. Gagnaire y col. (2001) elaboraron quesos Emmental usando un coagulante termolábil proveniente de *Chryphonectria parasitica*, y consideraron que la enzima se desnaturalizaba totalmente durante la etapa de cocción. Los péptidos α_{s1} (f1-23) y α_{s1} -I fueron detectados en el extracto acuoso y el residuo insoluble del queso respectivamente, lo que fue explicado por los autores como una consecuencia de la acción de las proteasas de pared del fermento y la proteasa nativa catepsina D. Sin embargo, otros autores consideran que α_{s1} (f1-23) no se forma mediante la acción de las proteasas de pared del fermento (Visser, 1993).

Por otra parte, se conoce que la actividad de la plasmina es elevada en quesos duros debido a la inactivación térmica de los inhibidores de los activadores del plasminógeno, que resulta en una mayor conversión del precursor para dar la enzima activa (Sousa y col., 2001). Sin embargo, la acción de la plasmina se dirige principalmente a las caseínas β y α_{s2} , y en menor medida hacia la α_{s1} , a la cual hidroliza en sitios diferentes del Phe₂₃-Phe₂₄ (Gaiaschi y col., 2000).

Como puede concluirse de los párrafos anteriores, aunque diferentes autores han detectado en quesos duros los productos de la hidrólisis de la caseína α_{s1} en el enlace peptídico Phe₂₃-Phe₂₄, no existe un verdadero consenso acerca de cuál o cuáles son los agentes proteolíticos que la provocan. En este contexto, Hynes y col. (2004) realizaron un trabajo de investigación dirigido a determinar la influencia de la enzima coagulante residual en la hidrólisis de la caseína α_{s1} en queso Reggianito Argentino. Para llevar a cabo este estudio se utilizó una estrategia basada en la aplicación de diferentes temperaturas durante la etapa de cocción. Para ello se empleó un conjunto de tinas de 5 L de capacidad, ubicadas en un solo conjunto calefactor, lo que permitió realizar las elaboraciones en paralelo (Figura 1). De acuerdo con la tecnología estándar de queso Reggianito Argentino, la mezcla de suero y partículas de cuajada se calentó siguiendo una rampa suave ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) desde la temperatura de coagulación ($33\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta alcanzar una temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este punto, una de las tinas fue extraída del conjunto calefactor, el suero se eliminó y se moldeó la cuajada, obteniéndose un queso experimental cuya temperatura de cocción fue más baja que lo habitual ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$). Mientras tanto, se continuó el calentamiento en las otras dos tinas, esta vez más rápidamente ($1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Cuando la temperatura de la mezcla suero-cuajada alcanzó los $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, se extrajo la segunda tina y se procedió como antes, para obtener un queso Reggianito testigo cuya temperatura de cocción fue la estándar ($52\text{ }^{\circ}\text{C}$). La cocción continuó en la tercera tina hasta que la temperatura alcanzó los $60\text{ }^{\circ}\text{C}$; en este momento se procedió como en los dos casos precedentes para obtener un queso cuya etapa de cocción se realizó a temperatura más alta que lo usual ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Figura 1

Tinas queseras utilizadas para elaboraciones de quesos en paralelo



Los quesos obtenidos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la actividad residual de la enzima coagulante, y mediante electroforesis y HPLC para el estudio de la proteólisis.

Los quesos tratados a baja temperatura durante la cocción mostraron mayor actividad residual inicial de enzima coagulante que aquellos obtenidos a temperatura alta o estándar, en los cuales esta actividad fue casi nula (Figura 2). La actividad residual del coagulante se incrementó rápidamente durante la maduración, obteniéndose los valores máximos luego de 45 días de almacenamiento. Teniendo en cuenta estos resultados se correlacionó la actividad del coagulante con la temperatura de cocción, para quesos de 0, 45 y 90 días de maduración. Se detectó que dicha actividad era inversamente proporcional a la temperatura de cocción, siguiendo una relación lineal (Figura 3). Las rectas de correlación mostraron una tendencia similar para los tres valores de tiempo de maduración, y los quesos de 45 días fueron los que mostraron mayor actividad de enzima coagulante.

Figura 2

Evolución de la actividad residual de la enzima coagulante durante la maduración de quesos elaborados con diferente temperatura de cocción (Hynes y col., 2004)

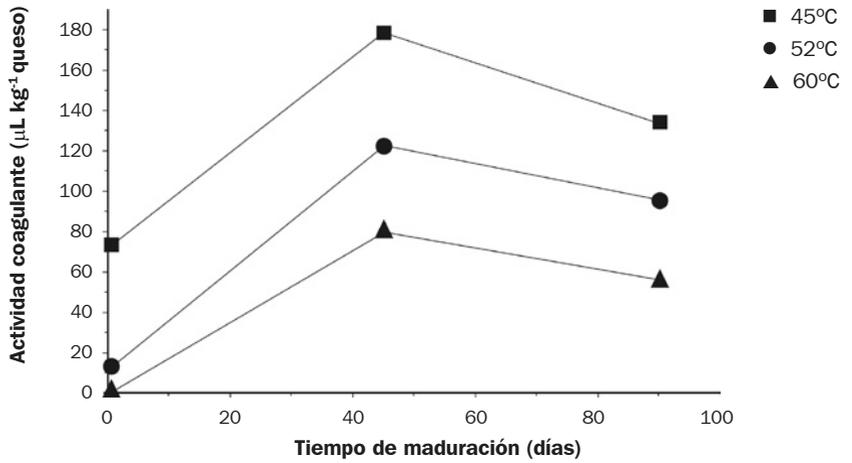
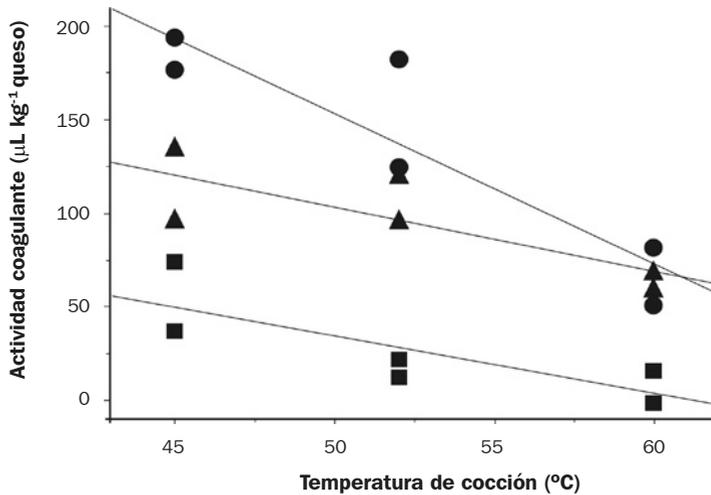


Figura 3

Correlación entre la actividad residual de la enzima coagulante y la temperatura de cocción de la cuajada, para los quesos a 1 (■), 45 (●) y 90 (▲) días de maduración (Hynes y col., 2004)

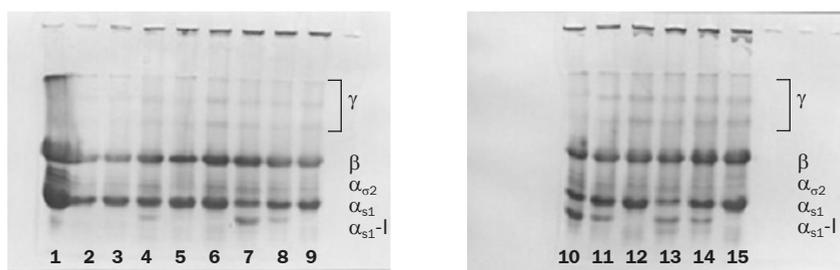


Coefficientes de correlación: $R=-0,80701$, $P=0,05227$ (quesos a 1 día de maduración); $R=-0,79793$, $P=0,05712$ (quesos a los 45 días de maduración); $R=-0,91013$, $P=0,01175$ (quesos a los 90 días de maduración)

Los perfiles de electroforesis demostraron que el péptido α_{s1} -I aparecía en los quesos tratados a 45 °C en los primeros días de la maduración pero no se detectaba en el queso testigo sino hasta después de 15 días. En el queso cuya cocción se efectuó a alta temperatura no se observó la formación de α_{s1} -I (Figura 4).

Figura 4

Perfiles electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 de quesos elaborados con diferentes temperaturas de cocción (Hynes y col., 2004)

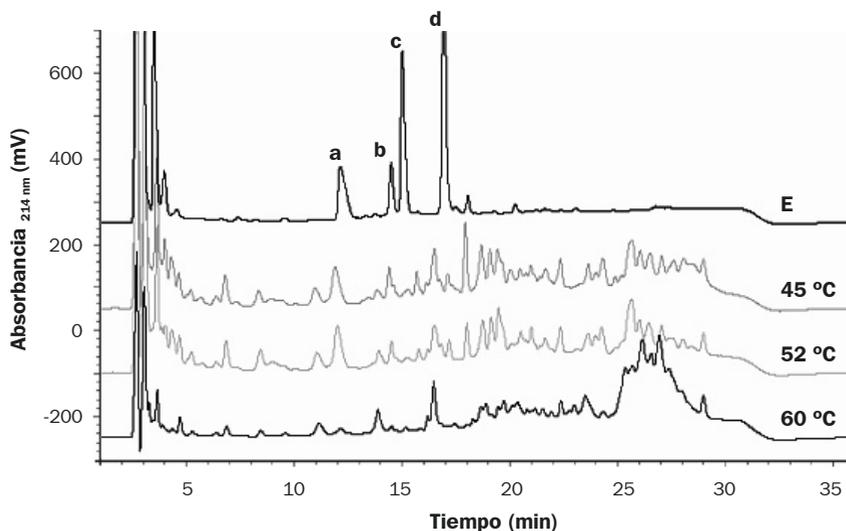


Línea 1: caseinato de sodio; **2:** coágulo; **3:** cuajada luego del corte y antes de la cocción; **4-6:** quesos a 1 día de maduración, con temperatura de cocción de 45°, 52° y 60°C, respectivamente; **7-9:** los mismos quesos en idéntico orden a los 15 días de maduración; **10-12:** los mismos quesos en idéntico orden a los 45 días de maduración; **13-15:** los mismos quesos en idéntico orden de 90 días de maduración

Los cromatogramas de la fracción soluble del queso fueron bastante simples al principio de la maduración pero luego se volvieron más complejos. No se detectaron picos provenientes de caseína α_{s1} en las primeras etapas de la fabricación pero, un pico con el mismo tiempo de retención de la fracción α_{s1} (f1-23) apareció en los quesos elaborados a 45 °C después de 24 horas. El péptido no se acumuló durante la maduración, probablemente porque fue rápidamente degradado por las proteasas y peptidasas del fermento. En la Figura 5 se observan cromatogramas de la fracción soluble de quesos de 15 días obtenidos a 45°, 52° y 60 °C respectivamente, comparados con un estándar consistente en caseína α_{s1} incubada con quimosina. Como puede verse en la figura, los picos provenientes de la hidrólisis de la caseína son más pronunciados en los quesos jóvenes cuya etapa de cocción se realizó a 45 °C, mientras que son intermedios para los quesos testigo y muy bajos para los tratados a 60 °C.

Figura 5

Perfiles cromatográficos de la fracción soluble a pH 4,6 de quesos elaborados con diferentes temperaturas de cocción, a los 15 días de maduración (Hynes y col., 2004)



a, b, c, d: picos cuyo tiempo de retención coinciden con aquellos resultantes de la hidrólisis de un estándar de caseína α_{s1} por quimosina (**E**)

Los resultados obtenidos aportaron evidencia científica sobre el hecho de que la enzima coagulante puede contribuir a la proteólisis durante la maduración del queso Reggiano Argentino, aparentemente en mayor grado de lo que se pensaba anteriormente.

El calentamiento prolongado puede destruir todas las enzimas utilizadas como coagulantes de leche. Por ejemplo, un coagulante líquido de bovino que contenía quimosina y pepsina se inactivó completamente en leche descremada después de 23,6 min a 60 °C (Walsh y Xioashan Li, 2000). Sin embargo, los tratamientos térmicos tan enérgicos no son usuales en tecnología quesera, donde la etapa de cocción puede ser prolongada (30 minutos a 1 hora en quesos suizos y Parmigiano Reggiano) pero generalmente se lleva a cabo a menores temperaturas (56 °C máximo).

Si bien en diferentes trabajos de investigación se ha informado que la actividad residual de enzima coagulante es nula o muy baja en quesos duros (Rampilli y col. 1998), Hynes y col. (2004) demostraron que la actividad residual del coagulante puede aumentar desde niveles no detectables hasta valores conside-

rables a lo largo de la maduración. Este incremento probablemente se debe a que el despliegue de la enzima es un fenómeno reversible, y ésta se renaturaliza lentamente una vez que las condiciones ambientales desfavorables se revierten, en este caso después de que finaliza la etapa de cocción (Lehninger, 1995).

La catepsina D, proteasa aspártica nativa presente en la leche, también puede contribuir a la hidrólisis de la caseína α_{s1} durante la maduración de los quesos de pasta dura. Dicha enzima actúa sobre las caseínas en forma similar a la quimosina, aunque curiosamente tiene una actividad coagulante muy pobre, ya que hidroliza lentamente la caseína κ (McSweeney y Sousa, 2000; Hurley y col., 2000b). Por otra parte, esta proteasa se encuentra en la leche mayoritariamente en la fracción soluble, es decir en el suero, no asociada a las micelas de caseína (Hynes y col., 2003).

Como conclusión, se puede considerar que el coagulante residual contribuye, al menos parcialmente, a la degradación de la caseína α_{s1} en quesos duros, con la consiguiente formación de caseína α_{s1} -I y la fracción α_{s1} (f1-23) en quesos Reggianito. Esta hidrólisis, que se produce al principio de la maduración en los quesos blandos y conduce a su típica textura cremosa, parece por el contrario bastante retrasada en quesos duros. Este fenómeno puede deberse a que la enzima muestra muy baja actividad residual inicial, pero se renaturalizaría durante las primeras semanas de maduración (Hynes y col., 2003). Si bien los resultados obtenidos implican un avance importante en el estudio de esta variedad de queso, se requiere mayor evidencia científica para comprobar las hipótesis sustentadas y determinar las consecuencias de la proteólisis de la caseína α_{s1} sobre la textura, el aroma y el sabor de los quesos duros.

Influencia de la plasmina

Las características de esta enzima natural de la leche han sido brindadas con detalle en el Capítulo 1 de la Sección 5. Allí se describe el sistema de la plasmina, sus condiciones de acción en forma general y en especial para quesos duros. Se discuten, además, las características hidrolíticas sobre cada caseína y se brindan algunos resultados sobre el contenido de plasmina y plasminógeno en quesos blandos, semiduros y duros argentinos.

Los fermentos naturales de suero en la elaboración de quesos duros

Si bien la calidad de los quesos duros está asociada con diversos factores, entre los cuales se destacan las características propias de la leche usada en la

elaboración, el equipamiento y la tecnología de elaboración empleados en los diferentes establecimientos, las bacterias lácticas del fermento juegan un papel fundamental (Zalazar, 1998; Zalazar y col., 1999a y 1999b). La principal función tecnológica de las mismas consiste en la metabolización de la lactosa para producir ácido láctico, proceso que mejora la coagulación y la sinéresis, y protege el producto final contra contaminaciones no lácticas (microorganismos patógenos y perjudiciales). Por otra parte, los fermentos también cumplen con una importante función durante la maduración del queso, ya que contribuyen al desarrollo de aroma y sabor a través de actividades bioquímicas tales como el metabolismo de carbohidratos, proteólisis, y en menor medida lipólisis (Crow y col., 1993; Fox y col., 1993; Fox y McSweeney, 1996; Choisi y col., 1997).

Aunque el queso es uno de los alimentos más antiguos y se cree que su origen se remonta al período Neolítico (aproximadamente 6000 A.C.), recién a partir del desarrollo del proceso de pasteurización (1862 D.C.) se comenzó a comprender el rol que ejercen los microorganismos en su elaboración. Inicialmente, la acidificación de la leche cruda era llevada a cabo por las bacterias lácticas naturalmente presentes en la misma. Posteriormente se introdujo el sistema de “pie de cuba”, basado en el uso de fermentos naturales de suero o de leche provenientes de fabricaciones de días anteriores. En la actualidad, la mayor parte de la producción casearia mundial se obtiene mediante la inoculación de la leche con fermentos lácticos de agregado directo a tina. Estos fermentos, liofilizados o congelados, poseen una composición microbiológica perfectamente conocida, consistente en una o varias cepas o especies. Sin embargo, varios tipos de quesos protegidos por la legislación europea mediante la figura de la Denominación de Origen Protegida o Controlada (DOP y DOC) son elaborados con fermentos naturales, por ejemplo Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Comté y Beaufort (Ministero Agricoltura e Foreste, 1992; ANAOF, 1993; Robinson, 1995; Mucchetti y col., 1998). Estos productos tienen un importante valor económico, razón por la cual se producen según reglas artesanales estrictas, de tradición varias veces centenaria. Los fermentos naturales de suero son usados para la manufactura de quesos duros, principalmente en Italia y Francia, costumbre que se ha trasladado también a nuestro país, donde se los utiliza con exclusividad para la elaboración de estos tipos de quesos (Gallino, 1994; Mucchetti y col., 1998; Zalazar y col., 1999b; Mahaut y col., 2000).

Para preparar el fermento natural de suero se recupera un volumen predeterminado de suero una vez que finaliza la etapa de cocción, a unos 52 °C. Posteriormente, se lo mantiene durante toda la noche a temperatura decreciente (desde aproximadamente 52 °C hasta temperatura ambiente). Bajo estas condiciones se desarrollan principalmente bacterias del género *Lactobacillus* (95 - 97 %), con escaso porcentaje de *Streptococcus* y una cierta microflora

contaminante no láctica (Gallino, 1994). No obstante, la composición microbiológica del fermento natural de suero puede verse afectada significativamente por parámetros ecológicos o tecnológicos (microbiota autóctona, velocidad de descenso de la temperatura, temperatura de cocción y temperatura ambiente, entre otros). Como consecuencia de equilibrios múltiples y selección natural, después de la incubación se obtiene un fermento complejo cuyo pH es cercano a 3,00. De esta manera, a partir de cada elaboración se obtiene el fermento que se utilizará al día siguiente. Sin embargo, las modificaciones en la tecnología pueden conducir a graves problemas en la obtención del fermento, que se traducen fundamentalmente en retrasos en la acidificación.

Influencia del coagulante utilizado en la elaboración del queso sobre la velocidad de acidificación de fermentos naturales de suero

Hasta la década del 90 los fermentos naturales de suero se obtenían a partir de suero proveniente de fabricaciones realizadas con coagulante de bovino adulto, el cual es una preparación comercial que contiene las proteasas quimosina y pepsina, en una proporción que en general corresponde al 20 y 80 % respectivamente. A comienzos de los 90, la quimosina producida por microorganismos genéticamente modificados comenzó a reemplazar en el mercado local al coagulante de bovino adulto, lo que dio lugar no solamente a cambios en la coagulación durante la fabricación del queso sino también a modificaciones en los fermentos naturales de suero. Los queseros notaron que la velocidad de acidificación de estos fermentos resultaba menor cuando el coagulante de bovino era reemplazado por quimosina recombinante. Como consecuencia, el tiempo de coagulación en planta resultaba alterado debido al retraso sufrido por los cultivos. Teniendo en cuenta estas observaciones prácticas, Meinardi y col. (2002) llevaron a cabo un estudio cuyo objetivo fue determinar la incidencia del tipo de coagulante utilizado en la velocidad de acidificación de los fermentos de suero. Para determinar si el coagulante usado tenía alguna influencia en la acidificación de los sueros se elaboraron quesos a escala piloto en forma simultánea, empleando un conjunto de tinas paralelas que permiten realizar todas las operaciones al mismo tiempo (Figura 1). Se ensayaron distintos coagulantes: una preparación líquida de coagulante bovino adulto (Naturen, Chr. Hansen, Quilmes, Argentina) y tres marcas comerciales de quimosina obtenida a partir de microorganismos genéticamente modificados, una en polvo (Maxiren®, Gist Brocades, Seclin, Francia) y dos líquidas (Chymax®, Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina; Chymogen®, Chr. Hansen, Horshølm, Dinamarca).

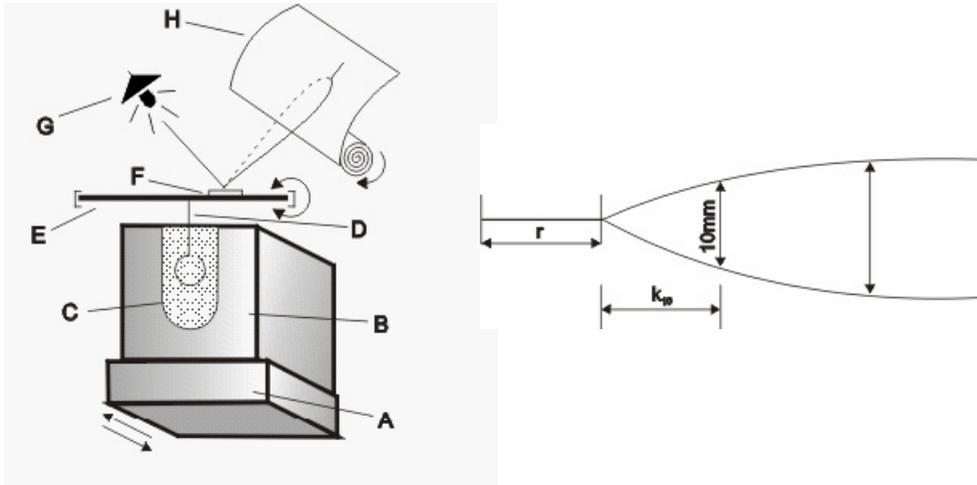
En forma previa a las elaboraciones de quesos se realizó un estudio lactodi-

namográfico para calcular las cantidades de cada enzima que eran exactamente equivalentes desde el punto de vista de la coagulación. Para ello se utilizó el equipo Formagraph (Foss Electric, Höganäs, Dinamarca), que permitió comparar el tiempo de coagulación y la firmeza del gel obtenido. La concentración de cada una de las enzimas usada en la fabricación de los quesos fue establecida de manera de asegurar una coagulación simultánea y adquisición de fuerza del coágulo comparable en las cuatro tinas (Marziali y Ng-Kwai-Hang, 1986; Zalazar y col., 1995; Zalazar y col., 1997).

En el instrumento Formagraph (Figura 6) las muestras de leche se colocan en celdas de 10 mL dispuestas en un bloque de metal calefaccionado eléctricamente. Se agrega la enzima coagulante, se agita, y se sumerge en la leche un péndulo con forma de aro. El bloque de metal comienza a moverse horizontalmente con un movimiento alternativo de izquierda a derecha, con una amplitud total de 1,4 mm y un tiempo de oscilación de 15 s. El brazo del péndulo posee un espejo que refleja una luz intermitente hacia un papel fotosensible, realizando una marca. Mientras la leche es líquida, la viscosidad es baja y el arrastre del péndulo es muy leve, no moviéndose prácticamente de su posición original, de manera que el trazado que aparece en el papel fotosensible es una línea recta. Cuando la leche coagula, la viscosidad aumenta, y el péndulo se desplaza con respecto a su posición inicial, lo que resulta en una bifurcación del trazado. Un diagrama típico se muestra en la Figura 6. La longitud de la línea recta r , representa el tiempo de coagulación, mientras que k_{10} es el tiempo requerido a partir de la coagulación para que el diagrama alcance una amplitud de 10 mm. El valor $r+k_{10}$ generalmente se utiliza como un indicador del tiempo necesario para que la cuajada alcance una firmeza preestablecida (Fox y McSweeney, 1998).

Figura 6

Esquema del instrumento Formagraph para el estudio de la coagulación enzimática de la leche, y de un trazado típico del mismo (Meinardi y col., 2002)



A: placa móvil calefaccionada; **B:** bloque de aluminio; **C:** muestra de leche; **D:** péndulo; **E:** eje conectado al péndulo; **F:** espejo; **G:** fuente luminosa; **H:** papel fotográfico sensible; **r:** tiempo de coagulación en minutos; **k₁₀:** tiempo medido desde el inicio de la coagulación hasta que las ramas tienen una separación de 10 mm

Meinardi y col. (2002) determinaron, para cuajo de bovino adulto con una concentración de $0,50 \text{ mL L}^{-1}$ de leche, un valor de $r+k_{10}$ de 19,8 min, que fue tomado como testigo. Posteriormente, se prepararon soluciones de las otras enzimas a distintas concentraciones y se eligieron aquellas con las que se obtuvo el mismo valor de $r+k_{10}$. Los resultados fueron: $0,50$ y $0,45 \text{ mL L}^{-1}$ para Chymax® y Chymogen®, respectivamente, y $0,012 \text{ g L}^{-1}$ para Maxiren®.

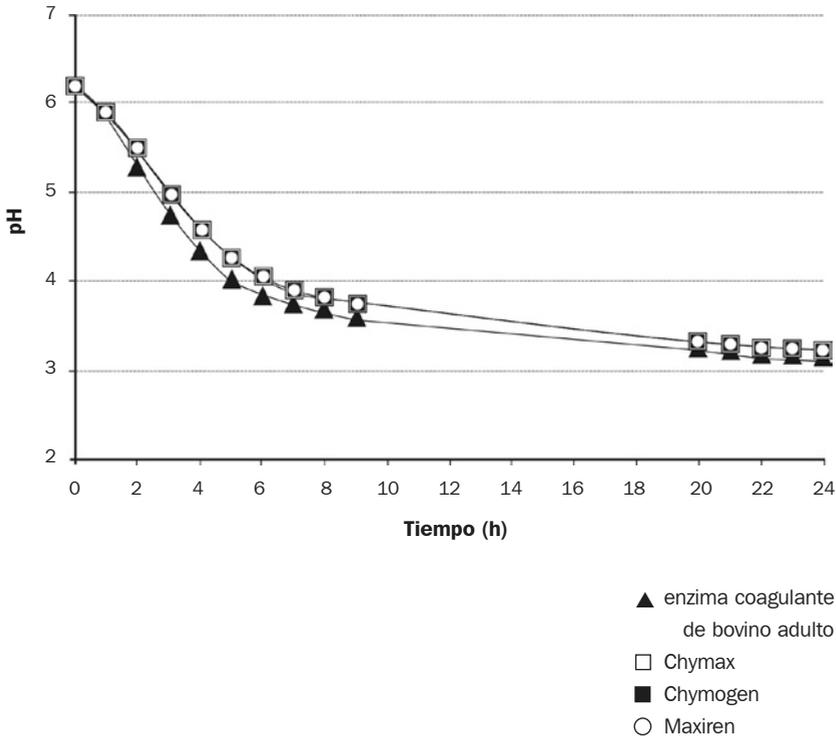
Se realizaron ocho fabricaciones de quesos en ocho días sucesivos. En cada una de las cuatro tinas paralelas se ensayó una enzima distinta. El fermento natural de suero de la primera elaboración se obtuvo de una industria cercana (Milkaut Coop. Ltda., Colonia Nueva, Santa Fe). Para obtener el fermento de suero de los días subsiguientes se recuperaron 500 mL de suero de cada tina luego de la cocción, que se incubaron a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el otro día. Los fermentos de suero de los primeros tres días no se analizaron, para evitar eventuales efectos de arrastre del fermento proveniente de la industria. A partir del cuarto día se comenzaron a tomar muestras de los fermentos de suero, para determinar

acidez titulable y pH durante la incubación. Asimismo, se estudiaron los compuestos nitrogenados presentes mediante la técnica de fraccionamiento de nitrógeno.

En la Figura 7 se observan las curvas de descenso de pH correspondientes a la incubación de fermentos de suero obtenidos a partir del cuarto día de elaboración. Como puede observarse, el fermento de suero obtenido a partir de las fabricaciones con cuajo de bovino adulto produjo una acidificación más rápida, separándose del resto de los fermentos de suero a las dos horas de incubación. El pH al final de la incubación (24 h) fue significativamente diferente para el cuajo de bovino adulto y las quimosinas recombinantes, alcanzando valores de $3,12 \pm 0,04$ y $3,23 \pm 0,01$ respectivamente. En cuanto a la acidez titulable, también demostró ser significativamente diferente: $1,699 \pm 0,006$ % y $1,435 \pm 0,004$ % de ácido láctico, para coagulante de bovino adulto y quimosinas recombinantes respectivamente.

Figura 7

Evolución del pH durante la incubación de suero proveniente de diferentes tinas de 4 días de elaboración (Meinardi y col., 2002)



Con relación a los compuestos nitrogenados presentes, se comprobó que los fermentos de suero obtenidos mediante elaboración con quimosina recombinante tenían una concentración significativamente menor de sustancias nitrogenadas que los fermentos provenientes de fabricaciones con coagulante de bovino adulto, en todo el rango de pesos moleculares. Esta característica es muy probablemente el resultado de la mayor relación actividad coagulante/actividad proteolítica de la quimosina, que previene la proteólisis no específica durante la elaboración. En efecto, mientras que la quimosina pura hidroliza específicamente el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caseína κ , la pepsina presente en el coagulante de bovino adulto exhibe una actividad proteolítica inespecífica más alta (Guinee y Wilkinson, 1992).

Se concluyó que los fermentos de suero obtenidos a partir de elaboraciones con quimosina recombinante acidifican más lentamente porque proveen menos material nitrogenado a las bacterias lácticas. De este modo, si el objetivo del queso es obtener tiempos similares de fabricación y productos finales comparables con los obtenidos con coagulante de bovino adulto sería conveniente suplementar el suero con un hidrolizado de caseínas u otras fuentes de nitrógeno antes de la incubación.

Reemplazo del fermento de suero por cepas seleccionadas de *Lactobacillus helveticus*

Fermentos y elaboración de queso Reggianito Argentino

Los fermentos naturales de suero empleados en la elaboración de quesos duros presentan la ventaja de poseer una microflora compleja, lo cual por un lado da lugar a la obtención de intensos sabores y aromas que son característicos de los productos al final de la maduración y, por otro lado confiere resistencia al ataque de fagos (Bottazzi y col., 1992; Giraffa y col., 1997). Sin embargo, la utilización de estos cultivos naturales conlleva algunas desventajas. En efecto, modificaciones en la tecnología y la producción primaria ocasionan cambios en la microflora de estos fermentos naturales, por lo que su capacidad acidificante, aromatizante e inhibidora de la microflora indeseable puede variar continuamente, no pudiéndose asegurar la constancia en la calidad del producto. Por otra parte, también se presenta el problema de contaminaciones no lácticas.

Sin embargo, a pesar de las desventajas citadas anteriormente existe bastante resistencia al reemplazo de estos cultivos naturales complejos por cultivos comerciales liofilizados o congelados de agregado directo a tina, de composición microbiológica simple, ya que los mismos podrían alterar las características sensoriales típicas del producto (Zamboni, 1994; Reinheimer

y col., 1996). Además, estos cultivos no realizan un aporte inicial de ácido láctico, condición necesaria en la tecnología de elaboración de quesos duros para llevar a cabo la coagulación a un pH de alrededor de 6,50, lo que sí se logra empleando cultivos naturales, ya que éstos poseen un pH bajo. El objetivo de muchos investigadores ha sido encontrar un fermento que reúna las ventajas de los cultivos naturales y de las cepas comerciales (Bosi y col., 1991; Paleari y col., 1996; Bottazzi y col., 1999).

Para salvar las irregularidades que se presentan con los fermentos naturales de suero se desarrollaron estrategias prácticas, tales como la utilización de fermentos de suero termizados o la inoculación del suero fresco con bacterias seleccionadas. Esta última alternativa consiste básicamente en el agregado de una o varias cepas de bacterias lácticas, fundamentalmente termófilas, seleccionadas de acuerdo con sus características fisiológicas, bioquímicas, genéticas y tecnológicas. De esta forma se obtienen fermentos de suero enriquecidos en cepas que presentan características constantes y conocidas y resultan óptimas para caracterizar la tecnología de elaboración de un determinado tipo de queso, apuntando a lograr constancia en la calidad del mismo (Zamboni, 1994; Reinheimer, 1994; Fox y McSweeney, 1998). Esta tecnología ha sido ensayada por autores italianos para mejorar y estandarizar la calidad de los fermentos naturales de suero (Bosi y col., 1991; Mucchetti, 1997; Zalazar y col., 1999a y 1999b), y por investigadores argentinos, quienes emplearon estos fermentos en la elaboración de quesos Reggianito Argentino a escala piloto (Zalazar y col., 1999a). La adición de bacterias seleccionadas permitiría el enriquecimiento del fermento natural otorgándole mayor actividad acidificante, mayor actividad proteolítica, resistencia a los inhibidores y una mayor constancia en la composición microbiológica (Zamboni, 1994; Gallino, 1994; Mucchetti, 1997). No obstante, es posible que las cepas agregadas no prosperen si el fermento natural cuenta con una flora autóctona adecuada y se ha respetado la tecnología de preparación del mismo. En todo caso, es muy difícil conocer la influencia de una o más cepas adicionadas a un ecosistema tan complejo como el fermento natural de suero.

Reinheimer y col. (1995, 1996) y Quiberoni y col. (1997, 1998) realizaron numerosos trabajos de investigación sobre los fermentos de suero y su aplicación a quesos duros. En una primera etapa se caracterizaron microbiológicamente los fermentos, estudiándose las cepas aisladas mediante técnicas biomoleculares que permiten identificar las especies y determinar la biodiversidad de la flora, lo que permitió obtener un importante cepario de lactobacilos termófilos. De este modo se reveló una elevada concentración de lactobacilos homofermentativos, como *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, y muy escasa proporción de *Streptococcus thermophilus*. La ausencia de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* puede

señalarse como la principal diferencia con los fermentos de suero italianos, los cuales poseen además *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* y *Streptococcus thermophilus*. Como flora contaminante se hallaron levaduras, pero no se detectaron bacterias esporuladas (*Bacillus* y *Clostridium*) ni coliformes (Zalazar y col., 1999a, 1999b). En cuanto a las características tecnológicas se encontró que estos fermentos poseían una buena capacidad acidificante, similar a la publicada por investigadores italianos. También presentaron una considerable actividad proteolítica, lo cual es de suma importancia ya que está directamente relacionado con la evolución del proceso de maduración, influyendo en las características organolépticas de los quesos (Reinheimer, 1994; Reinheimer y col., 1995, 1996). Paralelamente, se investigó la resistencia de estas cepas a la sal y al ataque de fagos.

Sobre la base de los resultados de estos análisis se inició otra etapa de la investigación, consistente en ensayar las cepas más interesantes desde el punto de vista tecnológico, como fermentos para la elaboración de queso Reggiano. Se seleccionaron tres cepas de *Lactobacillus helveticus*: SF133, SF138 y SF209.

Candiotti y col. (2002) estudiaron la posibilidad de reemplazar un fermento natural de suero por otro que contenga las cepas seleccionadas. Para ello inocularon las cepas de interés en suero dulce de quesería tratado térmicamente. El suero obtenido luego de la etapa de cocción de una elaboración de queso Reggiano en una industria láctea fue estandarizado a pH 6,30, y dividido en tres alícuotas. Una de ellas se incubó para obtener el fermento de suero testigo (24 h a 45 °C). Las otras alícuotas se trataron térmicamente (5 min a 85 °C) con el objetivo de lograr la destrucción de las células viables presentes, luego de lo cual se enfriaron a 45 °C, se sembraron con cada cepa de interés al 2 % v/v (a partir de un cultivo en leche estéril) y se incubaron como el suero testigo.

Las cepas seleccionadas se ensayaron, tanto en forma individual como en combinaciones de dos y tres, en fabricaciones realizadas en planta piloto, obteniéndose de esta manera los quesos experimentales. Asimismo, se elaboraron quesos testigo utilizando el suero fermento sin tratamiento térmico. Los quesos se obtuvieron según la tecnología estándar de queso Reggiano (Gallino, 1994; Zalazar y col., 1999b) y se maduraron durante seis meses. Para minimizar la influencia de factores incontrolados las fabricaciones se realizaron por triplicado.

Los cultivos obtenidos mediante incubación de las cepas seleccionadas alcanzaron un pH ligeramente mayor que los fermentos naturales después de 24 h de incubación: $3,25 \pm 0,05$ y $3,15 \pm 0,05$, respectivamente. Sin embargo, esta diferencia no se reflejó en cambios durante la elaboración, ya que la inoculación, tiempo de coagulación y firmeza del gel fueron similares en

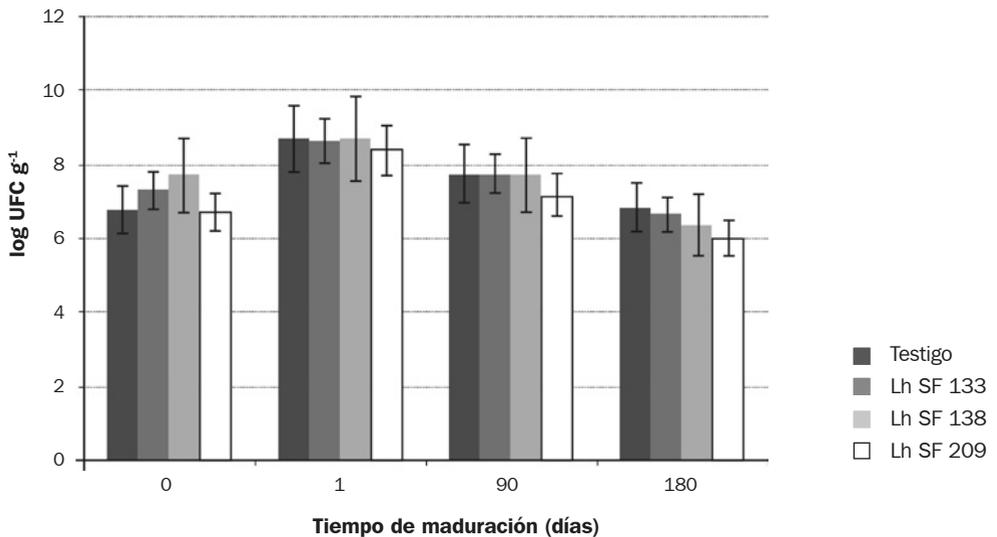
todos los casos. La composición global de los quesos obtenidos (pH, extracto seco, contenido de materia grasa y de proteína) tampoco mostró diferencias significativas para distintos fermentos, lo que indica que la tecnología y los cultivos fueron comparables.

No se detectaron microorganismos esporulados en las muestras de suero fresco. Luego de la incubación, los hongos y levaduras alcanzaron recuentos de aproximadamente 10^4 UFC g^{-1} en los fermentos de suero testigo, y no se detectaron en los fermentos experimentales, los cuales habían sido tratados térmicamente previo a la incubación.

La Figura 8 muestra la evolución de la población láctica durante la maduración para los diferentes quesos. En prácticamente todos los casos el recuento fue de 10^7 UFC g^{-1} en la cuajada antes del moldeo de los quesos. Durante las primeras 24 h el recuento alcanzó alrededor de 10^8 UFC g^{-1} , y luego decreció uno o dos órdenes logarítmicos durante la maduración. Los fermentos que contenían la cepa SF209, ya sea sola o en combinaciones con las otras dos cepas ensayadas, llegaron a recuentos menores que los demás, lo que puede ser un índice de mayor muerte celular.

Figura 8

Evolución de la microflora láctica durante la maduración de quesos Reggiano elaborados con fermento de suero natural (testigo), y con cepas seleccionadas de *Lactobacillus helveticus*: Lh SF133, Lh SF138 y Lh SF209 (Candiotti y col., 2002)



Las bacterias coliformes estuvieron en todos los casos por debajo de 10^2 UFC g^{-1} en los quesos de 180 días.

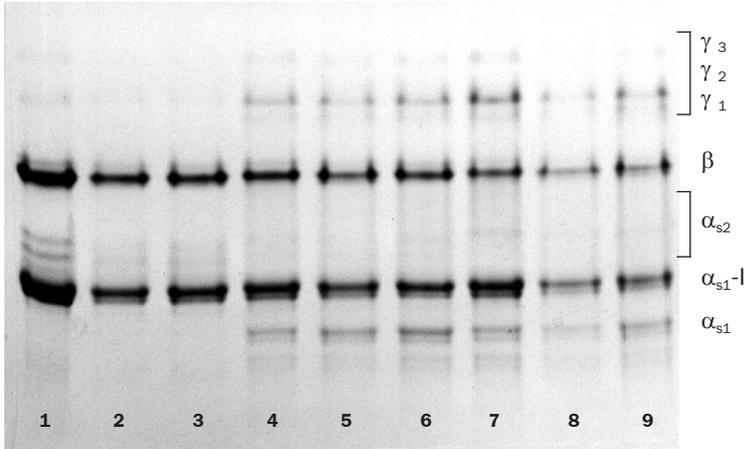
Proteólisis

La evaluación cuantitativa de la proteólisis primaria y secundaria se realizó a través del fraccionamiento de nitrógeno. Se analizó el contenido de nitrógeno en los quesos en las fracciones solubles a pH 4,6, en ácido tricloroacético (TCA) al 12 % y en ácido fosfotúngstico (PTA) al 2,5 %, que representan los péptidos grandes a medianos, los medios a pequeños, y los oligopéptidos y aminoácidos libres, respectivamente (Ardö, 1999). La proteólisis se estudió también mediante cromatografía líquida en fase reversa de la fracción soluble en agua. Por otra parte, se llevó a cabo un análisis cualitativo de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos, mediante electroforesis a pH alcalino en gel de poliacrilamida en presencia de urea (Urea-PAGE). Los quesos fueron analizados mediante estas metodologías a los 0, 90 y 180 días de maduración.

La proteólisis primaria fue muy similar en todos los quesos, tanto en aquellos elaborados con fermentos naturales como con cepas seleccionadas. Estos resultados no resultan sorprendentes, ya que la hidrólisis primaria de las caseínas para generar grandes péptidos se atribuye generalmente a la plasmina en el caso de quesos duros y, como se vio anteriormente en este capítulo, posiblemente contribuya también la enzima coagulante residual (Hynes y col., 2003). Aunque *Lactobacillus helveticus* muestra una de las proteasas de pared más enérgicas, capaz de atacar a las caseínas α_{s1} y β *in vitro* (Torriani y col., 1994), esta acción no fue detectada en los quesos, tal cual lo muestra la similitud en los perfiles electroforéticos presentados en la Figura 9.

Figura 9

Electroforesis (urea-PAGE) de los quesos Reggiano a los 0, 90 y 180 días de maduración (Candiotti y col., 2002)



Líneas 1-3: quesos de 0 días de maduración elaborados con fermento de suero natural (testigo), y con cepas seleccionadas de *Lactobacillus helveticus*: Lh SF133 y Lh SF138, respectivamente. **Líneas 4-6:** quesos de 90 días de maduración elaborados con fermento de suero natural (testigo), y con cepas seleccionadas de *Lactobacillus helveticus*: Lh SF133 y Lh SF138, respectivamente. **Líneas 7-9:** quesos de 180 días de maduración elaborados con fermento de suero natural (testigo), y con cepas seleccionadas de *Lactobacillus helveticus*: Lh SF133 y Lh SF138, respectivamente

Los quesos mostraron valores similares de nitrógeno soluble a pH 4,6 pero, a lo largo de la maduración comenzaron a aparecer diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en los niveles de nitrógeno soluble en TCA y PTA (Tabla 1). Los quesos elaborados con la cepa SF209, sola o en combinaciones, tuvieron los niveles más elevados de proteólisis, mientras que los más bajos correspondieron a aquellos elaborados con la cepa SF138. Este hecho posiblemente se deba a la diferente actividad de las peptidasas de estos lactobacilos sobre los péptidos provenientes de la proteólisis primaria. En efecto, si la población del fermento elaborado con la cepa SF209 disminuyó más rápidamente durante la maduración y llegó a valores menores, es razonable suponer que esta cepa sufrió lisis y se produjo la liberación de las peptidasas endocelulares en la masa de queso, donde estas enzimas actuaron más intensamente (Candiotti y col., 2002).

Tabla 1

Contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), en ácido tricloroacético al 12 % (NS-TCA) y en ácido fosfotúngstico al 2,5 % (NS-PTA), expresado como porcentaje del nitrógeno total, en quesos con 0, 90 y 180 días de maduración (Hynes y col. 2003)

Quesos	NS-pH 4,6			NS TCA			NS PTA		
	Días de maduración			Días de maduración			Días de maduración		
	0	90	180	0	90	180	0	90	180
C	3,8 ^a ± 0,2	12,9 ^a ± 0,8	16,7 ^a ± 0,3	1,2 ^a ± 0,1	9,1 ^a ± 1,2	13,3 ^{bc} ± 1,2	0,7 ^a ± 0,1	4,0 ^a ± 1,3	8,5 ^{ab} ± 0,8
SF Lh133	3,4 ^a ± 0,2	12,2 ^a ± 1,1	14,8 ^a ± 1,5	1,3 ^a ± 0,6	11,2 ^a ± 1,0	13,4 ^{bc} ± 2,2	0,8 ^a ± 0,3	5,3 ^a ± 1,3	7,2 ^{bc} ± 0,6
SF Lh138	3,5 ^a ± 0,3	13,0 ^a ± 1,2	17,5 ^a ± 3,1	1,3 ^a ± 0,1	9,3 ^a ± 1,2	11,6 ^c ± 2,1	0,7 ^a ± 0,2	4,6 ^a ± 0,3	6,6 ^{bc} ± 0,8
SF Lh209	3,6 ^a ± 0,3	12,5 ^a ± 1,3	17,4 ^a ± 1,7	1,1 ^a ± 0,1	10,7 ^a ± 1,1	18,7 ^a ± 1,0	0,7 ^a ± 0,1	5,2 ^a ± 1,3	10,5 ^a ± 1,3
SF Lh133-138	3,4 ^a ± 0,1	12,7 ^a ± 0,5	16,3 ^a ± 1,6	1,2 ^a ± 0,1	7,5 ^a ± 1,3	11,9 ^c ± 0,7	0,6 ^a ± 0,1	3,2 ^a ± 0,7	5,1 ^c ± 1,1
SF Lh138-209	3,6 ^a ± 0,1	12,9 ^a ± 1,2	18,0 ^a ± 4,0	1,1 ^a ± 0,1	9,9 ^a ± 2,5	15,6 ^{abc} ± 1,9	0,7 ^a ± 0,1	4,2 ^a ± 0,4	8,9 ^{ab} ± 1,9
SF Lh209-133	3,8 ^a ± 0,4	12,9 ^a ± 2,6	17,4 ^a ± 4,9	1,2 ^a ± 0,1	10,3 ^a ± 0,7	16,2 ^{ab} ± 2,0	0,7 ^a ± 0,1	4,6 ^a ± 0,3	9,3 ^{ab} ± 2,3
SF Lh133-138-209	3,2 ^a ± 0,4	12,4 ^a ± 1,6	19,2 ^a ± 4,5	0,9 ^a ± 0,1	11,6 ^a ± 2,3	16,8 ^{ab} ± 1,6	0,7 ^a ± 0,1	5,5 ^a ± 1,4	11,2 ^a ± 1,3

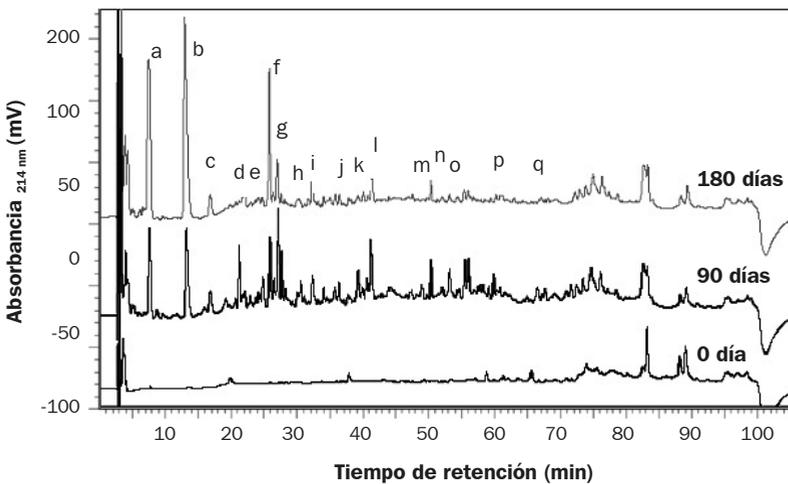
^{a,b,c} Las medias dentro de la misma columna con diferente superíndice presentan diferencia significativa ($p < 0,05$).

C: quesos elaborados con fermento de suero natural (control); **SF Lh133, SF Lh138 y SF Lh209:** quesos elaborados con fermento monocepa de *Lactobacillus helveticus* SF Lh133, SF Lh138 o SF Lh209, respectivamente; **SF Lh133-138, SF Lh138-209 y SF Lh209-133:** quesos elaborados con fermento compuesto por dos cepas; **SF Lh133-138-209:** quesos elaborados con fermento compuesto por tres cepas. Promedio ± desviación estándar, n = 3

Los cromatogramas obtenidos por HPLC del extracto soluble a un determinado tiempo de maduración constituyen una "fotografía instantánea" de la proteólisis en ese momento, y los picos que aparecen en cada perfil dependen del equilibrio entre la producción de péptidos y su degradación para dar aminoácidos libres y sus metabolitos. Los cromatogramas de los quesos recién elaborados fueron muy simples y mostraron pocos picos, mientras que los de 90 y 180 días tuvieron mayor cantidad de ellos, con áreas y alturas mucho mayores (Figura 10). Luego de una comparación visual se eligieron, entre los numerosos picos presentes, aquellos cuyas áreas y alturas tenían mayor variabilidad, que se identificaron con letras de la a a la q en orden alfabético.

Figura 10

Perfiles peptídicos obtenidos por cromatografía en fase reversa, de quesos elaborados con un cultivo de *Lactobacillus helveticus* compuesto de tres cepas seleccionadas (Lh SF133-138-209), a 0, 90 y 180 días de maduración (Hynes y col., 2003)



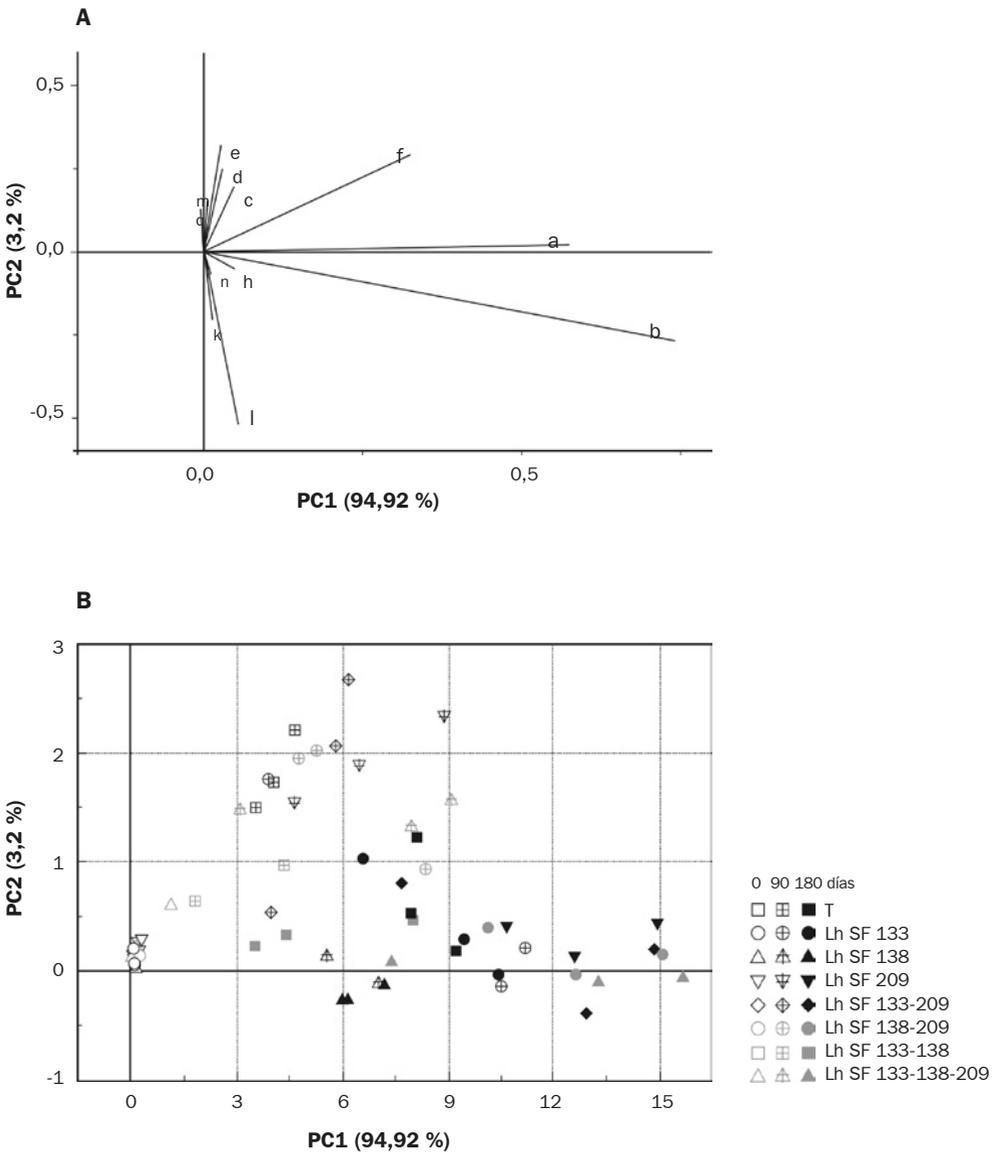
Las letras **a a q** indican los picos seleccionados para el análisis por componentes principales.

Las áreas de los picos seleccionados se utilizaron como variables independientes en un análisis estadístico multivariado. Se seleccionó la metodología de componentes principales, una técnica utilizada para describir un conjunto de datos complejos y determinar si existen estructuras subyacentes en los mismos que expliquen la variabilidad entre una muestra y otra. Los componentes principales (PC) son funciones lineales de las variables originales (áreas de los picos), que se calculan de manera que retengan la mayor parte de la variabilidad del sistema, reduciendo la multidimensionalidad del mismo (Pripp y col., 2000). De esta manera, en la Figura 11 se presentan diagramas de dos dimensiones de PC1 versus PC2, que explican el 94,92 y el 3,20 % de la variabilidad de todos los datos, respectivamente. El primer gráfico indica los “loadings” de las variables, en este caso, la incidencia de cada pico del cromatograma en la ecuación del PC. Se puede observar que los picos llamados **a**, **b**, **f** y **l** son los que inciden mayormente en la variabilidad entre perfiles cromatográficos. La segunda gráfica de la figura muestra los scores de las muestras, es decir el valor calculado de PC1 y PC2 para cada queso. Las muestras se agruparon de acuerdo con el tiempo de maduración, en especial las cuajadas, que formaron un único grupo de puntos cercano al origen. Los quesos de 90 y de 180 días también formaron dos grupos separados, aunque más dispersos y con cierto solapamiento. No fue posible distinguir grupos por cepa o tipo de fermento utilizado, debido a que la variabilidad intragrupo (quesos iguales) e intergrupo (quesos con distintos fermentos) fue similar (Hynes y col., 2003).

Figura 11

Análisis de componentes principales (PC) de los perfiles cromatográficos. **A:** Loadings de las variables independientes (área de los picos **a a q** de los cromatogramas) para PC1 y PC2. **B:** Scores de los quesos de 0, 90 y 180 días para PC1 y PC2 (Hynes y col., 2003)

T: queso elaborado con fermento de suero natural; **SF133, SF138 y SF209:** quesos elaborados con una única cepa de *Lactobacillus helveticus*; **SF 133-138, SF 138-209 y SF 209-133:** quesos con dos cepas; **SF 133-138-209:** quesos con las tres cepas

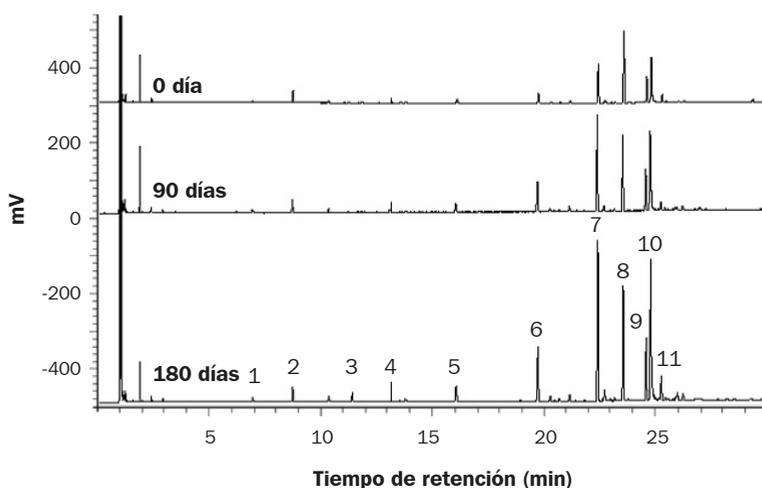


Lipólisis

Este proceso se estudió mediante un análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos libres (AGL), que fueron aislados, derivatizados a ésteres etílicos y estos últimos cuantificados por cromatografía de gases. Se determinó el perfil completo de ácidos grasos desde el ácido caproico ($C_{6:0}$) hasta el ácido linoleico ($C_{18:2}$). En la Figura 12 se presenta como ejemplo un cromatograma típico. El esquema de muestreo fue el mismo que el utilizado para proteólisis.

Figura 12

Perfiles de ácidos grasos libres obtenidos por cromatografía gaseosa de quesos elaborados con una cepa seleccionada de *Lactobacillus helveticus* (Lh SF138), a 0, 90 y 180 días de maduración (Perotti, 2003)



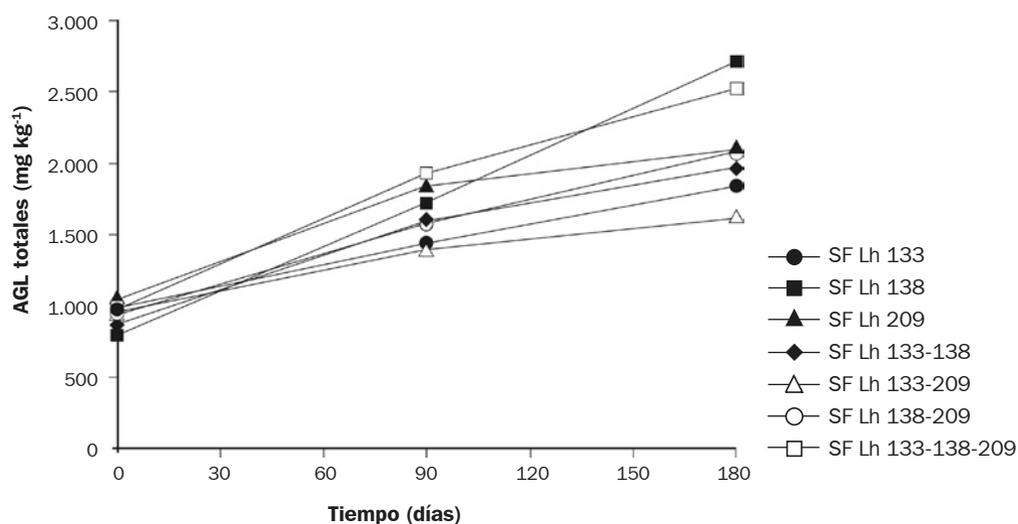
Picos: 1: caproico; 2: enántico (estándar interno); 3: caprílico; 4: cáprico; 5: láurico; 6: mirístico; 7: palmítico; 8: margárico (estándar interno); 9: esteárico; 10: oleico; 11: linoleico

Como puede observarse en la Figura 13, hubo un incremento general en la concentración total de AGL con el tiempo de maduración para todos los quesos experimentales, en particular con relación a los ácidos palmítico ($C_{16:0}$) y oleico ($C_{18:1}$), que fueron los encontrados en mayor concentración (Perotti, 2003). La pendiente positiva que presentan las curvas correspondientes a la evolución de los ácidos grasos libres durante la maduración permitiría concluir de que en estos quesos los ácidos grasos son los principales productos de lipólisis, y que los mismos no se catabolizan originando otros compuestos. Por otra

parte, no se observaron diferencias en el nivel total de AGL entre los distintos quesos experimentales. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de lipólisis entre quesos Reggiano testigo y experimentales. Estos resultados constituyen un avance notable para la implementación a escala industrial de la sustitución del suero fermento natural por cepas seleccionadas, teniendo en cuenta la relevancia que tiene el proceso de hidrólisis de la materia grasa sobre las características sensoriales de los quesos duros.

Figura 13

Ácidos grasos libres totales en quesos Reggiano elaborados con adición de bacterias seleccionadas (Perotti, 2003)

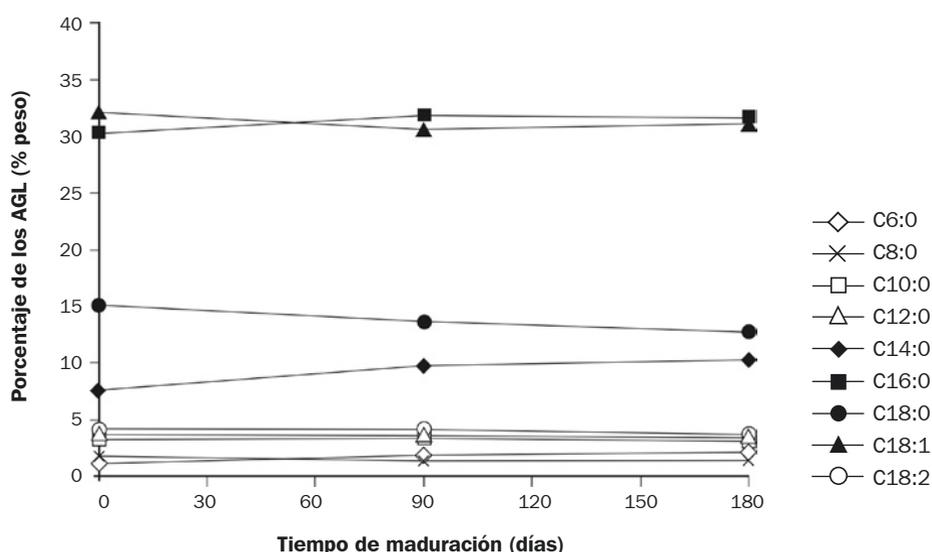


En la Figura 14 se presentan los porcentajes promedio de cada ácido graso libre con respecto al total en función del tiempo de maduración, para quesos testigo y experimentales. Estos porcentajes fueron similares para los distintos fermentos, observándose sólo leves variaciones para los ácidos mirístico, palmítico, esteárico y oleico, lo que sugiere que las lipasas de las tres cepas de *Lactobacillus helveticus* ensayadas y por lo tanto sus combinaciones, hidrolizan la materia grasa de manera similar. También se podría considerar que la lipólisis se produjo de manera no selectiva, es decir sin preferencia por la liberación de uno o más ácidos grasos en particular, ya que los porcentajes relativos de

los mismos fueron semejantes a los encontrados para la grasa de leche (Páez, 2002). Por otro lado, esta falta de selectividad sería constante en el tiempo, ya que como se observa en la figura, las líneas correspondientes a la mayoría de los AGL presentan una pendiente casi nula.

Figura 14

Porcentajes promedio de cada ácido graso libre en función del tiempo de maduración, para los quesos testigo y experimentales (Perotti, 2003)



Los valores de concentraciones de AGL obtenidos para los distintos quesos se utilizaron como variables en un análisis estadístico multivariante. Así, se realizó un análisis por componentes principales (PCA), de manera de estudiar objetivamente la distribución de AGL en función del fermento empleado y del tiempo de maduración e identificar aquellos que caracterizan mejor la lipólisis.

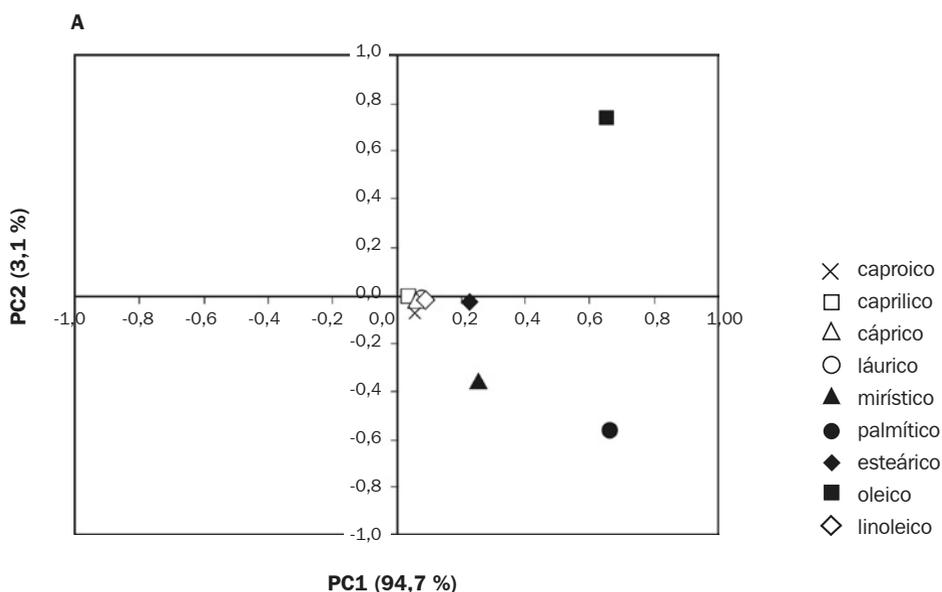
En la Figura 15 se presentan diagramas bidimensionales para los dos primeros componentes principales, que explicaron el 97,8 % de la variabilidad total. En el primer gráfico se observan los “loadings” correspondientes a los distintos ácidos grasos libres, donde puede observarse que los más importantes durante la maduración fueron los ácidos palmítico y oleico y, en menor medida, los ácidos mirístico y esteárico. El signo positivo observado para todos los AGL para PC1 significa que las concentraciones de los mismos se incrementaron

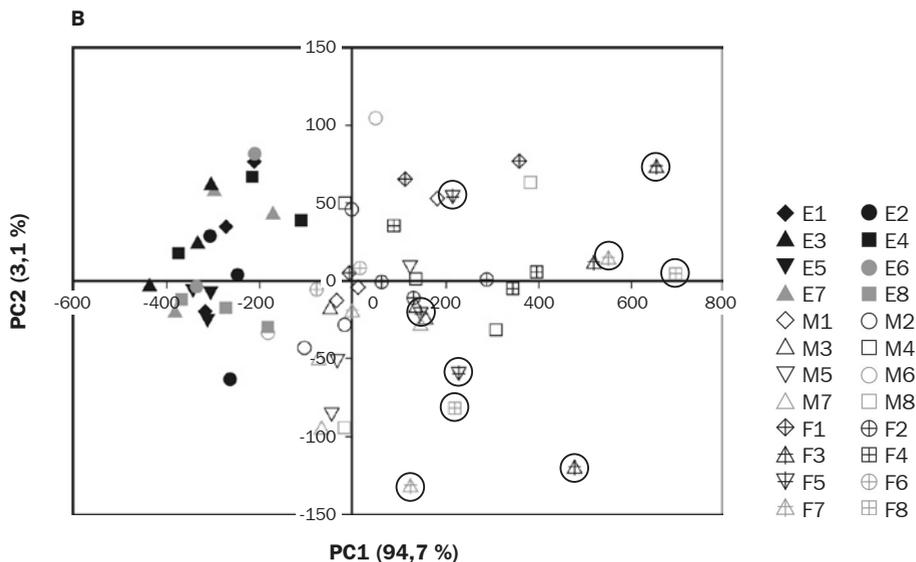
en los quesos durante la maduración. Los diferentes signos observados para las variables para PC2 están probablemente asociados con una acción lipolítica diferente entre las distintas cepas utilizadas. El ácido mirístico en particular mostró una evolución diferente entre quesos con distintos fermentos iniciadores (datos no incluidos). En el segundo gráfico se presentan los scores de las muestras, donde puede observarse una tendencia de agrupación de las mismas según el tiempo de maduración a lo largo del eje del PC1. Asimismo, se observó que los quesos de 180 días de maduración producidos con la cepa Lh 138, sola o en diferentes asociaciones con otras cepas (F3, F5, F7 y F8, marcados con un círculo en la Figura 15-B), tuvieron los scores más altos de PC1 y PC2, lo que podría indicar una mayor actividad lipolítica de esta cepa con respecto a las otras.

Figura 15

Análisis por componentes principales (PC) de los ácidos grasos libres (AGL). **A:** Loading de los AGL para PC1 y PC2. **B:** Scores de los quesos de 0, 90 y 180 días de maduración para PC1 y PC2 (Perotti, 2003)

E1-E8: cuajadas; **M1-M8:** quesos a los 90 días de maduración (mitad de maduración); **F1-F8:** quesos a los 180 días de maduración (final de maduración). Los números del 1 al 8 indican los quesos producidos con fermento de suero natural y diferentes combinaciones de cepas seleccionadas de *Lactobacillus helveticus*. Los círculos indican las muestras que contienen la cepa Lh 138





Se realizó un análisis discriminante lineal utilizando como variables predictoras los scores para PC1 y PC2 y como factores de clasificación el tiempo de maduración y el tipo de fermento utilizado. Se encontró una función discriminante significativa ($p < 0,05$) con respecto al factor tiempo, la cual permitió la correcta clasificación de las muestras en tres grupos predefinidos (0, 90 y 180 días de maduración). Con relación al factor tipo de fermento utilizado, no se encontró una función discriminante significativa que haga una distinción entre los 8 niveles predefinidos (fermento de suero natural y fermentos con cepas seleccionadas de *Lactobacillus helveticus*).

Conclusiones

Basándose en el estudio precedente, puede concluirse que la sustitución del fermento de suero natural por bacterias autóctonas seleccionadas y cultivadas en suero es una alternativa válida para la elaboración del queso Reggiano Argentino, ya que no produce modificaciones en la tecnología ni altera los niveles de proteólisis primaria y lipólisis durante la maduración. Con relación a la proteólisis secundaria, ésta resulta más intensa en los quesos elaborados con la cepa SF209. Sin embargo, esto no ha generado ningún defecto en los quesos obtenidos y puede ser, por el contrario, una opción interesante para obtener productos con mejor textura, y aroma y sabor potencialmente más intensos.

Referencias bibliográficas

- ANAOF (Association Nationale des Appellations d'Origine Françaises) (1993).** Appellation D' Origine Contrôlée. INAO, París.
- Ardö, Y. (1999).** Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. En: Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation (Part 2). International Dairy Federation, Bulletin N° 337, pp. 4-9.
- Bosi, F.; Vescovo, M.; Bottazzi, V.; Scolari, G.; Battistotti, B. y Brambilla, E. (1991).** Batteri lattici per la produzione di formaggio grana. Il Integrazione di siero-fermento naturale con colture pure di bacilli lattici termofilli. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 42, pp. 171-179.
- Bottazzi, V.; Parisi, M.; y Cocconcelli, P. (1999).** Colture di batteri lattici per la produzione di formaggio grana e tipizzazione molecolari dei ceppi. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 50, pp. 179-194.
- Bottazzi, V.; Scolari, G.; Cappa, F.; Battistotti, B.; Bosi, F. y Brambilla, E. (1992).** Batteri lattici per la produzione di formaggio Grana. III. Velocità di acidificazione e comparsa di gonfiore. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 43, pp. 71-93.
- Candiotti M.; Hynes, E.; Quiberoni, A.; Palma, S.; Sabbag, N. y Zalazar, C. (2002).** Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *International Dairy Journal*, vol. 12, pp. 923-931.
- Carles, C. y Ribadeau Dumas, B. (1985).** Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine α_{s1} casein. Comparison of the behaviour of this substrate with that of β and κ casein. *FEBS Letters*, vol. 185, pp. 282-286.
- Castañeda, R. (1999).** Caracterización de quesos argentinos de pasta dura y semidura. *Industria Lactera*, vol. 79 (717), pp. 31-34.
- Chianese, L.; Laezza, P.; Ferranti, P.; Caira, S.; Addeo, F. y Malorni, A. (1996).** Oligopeptides in cheese whey. International Dairy Federation, Bulletin 317, p. 20 (Abstr.).
- Choisi, C.; Desmazeaud, M.; Gripon, J.; Lamberet, G. y Lenoir, J. (1997).** La biochimie de l'affinage. En: Eck, A. y Gillis, J.(eds.), *Le Fromage*. Lavoisier, París, pp. 86-153.
- Crow, V.; Coolbear, T.; Holland, R.; Pritchard, G. y Martley, F. (1993).** Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *International Dairy Journal*, vol. 3, pp. 423-460.
- de Jong, L. (1978).** The influence of the moisture content on the consistency and protein breakdown of cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal*, vol. 32, pp. 1-14.
- Delacroix-Buchet, A. y Fournier, S. (1992).** Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication. *Le Lait*, vol. 72, pp. 53-72.
- Fox, P. y McSweeney, P. (1996).** Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International*, vol. 12, pp. 457-509.
- Fox, P. y McSweeney, P. (1998).** *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic y Professional, London.
- Fox, P.; Law, J.; McSweeney, P. y Wallace, J. (1993).** Biochemistry of cheese ripening. En: Fox, P. (ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1, General aspects. Chapman y Hall, London, pp. 389-438.
- Gagnaire, V.; Mollé, D.; Herrouin, M. y Léonil, J. (2001).** Peptides identified during Emmental cheese

- ripening: origin and proteolytic systems Involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, pp. 4.402-4.413.
- Gaiaschi, A.; Beretta, B.; Polesi, C.; Conti, A.; Giuffrida, M.; Galli, C. y Restani, P. (2000).** Proteolysis of α s-casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 83, pp. 2.733-2.739.
- Gallino, R. (1994).** Queso Reggiano Argentino: tecnología de fabricación. En: Ciencia y tecnología de los productos lácteos. Medios Audiovisuales y Gráficos CERIDE, Santa Fe, pp. 244-287.
- Giraffa, G.; Mucchetti, G.; Addeo, F. y Neviani, E. (1997).** Evolution of lactic acid microflora during Grana cheese-making and ripening. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 15, pp. 115-122.
- Guinee, T. y Wilkinson, M. (1992).** Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, vol. 45, pp. 94-104.
- Hurley, M.; Larsen, L.; Kelly, A. y McSweeney, P. (2000a).** Cathepsin D activity in quarg. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 453-458.
- Hurley, M.; Larsen, L.; Kelly, A. y McSweeney, P. (2000b).** The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 673-681.
- Hynes, E.; Aparo, L. y Candiotti, M. (2004).** Influence of residual milk-clotting enzyme on α s₁ casein hydrolysis during ripening of Reggiano Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 87, pp. 565-573.
- Hynes, E.; Bergamini, C.; Suárez, V.; Zalazar, C. (2003).** Proteolysis on Reggiano argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 3.831-3.840.
- Hynes, E.; Meinardi, C.; Sabbag, N.; Cattaneo, T.; Candiotti, M. y Zalazar, C. (2001).** Influence of milk-clotting enzyme concentration on the α s₁ casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp. 1.335-1.340.
- Kindstedt, P.; Yun, J.; Barbano, D. y Larose, K. (1995).** Mozzarella cheese: impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis, and functional properties. *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 2.591-2.592.
- Larsen, L.; Wium, H.; Benfeldt, C.; Heegaard, C.; Ardö, Y.; Qviste, K. y Petersen, T. (2000).** Bovine milk procathepsin D: presence and activity en heated milk and in extracts of rennet-free UK-feta cheese. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 67-73.
- Lehninger, A. (1995).** *Bioquímica*. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, Barcelona.
- Mahaut, M.; Jeantet, R. y Brulé, G. (2000).** *Initiation à la technologie fromagère*. Editions Technique et Documentation, París, pp. 155-180.
- Marziali, A. y Ng-Kwai-Hang, F. (1986).** Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science*, vol. 69, pp. 1.793-1.799.
- McSweeney, P. y Sousa, M. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, vol. 80, pp. 293-324.
- McSweeney, P.; Olson, N.; Fox, P.; Healy, A. y Hojrup, P. (1993).** Proteolytic specificity of chymosin on bovine α s₁-casein. *Journal of Dairy Research*, vol. 60, pp. 401-412.
- Meinardi, C.; Alonso, A.; Hynes, E. y Zalazar, C. (2002).** Influence of milk-clotting enzyme on acidification rate of natural whey starter culture. *International Journal of Dairy Technology*, vol. 55, pp. 139-144.
- Ministero Agricoltura e Foreste (1992).** *L'Italia dei Formaggi DOC*. Franco Angeli, Milano.
- Mucchetti, G. (1997).** Tecnología de producción de quesos duros en Italia. *Industria Lechera*, vol. 78 (707), pp. 51-73.
- Mucchetti, G.; Addeo, F. y Neviani, E. (1998).** Evoluzione storica della produzione di formaggi a denominazione di origine protetta (DOP). I. Pratiche di produzione, utilizzo e composizione dei sieroinnesti nella caseificazione a formaggio Grano Padano e Parmigiano Reggiano: considerazioni sulle relazioni tra sieroinnesti e DOP. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 49, pp. 281-311.
- Noomen, A. (1978).** Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). 2. Activity

- of calf rennet. *Netherlands Milk Dairy Journal*, vol. 32, pp. 49-68.
- O'Keefe, A.; Fox, P. y Daly, C. (1978).** Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. *Journal of Dairy Research*, vol. 45, pp. 465-477.
- Páez, R. (2002).** Efecto de condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad oxidativa de leche entera en polvo. Tesis de Magister en Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Paleari, M.; Soncini, G.; Beretta, G. y Aldrighi, M. (1996).** Autochthonous lactic acid bacteria used as starter cultures in making of a typical cheese. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 14, pp. 357-362.
- Perotti, M. (2003).** Influencia del reemplazo de suero fermento natural por cepas seleccionadas, sobre el proceso de lipólisis de quesos duros típicos argentinos. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Pripp, A.; Stepaniak, L. y Sørhaug, T. (2000).** Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 249-253.
- Quiberoni, A.; Candiotti, M.; Meinardi, C.; Palma, S. y Reinheimer, J. (1997).** Selección y utilización de mutantes espontáneos fagorresistentes de *Lactobacillus helveticus* en quesería. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 15, pp. 13-34.
- Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Quénee, P.; Suárez, V. y Reinheimer J. (1998).** Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 85, pp. 591-596.
- Rampilli, M.; Raja, V. y Gatti, A. (1998).** Valutazione dell'attività residua del caglio nel formaggio. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, vol. 49, pp. 29-41.
- Reinheimer, J. (1994).** Las bacterias lácticas. En: Ciencia y tecnología de los productos lácteos. Medios audiovisuales y gráficos CERIDE, Santa Fe, pp. 64-113.
- Reinheimer, J.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. y Suárez, V. (1996).** The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina on hard cheese production. *International Dairy Journal*, vol. 6, pp. 869-879.
- Reinheimer, J.; Suárez, V.; Bailo, N. y Zalazar, C. (1995).** Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection*, vol. 58, pp. 796-799.
- Robinson, R. (1995).** *A colour guide to cheese and fermented milks*. Chapman y Hall, London.
- Sousa, M.; Ardö, Y. y McSweeney, P. (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 327-345.
- Torriani, S.; Vescovo, M. y Scolari, G. (1994).** An overview on *Lactobacillus helveticus*. *Annals of Microbiology and Enzymology*, vol. 44, pp. 63-191.
- Visser, S. (1993).** Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, vol. 76, pp. 329-350.
- Visser, F. y de Groot-Mostert, A. (1977).** Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Netherlands Milk Dairy Journal*, vol. 31, pp. 247-264.
- Walsh, M. y Xiaoshan Li. (2000).** Thermal stability of acid proteinases. *Journal of Dairy Research*, vol. 67, pp. 637-640.
- Zalazar, C.A. (1998).** La producción y la industria láctea argentina. Evolución, estado actual, perspectivas. *Revista Argentina de Lactología*, vol. 16, pp. 27-75.
- Zalazar, C.; Meinardi, C. y Basualdo, S. (1995).** Comparison of chymosin produced by genetically modified microorganisms with other milk clotting agents using Formagraph. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 13, pp. 183-189.
- Zalazar, C.; Meinardi, C.; Candiotti, C.; Suárez, V. y Sabbag, N. (1999a).** Elaboración de quesos duros argentinos empleando bacterias lácticas seleccionadas desarrolladas en suero. *Industria Lechera*, vol. 79 (717), pp. 12-18.
- Zalazar, C.; Meinardi, C. y Hynes, E. (1999b).** Quesos típicos argentinos. *Una revisión general sobre producción y características*. Centro de Publicaciones de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

Zalazar, C.; Meinardi, C.; Hynes, E. y Bernal, S. (1997). Performance of fermentation produced chymosin and other milk-clotting enzymes in the elaboration of Cremoso Argentino cheese. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, vol. 15, pp. 333-338.

Zamboni, E. (1994). Fermentos lácticos seleccionados: su empleo en la producción. En: Ciencia y tecnología de los productos lácteos. Medios Audiovisuales y Gráficos CERIDE, Santa Fe, pp. 131-156.

Índice

- 5 — **Sección 1. Nuevos sistemas para el saneamiento de leche destinada a quesería**
- 7 — **Capítulo 1.** Microfiltración
- 15 — **Capítulo 2.** Carbonatación
- 23 — **Capítulo 3.** Reducción de la contaminación por clostridios gasógenos

- 45 — **Sección 2. Quesos probióticos**
- 47 — **Capítulo 1.** Bacterias probióticas utilizadas
- 49 — **Capítulo 2.** Métodos moleculares para la identificación de cepas y estudio de la diversidad genética bacteriana
- 59 — **Capítulo 3.** Caracterización tecnológica, biológica y probiótica de cepas
- 73 — **Capítulo 4.** Medios de cultivo y métodos moleculares para la enumeración y control de bacterias probióticas en la elaboración y maduración de quesos
- 81 — **Capítulo 5.** Quesos probióticos. Antecedentes y viabilidad bacteriana
- 89 — **Capítulo 6.** Influencia de los cultivos probióticos en la maduración y características sensoriales

- 99 — **Sección 3. Infecciones fágicas**
- 101 — **Capítulo 1.** Tratamientos térmicos y químicos para la inactivación de fagos
- 117 — **Capítulo 2.** Metodologías para la detección de fagos en plantas industriales
- 127 — **Capítulo 3.** Métodos microbiológicos y moleculares para el estudio de la diversidad fágica en plantas industriales

- 147 — **Sección 4. Quesos reducidos en materia grasa**
- 149 — **Capítulo 1.** Problemas asociados con la producción
- 153 — **Capítulo 2.** Alternativas tecnológicas de producción
- 165 — **Capítulo 3.** Resultados obtenidos en quesos argentinos
-
- 175 — **Sección 5. Recientes desarrollos en maduración de quesos**
- 177 — **Capítulo 1.** Maduración de quesos y su control
- 245 — **Capítulo 2.** Rol de las NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) en la maduración de quesos
- 267 — **Capítulo 3.** Maduración acelerada
- 285 — **Capítulo 4.** Defectos producidos durante la maduración
-
- 299 — **Sección 6. Avances en el conocimiento de la maduración de los quesos duros argentinos**
- 301 — **Capítulo 1.** Avances en el conocimiento de la maduración de los quesos duros argentinos

La presente obra intenta brindar una actualización científica y técnica en diversos temas vinculados a la transformación industrial de la leche en quesos. Teniendo en cuenta la importancia regional y nacional que posee este tipo de procesos, el contenido de la obra representa un aporte al conocimiento y optimización de los mismos.

Resulta importante destacar que los editores y autores del libro pertenecen al Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) de la Facultad de Ingeniería Química (UNL), el centro de investigación de mayor trayectoria y experiencia en el país en cuanto a la calidad y transformación industrial de la leche, que desde 1976 lleva a cabo estudios relativos a esta temática con una fuerte vinculación con la industria láctea nacional. El libro está dirigido a profesionales de la industria láctea y a investigadores y docentes que desarrollan actividades relacionadas con esta temática así como a estudiantes que necesiten documentarse sobre los últimos avances de la industria quesera.