

# MADURACIÓN ACELERADA DE QUESO CON BACTERIAS LÁCTICAS ATENUADAS TÉRMICAMENTE

## Acceleration of Cheese Ripening With Heat-Shocked Lactic Starter Bacteria

María Dolores Sánchez-Ponte

Departamento de Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Sector Campo de Oro. Mérida, Venezuela. Telf. (0274) 2403474. Fax (0274) 2403475. E-mail: dolores@ula.ve

### RESUMEN

En el presente trabajo se investiga un método para acelerar la maduración del queso Dambo, un queso semiduro elaborado con leche pasteurizada y madurado durante noventa días, adicionando además del cultivo iniciador normal, un cultivo de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, cuya capacidad de producir ácido láctico ha sido reducida marcadamente por la aplicación de calor controlado para mantener activos los sistemas enzimáticos que intervienen en la maduración. Suspensiones de bacterias fueron inoculadas en leche descremada esterilizada y cultivadas a 40°C y pH constante. El tratamiento térmico consistió en calentar las suspensiones de bacterias hasta 63, 67 y 70°C, en un baño de agua hirviendo, enfriando rápidamente. La proteólisis en el queso se siguió durante el período de maduración, utilizando como índices, el nitrógeno soluble a pH 4,6, el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (12%) y el nitrógeno soluble en ácido fosfotungstíco (1%), determinados por el método Kjeldahl. Se observó un aumento de la proteólisis en comparación con el control. Los quesos experimentales en los cuales se utilizaron cultivos calentados a 70°C presentaron, después de un período de almacenamiento de 70 días, una maduración equivalente a 90 días en los controles, evidenciando una disminución en el tiempo de maduración de 22%. No se observó efecto adverso en la composición ni en el pH de los quesos. El análisis sensorial no reveló defectos en el sabor, en especial sabor amargo.

**Palabras clave:** Queso, maduración acelerada, proteólisis, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

### ABSTRACT

This paper investigates a method for acceleration of ripening in Dambo cheese, a semihard cheese with a normal maturation period of three months. In addition to the normal starter an

attenuated culture of *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* whose lactic acid producing activity had been greatly reduced by previous sub-lethal heat treatment, was added to the cheese milk. The bacterial cell suspensions cultivated at constant pH were heated to 63, 67 and 70°C, respectively. Proteolysis in the cheese was measured as the increase in pH 4.6-soluble N, 12% trichloroacetic acid-soluble N and 1% phosphotungstic acid soluble N. The proteolysis increased in all groups during ripening. Cheeses with extra inoculum heated to 70°C showed a decreased in ripening time of 22%. No adverse effect of the extra starter bacteria on the cheese composition and pH was observed. The organoleptic results did not show defects in flavour. Bitterness could not be detected in any cheese sample.

**Key words:** Cheese, accelerated ripening, proteolysis, *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*.

### INTRODUCCIÓN

La maduración del queso es un proceso mediante el cual la cuajada fresca se transforma en una masa homogénea con sabor, aroma y textura característicos. Ello se logra durante la maduración, mediante una serie de cambios secuenciales, causados por las proteinasas de la leche, las enzimas coagulantes, los cultivos iniciadores y otros microorganismos que se desarrollan en el queso.

A los fines de disminuir los costos de operación y almacenamiento durante el período de maduración, largo para algunos quesos, se ha prestado especial atención al desarrollo de tecnologías para acelerar este proceso en algunas variedades de queso. Entre los métodos investigados para acortar el período de maduración se incluyen: aumento de la temperatura de almacenamiento, adición de enzimas exógenas, adición de cultivos iniciadores atenuados y varias combinaciones de estos métodos.

La mayor proporción de trabajos relacionados con maduración acelerada se refieren a la adición de enzimas (proteinasas, peptidasas y lipasas, bien solas o en mezclas) durante la manufactura del queso. Las enzimas añadidas pueden ser de fuentes no relacionadas con el queso, o provenientes de microorganismos del queso [8]. Se ha observado, en general, que la adición de proteasas para la fabricación de queso ocasiona, lógicamente, un incremento de la proteólisis pero con resultados contradictorios. El defecto más común reportado es la aparición de sabor amargo por la liberación de péptidos [10, 15, 19]. A pesar de presentarse como un método potencial para mejorar la calidad y acelerar la maduración, todavía es un reto la selección de los tipos de enzimas y la adición de las cantidades óptimas para obtener un sabor adecuado. La adición de enzimas también tiene un efecto adverso en el cuerpo y la textura del queso, ya que al intensificar la hidrólisis de las caseínas se induce generalmente un ablandamiento de la textura. La adición de lipasas ha recibido considerable atención y se han observado buenos resultados en aquellos quesos cuyo sabor está influenciado por el contenido de ácidos grasos libres de cadena corta, como son el queso Cheddar, el Manchego y los quesos azules tipo Roquefort [1, 10, 21, 22].

Una de las técnicas que ha producido mejores resultados ha sido la de aumentar el número de bacterias lácticas, mediante la adición complementaria de cultivos iniciadores. Las bacterias ácido lácticas contienen un amplio rango de proteinasas y peptidasas y pueden ser, por lo tanto, aditivos para aumentar la proteólisis, considerado el mecanismo más importante en muchas variedades de queso durante la maduración [8]. Sin embargo, su adición directa a la leche afecta el proceso de manufactura y generalmente produce un sabor atípico por la producción excesiva de ácido láctico. Para eliminar este inconveniente y mantener la calidad del queso, las células se atenúan mediante tratamiento térmico subletal o congelación, a fin de retardar la producción de ácido sin reducir excesivamente su sistema enzimático proteolítico. Esto se ha obtenido mediante métodos físicos tales como el choque térmico [2, 5, 9, 11, 13, 14, 20, 25], la congelación, la liofilización y el secado por aspersión [3, 11, 13, 14].

La formación de péptidos y aminoácidos durante la maduración del queso contribuye directamente al desarrollo del sabor y textura del queso. Algunos autores [3, 7] han observado una correlación entre la extensión de la proteólisis y la intensidad del sabor del queso. Sin embargo los quesos sometidos a una proteólisis acelerada frecuentemente exhiben sabores extraños desagradables. En consecuencia, los análisis de proteólisis deben estar acompañados de una evaluación sensorial para evaluar la calidad del queso.

En un estudio comparativo de varios métodos de aceleración de la maduración, Vafapoulou y col. [25] emplearon en la elaboración del queso Feta, un queso suave conservado en

salmuera, mezclas de lipasas, proteinasas neutras o ácidas y microorganismos (*Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*) sometidos a choques térmicos. El estudio reveló que los intentos de acelerar la proteólisis mediante la adición de proteinasas tienen una utilidad limitada, ya que incrementos en el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético superiores a un 35% conducían a la aparición de sabores amargos que se intensificaban cuando se empleaban proteinasas ácidas con respecto a proteinasas neutras. Obtuvieron en cambio, una disminución en el tiempo de maduración hasta de 50%. De acuerdo a la evaluación sensorial, los microorganismos calentados contribuyeron más al gusto típico de estos quesos, lo que correspondía con mayores niveles de acetaldehído y aminoácidos libres.

Petterson y Sjöstrom [20] en un trabajo con un cultivo mixto mesófilo y bacterias iniciadoras termófilas atenuadas por el calor para acelerar la maduración de queso suizo semiduro, obtuvieron una reducción del tiempo de maduración de 30 días. La proteólisis aumentó con el número de bacterias añadidas.

Ardö y Pettersson [2], estudiaron la adición a la leche de enzimas comerciales (Neutrassa) del *Bacillus subtilis* y/o células tratadas térmicamente del *Lactobacillus helveticus* en la maduración del queso Suizo. La maduración del queso fue acelerada. El sabor amargo desarrollado con la adición de Neutrassa pudo ser eliminado con la adición simultánea de lactobacilos tratados por calor, al acelerarse el desdoblamiento de los péptidos e incrementándose la cantidad de nitrógeno amino.

Johnson y Etzel [13] y Johnson y col. [14] utilizaron varios métodos de atenuación de *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 con el objetivo de producir y distribuir a bajo costo células para acelerar la maduración del queso. Los métodos utilizados fueron: secado por aspersión con temperaturas del aire a la salida de 82 y 120°C, liofilización y congelación. Los resultados fueron más favorables en los microorganismos tratados con secado por aspersión a 120°C, tanto en los estudios de atenuación como en los ensayos de maduración acelerada de queso Cheddar de bajo contenido en grasa. Se presentaron menores defectos en el sabor en comparación con la liofilización y la congelación.

El queso tipo Dambo es un queso semiduro de procedencia danesa que se elabora con leche de vaca entera o parcialmente descremada en la Planta de Lácteos Santa Rosa de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. El tiempo necesario para su maduración es de tres meses. No hay información disponible acerca de la posibilidad de acelerar su maduración.

Entre los diversos microorganismos iniciadores, los cultivos de *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, atenuados mediante choque térmico han demostrado afectar el nitrógeno soluble, aceptado generalmente como una medida de la maduración del queso, con resultados satisfactorios en estudios anteriores de maduración.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la adición de un cultivo de *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, atenuado mediante choque térmico a diferentes temperaturas en la proteólisis del queso tipo Dambo y observar los efectos en las características más importantes, entre ellas el sabor, para determinar las posibles aplicaciones prácticas de la maduración acelerada en la manufactura de este tipo de queso. Las propiedades de las células atenuadas se han descrito previamente [23]. En este trabajo se describen los cambios químicos y sensoriales que suceden en el queso elaborado con y sin bacterias atenuadas térmicamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

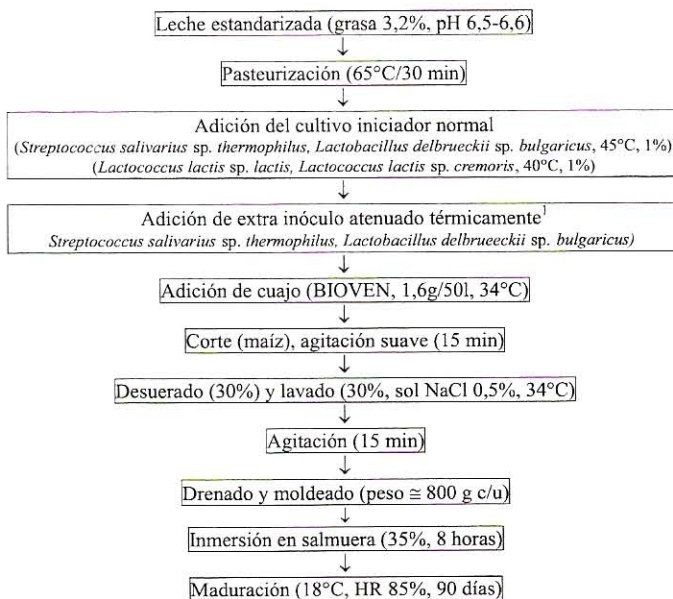
### 1. Preparación de los cultivos

Un cultivo mixto termófilo de *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* (No. 914410, obtenido de Bionic Biotechnologisches Laboratorium, Suiza) sembrado en leche descremada en polvo reconstituida (10% p/v), esterilizada (120°C/10 min), se almacenó a -30°C en envases de 25 ml en un congelador de lotes. Este cultivo previo a su utilización en los ensayos de maduración acelerada se repicó tres veces (2% v/v) en leche en polvo descremada reconstituida (10%) estéril, incubándose en estufa a 40°C por 15 horas. A los fines de obtener una elevada carga bacteriana, el cultivo se sembró al 2% v/v en leche en polvo descremada reconstituida estéril (10% p/v) y se incubó a 40°C durante 10 horas, manteniendo el pH constante entre 6,1 y 6,3 mediante neutralización con NH<sub>4</sub>OH, 20% (v/v), adicionado a intervalos de treinta minutos. Al final de este período el crecimiento se detuvo por enfriamiento hasta 5°C. Se realizó un conteo microbiano de células vivas en placa con medio Briggs [12], antes y después del crecimiento.

Las suspensiones de bacterias obtenidas del cultivo a pH constante, se sometieron a tres tratamientos térmicos con el propósito de atenuar su producción de ácido láctico, calentando hasta 63, 67 y 70°C respectivamente, en un baño de agua hirviendo con agitación continua, y enfriando inmediatamente hasta 32°C, sumergiéndolas en un baño de agua con hielo. El tiempo de calentamiento hasta la temperatura de tratamiento fue de 3,5-5,0 min. y el de enfriamiento de 2,5-4,0 min. Se realizó un conteo microbiano de células vivas en placa con medio Briggs [12], después del tratamiento térmico, por duplicado. Las suspensiones de bacterias tratadas térmicamente se almacenaron a 5°C hasta su utilización en la preparación de quesos al día siguiente.

### 2. Manufactura del queso tipo Dambo

Se realizó de acuerdo al proceso indicado en el siguiente flujograma:



<sup>1</sup>La adición del extrainóculo se realizó 30 minutos antes de la adición del cuajo.

Se elaboraron cuatro lotes de queso con la misma leche.

Lote A: Ningún tratamiento. No adición de extrainóculo (control).

Lote B: Adición de extrainóculo calentado a 63°C (2,0% v/v).

Lote C: Adición de extrainóculo calentado a 67°C (2,0% v/v).

Lote D: Adición de extrainóculo calentado a 70°C (2,0% v/v).

De cada tratamiento, se tomaron muestras para análisis a los 1, 30, 60 y 90 días de maduración. Se hizo una repetición de cada ensayo. Los resultados reportados son la media de los dos experimentos de cada lote. Todos los datos se sometieron a un análisis de la varianza utilizando el programa Statgraphics Plus para estudiar si existen diferencias significativas entre los diferentes niveles de temperatura de calentamiento del extrainóculo.

### 3. Análisis químico

La TABLA I muestra los métodos analíticos utilizados.

### 4. Evaluación sensorial

La intensidad del sabor, grado de gusto y el sabor amargo fueron evaluados después de 45 y 75 días de maduración por 10 panelistas semientrenados. La puntuación para la inten-

**TABLA I**  
**MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS<sup>1</sup>**

Parámetro	Método	Referencia
Grasa	Babcock	[16]
Humedad	Desecación estufa a 100°C	[16]
Proteína total	Kjeldahl	[16]
Cloruro de sodio	Titulador Corning 920	[16]
pH	pHmetro	[16]
<i>Proteolisis</i>		
Nitrógeno total	Dis. Na citrato 9,5M. Kjeldahl	[4,24]
NS <sup>2</sup>	Precip. ac. acético 50 :50. Kjeldahl	[4,24]
NTCA <sup>3</sup>	Precip. TCA 12%. Kjeldahl	[24]
NPTA <sup>4</sup>	Precipit. PTA 1%. Kjeldahl	[24]

<sup>1</sup> Se realizaron duplicados de dos experimentos. <sup>2</sup> Nitrógeno soluble a pH 4,6. <sup>3</sup> Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético. <sup>4</sup> Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico.

idad del sabor y grado de gusto se señaló en líneas verticales con una escala de 0 a 10 puntos que incluían las siguientes categorías: intensidad del sabor (0 = muy suave, 5 = moderado, 10 = muy fuerte); grado de gusto (0 = me desagrada muchísimo, 5 = me es indiferente, 10 = me gusta muchísimo). El sabor amargo se evaluó con la siguiente escala: 1 = no se observa, 2 = ligeramente amargo, 3 = muy amargo. Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza y se comparó la puntuación obtenida a los 45 y 75 días mediante un análisis de diferencia de medias (prueba T). A tales efectos se utilizó el programa Statgraphics Plus.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Composición del queso y pH

La composición y el pH del queso Dambo madurado durante tres meses se presentan en la TABLA II. La humedad, el contenido de sal, la grasa y la proteína total, reportaron valores entre los siguientes rangos, respectivamente: 30,9-34,0%, 1,5-1,9%, 32,5-34,0% y 21,8-24,6%. El pH a los tres meses varió entre 5,8 y 5,9. Se observaron diferencias significativas (P<0,05) entre los tratamientos en el contenido de cloruros y en el pH.

Al analizar la variación del pH durante el período de maduración para el control y los diferentes tratamientos, se observó que el pH se mantuvo prácticamente constante en el control y en los lotes experimentales, a las 24 horas de elaboración. Al final del período de maduración, los valores obtenidos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (P>0,5) para los diferentes tratamientos térmicos. Se puede decir que la adición de microorganismos atenuados no parece haber afectado el proceso de elaboración, en lo que respecta al pH.

**TABLA II**  
**COMPOSICIÓN Y PH DEL QUESO DAMBO MADURADO CON ADICIÓN DE *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* Y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* ATENUADOS MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO<sup>1</sup>**

Parámetro	Control A	63°C A	67°C C	70°C D
Humedad, %	34,0 <sup>ab</sup>	32,2 <sup>ab</sup>	31,1 <sup>b</sup>	30,9 <sup>b</sup>
Cloruros, %	1,9 <sup>ab</sup>	1,7 <sup>8ab</sup>	1,7 <sup>b</sup>	1,5 <sup>c</sup>
Grasa, %	34,0 <sup>a</sup>	34,0 <sup>a</sup>	33,3 <sup>a</sup>	32,5 <sup>a</sup>
Proteína, %	23,1 <sup>ab</sup>	23,5 <sup>ab</sup>	24,6 <sup>a</sup>	21,8 <sup>b</sup>
pH	5,9 <sup>ab</sup>	5,8 <sup>c</sup>	5,8 <sup>cb</sup>	5,9 <sup>cb</sup>

<sup>1</sup>Valores medios calculados del análisis duplicado de dos experimentos. <sup>abc</sup>Las medias en la misma fila con superíndice igual no son diferentes (P>0,05).

### 2. Proteolisis

La TABLA III y las FIGS. 1, 2 y 3, muestran la extensión de la proteolisis en los diferentes lotes experimentales B, C y D y en el control A, durante el período de maduración de 90 días. Los lotes con adición de microorganismos atenuados térmicamente exhibieron mayores valores que el control, con diferencias significativas (P<0,05) entre algunos tratamientos, en los índices de proteolisis estudiados, como son, nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS), nitrógeno soluble en ácido tricloroacético 12% (NTCA) y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 1% (NPTA), indicando un desdoblamiento más rápido de la caseína. La proteolisis fue mayor en el grupo D (70°C), siendo la diferencia con el control y con el resto de los tratamientos estadísticamente significativa (P<0,05), durante el último mes de maduración.

Según se demuestra en la FIG. 1, la fracción NS aumentó significativamente (P<0,05), en una proporción desde 9,6 a 25,2% en el control (A) y desde 9,7 a 30,4% en los lotes experimentales. Los niveles de NS en los grupos se incrementaron en el orden A, B, C y D. A los 90 días de maduración, los valores de NS fueron 25,2% en el control y 30,4% en el grupo D.

La fracción NTCA (FIG. 2) también mostró un aumento considerable durante el almacenamiento (P<0,05). El NTCA en el lote control aumentó desde 7,5% hasta 22,7% y fue significativamente menor que en los lotes experimentales con valores desde 9,0% hasta 27,6%. Los valores aumentaron en los grupos en el orden A, B, C y D. A los 90 días de maduración los valores fluctuaron entre 22,7% en el control (A) y 27,6% en el lote D.

La fracción NPTA (FIG. 3) aumentó significativamente en todos los grupos (P<0,01), desde 7,3 a 23,4% en el control y desde 9,5 a 28,6% en los otros grupos. Al igual que en las fracciones NS y NTCA, el incremento fue en el orden A, B, C y D. A los 90 días de maduración, los valores de NPTA variaron entre 23,4% en el control y 28,6% en el lote D.

TABLA III

VALORES MEDIOS DE NITRÓGENO SOLUBLE A pH 4,6 (NS), NITRÓGENO SOLUBLE EN ÁCIDO TRICLOROACÉTICO, 12% (NTCA) Y NITRÓGENO SOLUBLE EN ÁCIDO FOSFOTUNGSTICO, 1% (NPTA) DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO DAMBO ELABORADO CON ADICIÓN DE *Streptococcus thermophilus* Y *Lactobacillus bulgaricus* ATENUADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS<sup>1</sup>

Días de maduración	Control A	63°C B	67°C C	70°C D
NS				
	A <sup>b</sup>	B <sup>b</sup>	C <sup>ab</sup>	D <sup>a</sup>
1	9,6	9,7	11,6	12,3
30	14,1	15,8	15,9	16,8
60	17,9	21,4	21,3	22,8
90	25,2	25,1	25,5	30,4
NTCA				
	A <sup>b</sup>	B <sup>ab</sup>	C <sup>a</sup>	D <sup>a</sup>
1	7,5	9	9,3	9
30	9,9	13,5	14,5	15,1
60	15,4	18,9	19,2	20,2
90	22,7	23,4	23,6	27,6
NPTA				
	A <sup>b</sup>	B <sup>b</sup>	C <sup>ab</sup>	D <sup>a</sup>
1	7,3	9,5	9,5	9,9
30	11,8	13,7	14,3	15,1
60	14,9	18	17,2	19,3
90	23,4	22,7	25	28,6

<sup>1</sup> Valores medios calculados del análisis duplicado de dos experimentos expresados en % del nitrógeno total. <sup>ab</sup> Los tratamientos con el mismo superíndice no son diferentes (P>0,05).

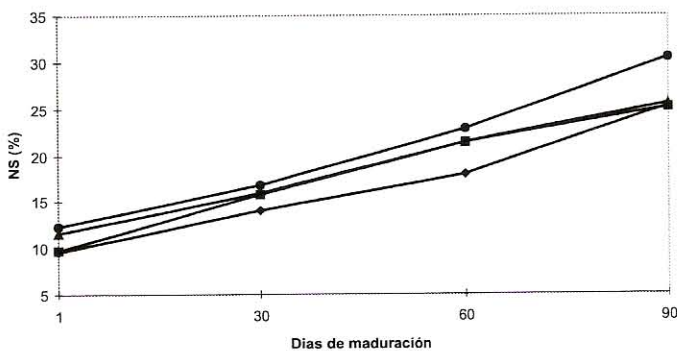


FIGURA 1. EVOLUCIÓN DE LA FRACCIÓN DE NITRÓGENO SOLUBLE A pH 4,6 (NS), EXPRESADO COMO PORCENTAJE DEL NITRÓGENO TOTAL, EN EL CONTROL A (◆) Y EN LOS LOTES CON ADICIÓN (2,0% v/v) DE MICROORGANISMOS ATENUADOS, DURANTE EL PERÍODO DE MADURACIÓN: B, 63°C (■); C, 67°C (▲) Y D, 70°C (●).

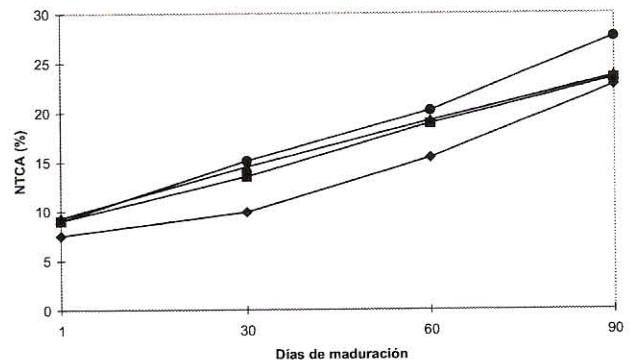
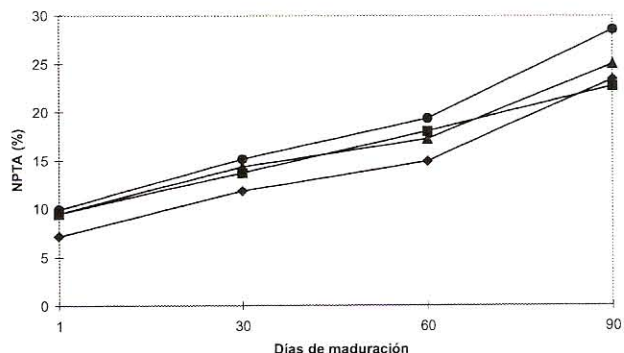


FIGURA 2. EVOLUCIÓN DE LA FRACCIÓN DE NITRÓGENO SOLUBLE EN ÁCIDO TRICLOROACÉTICO 12% (NTCA), EXPRESADO COMO PORCENTAJE DEL NITRÓGENO TOTAL EN EL CONTROL A (◆) Y EN LOS LOTES CON ADICIÓN (2,0% v/v) DE MICROORGANISMOS ATENUADOS, DURANTE EL PERÍODO DE MADURACIÓN: B, 63°C (■); C, 67°C (▲) Y D, 70°C (●).



**FIGURA 3. EVOLUCIÓN DE LA FRACCIÓN DE NITRÓGENO SOLUBLE EN ÁCIDO FOSFOTUNGSTICO 1% (NPTA), EXPRESADO COMO PORCENTAJE DEL NITRÓGENO TOTAL, EN EL CONTROL A (◆) Y EN LOS LOTES CON ADICIÓN (2,0% v/v) DE MICROORGANISMOS ATENUADOS, DURANTE EL PERÍODO DE MADURACIÓN: B, 63°C (■); C, 67°C (▲) Y D, 70°C (●).**

El método descrito en este trabajo para disminuir el tiempo de maduración del queso está basado en dos aspectos importantes: primero, que la maduración del queso depende de las enzimas de las bacterias lácticas iniciadoras añadidas, y segundo, que un aumento en la cantidad de enzimas bacterianas en el queso también aumentaría la velocidad de las reacciones productoras de compuestos importantes del sabor. Las ventajas de introducir una cantidad adicional de bacterias iniciadoras en el queso, en comparación con los métodos que utilizan la adición directa de preparados de enzimas son: a) se introduce una mezcla completa de enzimas con las células bacterianas intactas y b) las pérdidas de enzimas en el suero se minimizan por la adición de células completas. El tratamiento térmico utilizado en este estudio para reducir la producción de ácido láctico pudo haber inactivado considerablemente otras enzimas importantes en la maduración del queso aparte de las proteasas y producir una maduración anormal. Sin embargo, este efecto no fue observado en nuestro estudio.

La determinación de fracciones de nitrógeno soluble (NS, NTCA y NPTA) utilizadas como índices de maduración, proporcionan una información adecuada de la extensión global de la proteólisis. Los compuestos de nitrógeno solubles a pH 4,6 (NS) son producidos principalmente por el cuajo [18] y aumentan durante la maduración. Las proteínas del suero y las peptonas proteosas (de la acción de la plasmina) también son solubles a pH 4,6, pero su contribución es relativamente menor. Las  $\gamma$ -caseínas son insolubles a pH 4,6. El ácido tricloroacético ( $CCl_3COOH$ , TCA) es un precipitante de proteínas que ha sido ampliamente utilizado como índice de maduración en quesos. Yvon y col. [27] encontraron que todos los péptidos con menos de siete residuos de aminoácidos eran solubles en TCA al 12%. La renina es responsable de la producción de parte del nitrógeno soluble en TCA 12%, pero las proteinasas y peptidasas del cultivo iniciador contribuyen también conside-

rablemente a la formación del nitrógeno soluble en TCA 12% [18]. El ácido fosfotúngstico ( $12WO_3 \cdot H_3PO_4 \cdot xH_2O$ , PTA) es un precipitante de proteínas muy selectivo. Solo aminoácidos libres (aparte de lisina y arginina) y péptidos menores son solubles en PTA 5%. El nitrógeno soluble en PTA (1,0; 2,5; 5,0; 6,0 ó 6,5%) ha sido ampliamente utilizado como índice de aminoácidos libres en queso [2, 17, 20, 25, 26].

Este trabajo confirma que el cultivo de *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* puede ser utilizado para acelerar la proteólisis y realzar el sabor del queso Dambo, como fue demostrado previamente en queso suizo por Pettersson y Sjöström [20] y en queso Feta por Vafapoulou y col. [25].

Vafapoulou y col. [25] observaron efectos semejantes en los valores de NS, NTCA y NPTA al utilizar un cultivo de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* atenuado previamente a 63°C, en queso Feta y encontraron que los quesos estaban suficientemente maduros a los 40 días de maduración, mientras que el control necesitó 80 días. Asimismo Pettersson y Sjöström [20] observaron un incremento en las fracciones de NTCA y NPTA al utilizar una mezcla de bacterias iniciadoras termófilas de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* en la aceleración de la maduración del queso suizo semiduro obteniendo una reducción del tiempo de maduración de 30 días. Los análisis organolépticos mostraron una correlación entre el sabor y el NPTA.

El Soda y col. [6] en un trabajo con extractos libres de células de *Lactobacillus helveticus* en queso Cheddar, encontraron un aumento mayor en NS en comparación con NTCA y NPTA y desarrollo de sabor amargo al mismo tiempo, lo cual no sucedió en el presente experimento. Las preparaciones de extractos muestran probablemente una composición de enzimas proteolíticas diferente al de las células enteras.

Ardö y Pettersson [2] observaron un aumento del nitrógeno amino NPTA al utilizar bacterias de *Lactobacillus helveticus* en la elaboración de queso suizo. Sin embargo las fracciones de NS y NTCA no fueron diferentes al control. Esta discrepancia entre los resultados puede ser motivada a los diferentes microorganismos utilizados y a los diferentes tipos de queso estudiados.

En base a los valores de las fracciones de NS (FIG. 1) se puede decir que el lote D (70°C) presentó a los 70 días una maduración equivalente a la del control a los 90 días, a las condiciones de almacenamiento (18°C y 85% HR). Es de hacer notar que la temperatura de almacenamiento es relativamente alta, lo cual es un factor importante en la actividad tanto de proteinasas como de peptidasas. Este factor, sin embargo, no fue considerado en el presente ensayo.

A pesar de la reducción considerable de la actividad enzimática (83%) obtenida en el cultivo tratado a 70°C [23], los

resultados obtenidos en los lotes de queso adicionados con este cultivo, se pueden explicar en base al deterioro que sufre la pared celular de las células tratadas por calor, lo cual incrementaría la lisis celular permitiendo la liberación del sistema enzimático con mayor rapidez que en el control, efecto que se hace más evidente al aumentar la temperatura. La reactivación durante el período de almacenamiento de las enzimas inactivadas por el calor puede ser otra explicación. Las proteasas están localizadas cerca de la membrana y son por lo tanto más susceptibles al calor que las peptidasas, las cuales son citoplasmáticas [11]. Esta diferencia en la resistencia de las proteasas y peptidasas puede explicar las diferencias observadas entre las fracciones NTCA y NPTA.

### 3. Evaluación Sensorial

La puntuación media obtenida de la evaluación sensorial para la intensidad del sabor y grado de gusto a los 45 y 75 días de maduración se muestra en la TABLA IV. La comparación entre los dos períodos mediante la diferencia de medias demuestra, como era de esperar, diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en cuanto al grado de gusto, no así en cuanto a la intensidad del sabor ( $P > 0,05$ ). Los tratamientos térmicos de atenuación de los microorganismos no demostraron efectos estadísticamente significativos ( $P > 0,05$ ) sobre estos parámetros de calidad en el queso madurado. Estos resultados demuestran que el aumento de la actividad proteolítica evidenciada por los valores de las fracciones de nitrógeno soluble durante el período de maduración no contribuyó a la intensidad del gusto, probablemente debido a un aumento insuficiente de la proteólisis o por la naturaleza de los productos resultantes del desdoblamiento proteico. Se requiere realizar una evaluación sensorial más minuciosa.

TABLE IV  
VALORES MEDIOS OBTENIDOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DEL QUESO DAMBO ELABORADO CON ADICIÓN DE *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* Y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* ATENUADOS MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO

	45 días		75 días <sup>3</sup>	
	I <sup>1</sup>	G <sup>2</sup>	I <sup>1</sup>	G <sup>2</sup>
A (control)	6,38 <sup>a</sup>	6,15 <sup>a</sup>	6,55 <sup>a</sup>	7,83 <sup>b</sup>
B (63°C)	5,43 <sup>a</sup>	5,71 <sup>a</sup>	6,72 <sup>a</sup>	8,02 <sup>b</sup>
C (67°C)	6,20 <sup>a</sup>	6,11 <sup>a</sup>	7,58 <sup>a</sup>	7,85 <sup>b</sup>
D (70°C)	6,43 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,477 <sup>a</sup>	7,2 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> I = Intensidad del sabor (0 = muy suave, 5 = moderado, 10 = muy fuerte). <sup>2</sup> G = Grado de gusto (0 = me desagrada muchísimo, 5 = me es indiferente, 10 = me gusta muchísimo). <sup>3</sup> No se encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0,05$ ) para la intensidad del sabor ni grado de gusto. <sup>ab</sup> Las medias con superíndice igual en un mismo tratamiento no son diferentes ( $P > 0,05$ ).

Todos los quesos tenían generalmente buen sabor. El ligero sabor amargo detectado a los 45 días de maduración no se detectó a los 75 días, indicando la capacidad de las peptidasas de los cultivos utilizados de producir gran proporción de péptidos pequeños y aminoácidos.

### CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que es posible acelerar la maduración del queso tipo Dambo por el método descrito y disminuir el tiempo de almacenamiento considerablemente sin la producción de sabores amargos o extraños.

La suspensión del cultivo de *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* atenuada mediante tratamiento térmico a 70°C fue satisfactoria para acelerar la tasa de maduración, según se demuestra por el aumento de la proteólisis, determinada mediante las fracciones de nitrógeno soluble. Se obtuvo una reducción del período de maduración de 20 días, equivalente a un 22% del tiempo total normalmente necesario.

El tratamiento térmico utilizado es un método simple y adecuado para aumentar el sistema enzimático proteolítico. Las técnicas no representan ninguna complicación tecnológica ni interfieren en la manufactura del queso. Se requiere, sin embargo, mayor investigación acerca de los efectos del tratamiento térmico sobre las enzimas proteolíticas.

### AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes. Se agradece especialmente la colaboración del personal de la Planta de Lácteos Santa Rosa de esta Universidad.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARBIGE, P. R.; FRENDE, S. C.; SILVER, S. C.; ZELKO, J. T. Novel lipase for Cheddar cheese flavour development. *Food Technol.* 40 (4): 91-98. 1986.
- [2] ARDÖ, Y.; PETERSSON, H.E.. Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *J. Dairy Res.* 55: 239-245. 1988.
- [3] BARTELS, H. J.; JOHNSON, M. E.; OLSON, N. F. Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavour development. *Milchwissenschaft.* 42: 139-146. 1987.
- [4] CENTRO DE INVESTIGACIONES TECNOLÓGICAS DE LA INDUSTRIA LÁCTEA (CITIL). Instituto Nacional de

- Tecnología Industrial. **Determinación del índice de maduración en quesos**. Buenos Aires. 7 pp. 1988.
- [5] EL ABOUDI, M.; PANDIAN, S.; TRÉPANIÉ, G.; SIMARD, R. E.; LEE, B. H. Heat-shocked lactobacilli for acceleration of Cheddar cheese ripening. **J. Food Sci.** 56: 948-953. 1991.
- [6] EL SODA, M., DESMAZEAUD, M.J., ABOUDONIA, S., BADRAN, A. Acceleration of cheese ripening by the addition of extracts from *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* to the cheese curd. **Milchwissenschaft.** 37: 325-332. 1982.
- [7] EL SODA, M.; PANDIAN, S. Recent developments in accelerated cheese ripening. **J. Dairy Sci.** 74: 2317-2335. 1991.
- [8] EL SODA, M.A. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. **FEBS Microbiol Rev.** 12: 239-246. 1993.
- [9] EXTERKATE, F. A.; DE VEER, G. J.; STADHOUDERS, J. Acceleration of the ripening process of Gouda Cheese by using heat-treated mixed-strain starter cells. **Neth. Milk Dairy J.** 41: 307-312. 1987.
- [10] FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, L.; RAMOS, M. The use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of Manchego type cheese from ovine and bovine milk. **J. Dairy Sci.** 77: 2139-2146. 1994.
- [11] FREY, J.P.; MARTH, E.H.; JOHNSON, M.E.; OLSON, N.F. Heat and freeze shocking cause changes in peptidase and protease activity of *Lactobacillus helveticus*. **Milchwissenschaft.** 41: 681-686. 1986.
- [12] HAYAKAWA, K. Classification and actions of food microorganisms - With particular reference to fermented foods and lactic acid bacteria. In: NAKAZAWA, Y.; OZONO, A. **Functions of fermented milk**. Elsevier Applied Science. USA. Cap 7. 36 pp. 1992.
- [13] JOHNSON, J. A.C.; ETZEL, M.R.. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. **J. Dairy Sci.** 78: 761-768. 1995.
- [14] JOHNSON, J.A.C.; ETZEL, M.R.; CHEN, C.M.; JOHNSON, M.E. Accelerated ripening of reduced fat Cheddar cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 adjuncts. **J. Dairy Sci.** 78: 769-776. 1995.
- [15] LAW, B.A.; WIGMORE, A.S. Accelerated cheese ripening with food grade proteinases. **J. Dairy Res.** 49: 137-146. 1982.
- [16] MARSHALL, R.J. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. Ed . 16. American Public Health Association. Washington, D.C. 85 pp. 1992.
- [17] NÚÑEZ, M.; GUILLÉN, A. M.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A.; MARCILLA, A. M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases. **J. Dairy Sci.** 74: 4108-4118. 1991.
- [18] O'KEEFFE, R.B.; FOX, P.F.; DALY, C. Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. **J. Dairy Res.** 43: 97-107. 1976.
- [19] PEILISSIER, J. P.; MANCHON, P. Comparative study of the bitter taste of amynic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. **J. Food Sci.** 41: 231-233. 1976.
- [20] PETERSSON, H.E.; SJÖSTRÖM, G. Accelerated cheese ripening: a method for increasing the number of lactic starter bacteria in cheese without detrimental effects to the cheese-making process, and its effect on the cheese ripening. **J. Dairy Res.** 42: 313-326. 1975.
- [21] RABIE, A. M. Acceleration of blue cheese ripening by cheese slurry and extracellular enzymes of *Penicillium roqueforti*. **Lait.** 69: 305-311. 1989.
- [22] REVAH, S.; LEBEAULT, J. M. Accelerated production of blue cheese flavours by fermentation on granular curds with lipase addition. **Lait.** 69: 281-289. 1989.
- [23] SÁNCHEZ, M.D. Atenuación térmica de cultivos lácticos destinados a la maduración acelerada de quesos. **Revista de la Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes.** 42: 27-31. 2001.
- [24] STADHOUDERS, J. The hydrolysis of protein during the ripening of Dutch cheese. The enzymes and bacteria involved. **Netherlands Milk and Dairy J.** 14: 83-110. 1960.
- [25] VAFAPOULOU, A.; ALICHANIDIS, E.; ZERFIRIDIS, G. Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases.\* **JK. Dairy Res.** 56: 285-296. 1989.
- [26] WILKINSON, M.G.; GUINEE, T.P.; O'CALLAGHAN, D. M.; FOX, P.F. Effect of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. **Lait.** 72: 449-459. 1992.
- [27] YVON, M.; CHABANET, C.; PÉLISER, J. P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. **Int. J. Peptide Protein Res.** 34: 166-176. 1989.