



*“FORMULACION DE
FERMENTOS PARA LA
ELABORACION DE QUESOS”*

María del Rosario Moreira

Tesis presentada para el grado de Doctor en

Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería

Universidad Nacional de La Plata

Abril de 1999

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ingeniería fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Graciela De Antoni.

*A Larisa, Guillermo,
a mis padres y hermanos.*

Deseo expresar un especial agradecimiento:

√ *A la Dra G. L. De Antoni por su apoyo incondicional y toda la experiencia y conocimientos que me ha brindado.*

√ *A la Dra. M. C. Añón por haberme dado la oportunidad de llegar a ésta instancia de mi formación profesional.*

√ *Al CTDCA, Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito para llevar a cabo este trabajo de tesis.*

√ *A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por el otorgamiento de las becas que permitieron que me dedicara a la investigación.*

√ *A la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata y al Dpto. de Ingeniería Química por brindarme la oportunidad de presentar allí mi trabajo de tesis.*

√ *A la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Nacional de Mar del Plata, que me brindó el apoyo económico necesario en la última etapa de la realización de ésta Tesis.*

√ *A la Sra. Lucía Brandi por su ayuda en la preparación del material necesario para mi trabajo experimental.*

√ *A la Dra. A. Abraham, por su colaboración en el desarrollo de mi plan de trabajo.*

√ *Al Dr. G. Castro y al CITML (Rafaela, Sta. Fe) por brindarme sus instalaciones para la elaboración de quesos a escala de planta piloto.*

√ *A la Srta. Carolina Brañas, estudiante de la carrera de Bioquímica, quien me ayudó en la última etapa experimental.*

√ *A mis compañeros del CTDCA por su compañerismo y amistad.*

√ *A mi familia por su paciencia y aliento frente a las dificultades.*

INDICE

* GENERALIDADES:

♣ <i>Introducción general</i>	1
✓ <i>Materias Primas utilizadas para la elaboración de quesos</i>	4
♣ <i>Objetivos</i>	13
♣ <i>Cepas y medios de cultivo utilizadas</i>	14

PRIMERA PARTE: "Sinergismo y Antagonismo entre distintas cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*".

♣ <i>Introducción</i>	21
✓ <i>Definición de parámetros básicos en reología</i>	23
♣ <i>Objetivos</i>	26
♣ <i>Materiales y Métodos:</i>	
✓ <i>Cepas utilizadas</i>	27
✓ <i>Metodología utilizada:</i>	
* <i>Interacción Sinérgica y antagónica entre distintas cepas de lactobacilos y estreptococos</i>	27
* <i>Características Tecnológicas de cultivos monomicrobianos y mixtos</i>	29
* <i>Efectos del agregado de sobrenadantes de cultivos de lactobacilos sobre la actividad metabólica y características tecnológicas de <i>S. thermophilus</i>.</i>	31

✦ Resultados y Discusión:	
✓ <i>Interacción sinérgica y antagónica entre distintas cepas de lactobacilos y estreptococos:</i>	34
* <i>En medio de cultivo, incubando a 30 y 44° C.</i>	34
* <i>En leche, incubando a 30 y 44° C.</i>	37
* <i>Análisis conjunto del relevamiento de cepas realizado en leche y en medio a 30 y 44° C</i>	45
✓ <i>Desarrollo bacteriano y características tecnológicas de cultivos monomicrobianos y mixtos:</i>	46
* <i>Características de coágulos de leche, obtenidos por incubación a 30 y 44° C durante 24 horas.</i>	49
* <i>Características de los coágulos de leche luego del almacenamiento a 10° C durante 20 días.</i>	55
✓ <i>Efectos del agregado de sobrenadantes de cultivos de lactobacilos sobre la actividad metabólica, crecimiento y propiedades tecnológicas de cultivos de estreptococos:</i>	59
* <i>Efecto sobre la actividad acidificante.</i>	59
* <i>Efecto sobre el crecimiento bacteriano y producción de ácidos orgánicos.</i>	60
* <i>Efecto sobre las características tecnológicas del producto fermentado.</i>	66
✦ Conclusiones	71

SEGUNDA PARTE: Estimulación de lactobacilos con formiato de sodio.

✦ Introducción:

* Efecto del formiato sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. 73

* Influencia del formiato sobre la actividad proteolítica específica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. 75

✦ Objetivos 78

✦ Materiales y Métodos:

✓ Cepas utilizadas 79

✓ Reactivación y preparación de cepas 79

✓ Incubación 79

✓ Metodología utilizada 79

✦ Resultados y Discusión:

✓ Efecto del formiato sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: 85

* Efecto comparativo del formiato de sodio sobre el crecimiento y la producción de ácido a 30 y 44° C. de tres cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* desarrolladas en leche. 93

✓ Influencia del formiato sobre la actividad proteolítica específica de los lactobacilos: 95

* Análisis de la actividad proteolítica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por incremento de Nitrógeno TCA-soluble (ensayo A). 97

* <i>Análisis de la actividad proteolítica específica (ensayo B).</i>	99
* <i>Análisis de la actividad proteolítica específica mediante SDS-PAGE (ensayo B).</i>	102
♣ <i>Conclusiones</i>	108

TERCERA PARTE: Elaboración de quesos de pasta blanda.

♣ <i>Introducción</i>	109
* <i>Aptitud de la leche para la elaboración de quesos</i>	109
* <i>Maduración y fermentación de la leche</i>	110
* <i>Coagulación o cuajado de la leche</i>	112
* <i>Manipulación de la cuajada</i>	115
* <i>Factores que intervienen en el desuerado y en los procesos microbiológicos que se desarrollan en la cuajada</i>	117
* <i>Lavado de los granos</i>	119
* <i>Moldeo del queso</i>	119
* <i>Prensado</i>	120
* <i>Salado</i>	121
* <i>Maduración del queso</i>	121
* <i>Rendimiento quesero de los distintos componentes de la leche</i>	135
♣ <i>Objetivos</i>	137
♣ <i>Materiales y Métodos</i>	
✓ <i>Cepas utilizadas</i>	138
✓ <i>Tecnología para la elaboración de queso cuartirolo</i>	141

✓ <i>Técnicas utilizadas</i>	141
♣ <i>Resultados y Discusión:</i>	
✓ <i>Elaboración de quesos a escala de laboratorio</i>	151
✓ <i>Elaboración de quesos a escala de planta piloto</i>	154
✓ <i>Análisis descriptivo y aceptabilidad sensorial de queso cuartirolo</i>	171
♣ <i>Conclusiones</i>	181
♣ <i>Discusión y Conclusiones finales</i>	183
♣ <i>Bibliografía</i>	189

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

✓ *MOREIRA M., ABRAHAM A. and DE ANTONI G.: Protooperative Interaction between different strains of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus y Streptococcus thermophilus at suboptimal temperature. Enviado en Diciembre de 1998. Revista Argentina de Lactología.*

✓ *MOREIRA M., ABRAHAM A. and DE ANTONI G.: Sodium Formate Stimulation of the Proteolytic Activity of Lactobacilli Grown at Low Temperature. - Milchwissenschaft Milk Science International; 57 (11) pp: 607 (1997).*

✓ *MOREIRA M., ABRAHAM A. and DE ANTONI G.: Technological Properties of fermented milk with pure and mixed cultures. Enviado en febrero de 1999. J. Dairy Sci..*

✓ *MOREIRA M., DE ANTONI G.: Queso de Cuatroquesos: Influencia del formiato de sodio e interaccion entre cepas. Revista Argentina de Lactología, Año IX, N° 14, pp. 14-27 (1997).*

✓ *ABRAHAM A., BECERRA A., MOREIRA M and DE ANTONI G.: Proteinase expression in Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, enviado en diciembre de 1998 a la Revista Argentina de Lactología.*

"Generalidades"

Introducción General

Objetivos

Cepas y Medios de Cultivo utilizados

INTRODUCCIÓN GENERAL

Queso es el nombre genérico para un grupo de productos alimenticios en los cuales el proceso de elaboración está basado en la fermentación de la leche. Se producen alrededor de 500 variedades de quesos en el mundo. Simplemente es un medio de conservación de los dos constituyentes de la leche más importantes (grasa y proteínas); haciendo uso de los dos principios clásicos de la preservación de alimentos: fermentación ácido-láctica y reducción de la actividad acuosa por medio de la eliminación del agua y el agregado de cloruro de sodio. (Fox, 1987).

Los quesos han llegado a ser un alimento de gran importancia en la alta cocina, tanto por sus propiedades altamente nutritivas, como por sus cualidades gastronómicas (Fox, 1987).

Son los principales productos lácteos, su consumo tiene tendencia a aumentar, mientras que el de otros productos lácteos no presenta un ritmo de crecimiento positivo. La continua introducción en los grandes mercados de tipos de queso antes poco asequibles al consumidor y los cambios en los hábitos alimentarios, sugieren el mantenimiento de esta tendencia creciente (Juárez, Alonso y Ramos, 1983).

Se fabrican más de 30 variedades de quesos en nuestro país. En 1990, la producción total de quesos fue de 270.000 ton., de los cuales la mayor producción correspondió a los de pasta blanda (130.000 ton.), entre ellos el cuartirolo. En 1992, la producción total de quesos fue de aproximadamente 336.000 ton., correspondiendo 50.800 ton. a quesos duros, 117.000 ton a quesos semiduros, 165.000 ton a quesos blandos y unas 7.400 ton. de queso fundido. En 1995 la producción total de quesos fue de 371.000 ton. y la de quesos blandos fue de 199.000 ton. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 1997). Estas cifras demuestran que los quesos de pasta blanda, entre los cuales se ubica el cuartirolo, son los más conocidos y consumidos del país (Belfiore, 1979). Por otro lado, en 1996 las exportaciones de queso de pasta blanda fueron de 4000 ton., principalmente a Paraguay y Brasil, de las variedades de quesos, el cuartirolo es el que se exporta en mayor cantidad (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 1997).

De acuerdo con lo establecido por el *Código Alimentario Argentino (C.A.A, 1993)*, en el *art. 605*: con la denominación de *queso* se entiende el producto fresco o madurado que se obtiene por separación del suero de la leche ó de la leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), coaguladas por acción del cuajo y/o enzimas específicas, complementada o no por bacterias específicas o por ácidos orgánicos permitidos a este fin, con o sin el agregado de sustancias colorantes permitidas, especias, condimentos u otros productos alimenticios.

El *art. 606* establece que en la elaboración de quesos son obligatorias las siguientes operaciones:

- higienización de la leche
- pasteurización de la leche; quedan excluidas de ésta obligación, la leche higienizada que se destine a la elaboración de quesos que se sometan durante no menos de 60 días al proceso de maduración.

El *art. 607*: establece que en la elaboración de quesos quedan permitidas las siguientes operaciones:

- neutralización parcial de la acidez propia de la leche, por medio de sustancias alcalinas de uso permitido.
- la adición de hasta 200mg/kg de CaCl_2 anhidro y de hasta 200mg/kg de KNO_3 o NaNO_3 , para reducir la formación de ojos, cuando se considere necesario.
- el agregado de NaCl , en cantidad adecuada al tipo de queso a elaborar.
- la adición a la leche de cultivos de bacterias apropiadas de acuerdo a la variedad de queso a elaborar.
- la siembra en o sobre la cuajada de esporas de hongos pertenecientes al género *Penicillium* o cultivos de bacterias apropiadas para la clase de queso a que normalmente corresponda.
- el empleo de materias colorantes de origen vegetal permitidos a los fines de colorear la pasta.
- el agregado de ácido sórbico o su equivalente en sorbato de potasio, en cantidad tal para que el producto terminado lo contenga en una cantidad no mayor de 1.0 g/kg.
- el empleo de enzimas apropiadas al tipo de queso a elaborar.

-la adición de especias o condimentos u otros productos alimenticios autorizados por el presente Código.

-la coagulación de la leche por medio de ácidos: láctico, cítrico, tartárico, acético.

-la aplicación sobre la corteza, de féculas o almidón en los quesos de pasta blanda, y en los quesos de pasta dura, aceite de lino, otros aceites vegetales solos y sustancias colorantes autorizadas a ese fin.

También permite el parafinado o el empleo de ceras para la corteza, el agregado de sustancias inhibitorias del desarrollo de mohos. Además, permite la maduración de los quesos sin corteza, en sacos de material plástico autorizado; y el envasado de quesos en porciones, en continentes de material plástico adecuado, hojas de estaño o de aluminio.

Los quesos pueden clasificarse:

*De acuerdo al **contenido de materia grasa** (art. 608)

a- doble crema: cuando contengan no menos de 60% de materia grasa (M.G.)

b- grasos: cuando contengan más de 40% y hasta 59,9% de M.G.

c- semi grasos: cuando contengan entre 25 y 39,9% de M.G.

d- magros: cuando contengan más de 10 y hasta 24,9% de M.G.

e- de leche descremada: cuando contengan menos de 10% de M.G.

*De acuerdo al **tiempo de maduración y al contenido de agua de la pasta**, sobre muestras representativas que se obtienen por debajo de 1cm de la corteza.

-quesos de pasta blanda o quesos frescos: los que contengan entre 45 y 55% de agua.

-quesos de pasta semidura: deben contener entre 36 y 44% de agua.

-quesos de pasta dura: deben contener entre 27 y 35% de agua.

*Otra clasificación más amplia podría ser la **enunciada por Fox (1987)**

√ -Quesos muy duros (contenido de agua menor al 25%)

-madurados por bacterias: Asiago, Parmesano, Romano.

√ -Quesos duros (contenido de agua entre 25 y 36%)

-madurados por bacterias, sin ojos: Cheddar.

-madurados por bacterias, con ojos: Emmental, Gruyere.

√ -Quesos semiblandos (contenido de agua entre 36 y 40%)

-madurados principalmente por bacterias: Brick, Munster.

-madurados por bacterias y superficialmente por otros microorganismos:
Limburger

-madurados principalmente por hongos en el interior: Roquefort, Danablu.

Materias Primas utilizadas para la elaboración de quesos:

1- Leche: constituye el producto de la secreción normal de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos. Contiene sustancias nutritivas, indispensables para el crecimiento y desarrollo de las crías de las hembras productoras, tales como proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales, vitaminas, enzimas, pigmentos, ácidos orgánicos, lípidos y gases. El conjunto de los componentes enumerados, excluidos los gases y el agua, constituyen el extracto seco y se halla en la leche en diferentes estados físicos. El componente más abundante es el agua, oscilando su riqueza entre el 83 y 89%. Las sales y los azúcares se encuentran formando una disolución acuosa, las proteínas se hallan en estado coloidal, y las grasas en estado de emulsión, constituyendo la fase dispersante una disolución acuosa de sales, azúcares y proteínas.

El contenido en extracto seco, es uno de los factores que más influye en la calidad de la leche; por lo general, para fabricar queso se recurre a la de la vaca. Su color es blanco, ligeramente amarillento y su sabor es dulzón (Cheftel, 1989).

La calidad de la leche y composición puede presentar variaciones capaces de producir una fuerte influencia sobre la calidad del producto final (Vindfelt, Hansen's Laboratorium, 1994).

Composición:

√ *Agua:* En la leche hallamos agua libre y ligada. La primera es de gran importancia en quesería, porque muchos de los procesos físico-químicos y microbiológicos que tienen lugar en la elaboración del queso exigen su intervención y porque regulando su contenido se le da al queso la consistencia deseada. Conociendo la cantidad de agua libre, se puede determinar el grado

de hidratación de las proteínas a la temperatura y al pH a que se haya efectuado la medida.

Los procesos microbiológicos y enzimáticos de la maduración del queso dependen del contenido en agua libre; ésta desaparece en parte al deshidratar la leche y al calentar la cuajada.

√ *Proteínas de la leche*: oscilan entre un 2,5 y 4,5% en la leche. Las proteínas de la leche se pueden dividir en caseínas, proteínas del suero, proteínas de membrana de glóbulos grasos y enzimas.

Las caseínas son fosfoproteínas que forman suspensiones micelares y precipitan a pH=4,5. Por electroforesis alcalina con urea se pueden identificar distintas fracciones, las mayoritarias son α_{s-1} , α_{s-2} , β y κ -caseínas. Las tres primeras son proteínas altamente fosforiladas que se desestabilizan en presencia de calcio, la κ -caseína es poco fosforilada, no se desestabiliza en presencia de calcio, pero es sensible a la acción de la renina.

Las caseínas se encuentran asociadas en micelas compuestas por submicelas, cada una de ellas está compuesta por las distintas fracciones caseínicas estabilizadas por uniones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas. Para mantener la micela en suspensión juegan un rol importante las sales, sobre todo el fosfato de calcio y en menor proporción el citrato de calcio.

La caseína de la leche puede precipitarse por acidificación al alcanzarse un pH= 4,6, que es el punto isoeléctrico de la caseína. Precipita, tanto por adición intencional de un ácido, como por acidificación biológica, propiedad que es aprovechada para la fabricación de ciertos quesos. Coagula también al añadir a la leche cloruro cálcico, ésta coagulación va acompañada de un aumento del tamaño de las micelas proteicas, atribuible a la reducción de su carga eléctrica por los iones de calcio positivamente cargados. La coagulación enzimática es el sistema más difundido en quesería y utiliza sustancias principalmente de origen animal y microbiano. Los coagulantes de origen animal son en general mezclas de dos enzimas: la quimosina y la pepsina; la tripsina y la quimotripsina, que son también enzimas del aparato digestivo animal, no se pueden utilizar ya que son muy proteolíticas. El coagulante de origen bovino es

el que ha alcanzado mayor difusión, puede obtenerse tanto de animales lactantes como de adultos. Bajo la acción de éstas enzimas proteolíticas, la caseína se transforma en paracaseína, que precipita formando la cuajada. Se pueden utilizar también otro tipo de proteasas coagulantes provenientes de cultivos monomicrobianos, elaboradas por distintos hongos, como *Mucor pusillis*; o por bacterias, como *Bacillus cereus*, *B. polymixa*, pero tienen una forma de acción poco conocida (Zalazar, 1994).

Otras proteínas presentes en la leche son las de suero, entre las cuales podemos mencionar la α -lactoglobulina, β -lactoalbúmina, BSA (sero albúmina bovina) e inmunoglobulinas.

Por otro lado encontramos proteínas asociadas a la membrana del glóbulo graso, e innumerables enzimas, tales como lactoperoxidasas, catalasas, enzimas proteolíticas como la plasmina que corta la α -caseína y su acción está asociada a sabores amargos en quesos.

√ *Materia grasa*: es el componente más variable en la leche, en cuanto al porcentaje en que se halla presente; que oscila entre un 2,6 y 6%. Está constituida por glicerina y ácidos grasos y contiene 20 ácidos grasos distintos.

La grasa de la leche contribuye al aroma del queso, aumenta el rendimiento quesero, mejora la consistencia e impide la excesiva concentración de la caseína.

Al igual que las proteínas, es objeto de profundas modificaciones, durante la maduración, que contribuyen a conferir a cada tipo de queso sus características particulares.

√ *Lactosa*: es un disacárido constituido por dos azúcares reductores, la glucosa y la galactosa, posee menor poder edulcorante y es menos soluble que la sacarosa, su contenido oscila en la leche entre 4.0 y 5,2 %. Ofrece gran importancia en la elaboración de quesos, ya que bajo la acción de enzimas bacterianas sufre las fermentaciones láctica, propiónica, alcohólica, butírica, en las que rinde ácido láctico, anhídrido carbónico, alcohol, ácido propiónico, ácido butírico y otros compuestos, que confieren al queso su sabor y olor característicos.

Las fermentaciones de mayor interés en la industria quesera son la láctica y la propiónica; la butírica constituye un problema y es causa de numerosos defectos.

√ *Sales*: la mayor parte se encuentran en la leche en disolución molecular o iónica; pocas en estado coloidal. Las más abundantes son las de los ácidos fosfórico, cítrico y láctico. Pese a su porcentaje relativamente bajo (0,7%), ejercen una gran influencia sobre las características de la leche. Algunas, especialmente las cálcicas, son las responsables de que la caseína se encuentre formando un complejo micelar de fosfocaseinato cálcico en equilibrio con el suero. La coagulación de la leche por el cuajo, exige la presencia de sales cálcicas.

√ *Vitaminas*: la leche es rica en muchas vitaminas y constituye por lo tanto una fuente importante de las mismas. El queso fabricado con leche ordeñada en verano, es más rico en vitaminas liposolubles, especialmente A y D, (Cheftel, 1989).

2-Fermentos utilizados en quesería:

El problema de la pasteurización de la leche en quesería se plantea en los siguientes términos: o el calentamiento es suficiente para destruir con absoluta seguridad todos los gérmenes patógenos y entonces la leche sufre modificaciones que dificultan la fabricación, o el calentamiento es moderado y el producto se salva, pero sin que en este caso se pueda garantizar suficientemente la salubridad (Meinardi, 1994).

El calentamiento al abrigo del aire es el más recomendable para limitar la precipitación de sales cálcicas. Después de la pasteurización, la leche tiene que ser rápidamente enfriada hasta la temperatura adecuada para la adición del cuajo, a fin de evitar el desarrollo masivo de los gérmenes termorresistentes que ulteriormente podrían provocar graves accidentes de fabricación.

Si bien el mantenimiento de la constitución inicial de la leche crea serias preocupaciones al productor de quesos, se ahorra en cambio los delicados problemas que plantea la siembra de la leche. Se trata, en efecto, de sustituir

artificialmente la flora inicial espontánea destruida por el calor por otra flora que permita la formación y la evolución conveniente de la cuajada. Los fenómenos microbianos que tienen lugar en los quesos presentan tal complejidad que aún estamos muy lejos de conocerlos en todos sus detalles. Es de temer, en consecuencia, que la resiembra de la leche, en el estado actual de nuestros conocimientos, no aporte todos los elementos necesarios para la fabricación de un excelente queso. Este grave escollo suele ser invocado por los adversarios de la pasteurización para justificar el sabor generalmente menos aromático y más soso de los quesos pasteurizados. Si bien la pasteurización permite rescatar leches de baja calidad microbiana, aporta muchas dificultades, ya que es imposible restablecer los equilibrios químicos y microbiológicos existentes en leches de buena calidad (Meinardi, 1994).

En la actualidad, los industriales queseros emplean en excelentes condiciones los siguientes fermentos seleccionados:

a-bacterias lácticas que acidifican, aromatizan o peptonizan la leche e, incluso modifican su viscosidad (fermentos filantes)

b-mohos que neutralizan la cuajada en los tipos de quesos de pasta blanda (*Penicillium candidum*, *Penicillium glaucum*)

c-bacterias alcalinizantes llamadas fermentos del rojo, en razón del color de sus colonias, que participan en la degradación de la caseína en la mayoría de los quesos.

d-bacterias propiónicas que atacan al lactato cálcico con producción de ácido propiónico y gas carbónico, responsable de la formación de los "ojos" o agujeros en los quesos de pasta cocida del tipo Gruyere (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

En el equilibrio que a diario se debe mantener en la industria entre la obtención de productos de buena calidad con un buen rendimiento y costo accesible para el mercado, surge como una ayuda conveniente y de difusión cada vez más amplia el empleo de starters seleccionados de laboratorio. Estos se hallan constituidos por varias cepas de bacterias lácticas con propiedades suficientemente estudiadas y probadas, de tal manera que una vez aisladas las cepas y constituido un cepario permiten obtener cultivos de características constantes y conocidas, que resultan óptimos para caracterizar una definida y

particular tecnología quesera para la obtención de un determinado tipo de queso.

Los cultivos seleccionados se presentan bajo la siguiente forma:

- a) Líquidos: de difícil conservación y normalmente utilizado para producciones pequeñas. El problema radica en que los cultivos líquidos al ser repicados en las diferentes fases: madre, intermedia e industrial, pueden sufrir sucesivas contaminaciones, si no se tienen los cuidados necesarios.
- b) Congelados: a -40°C ó -196°C , normalmente son cultivos concentrados y luego congelados en nitrógeno líquido. La masa se procesa obteniéndose pequeñas escamas que se conservan en sobres, inmersos en nitrógeno. Antes de la congelación se debe agregar un crioprotector, además hay que tener en cuenta que es necesario contar con una adecuada cadena de frío.
- c) Desecados: normalmente son cultivos liofilizados o dehidrocongelados. Se presentan en forma de polvo en concentraciones de 10^9UFC/g para cultivos semidirectos, con un repique, previo a la elaboración; o concentraciones de 10^{12}UFC/g para cultivos de inoculación directa en la tina (IDC). De los valores anteriores, se observa que debe haber una alta concentración previa a la liofilización, en la cual se agrega un crioprotector. El número de células vivas dependerá del punto en el cual se encuentre la fase reproductiva de la bacteria, al momento de la desecación.

Estos starters de inoculación directa permiten evitar el problema de desbalance entre las diferentes cepas que componen la combinación peculiar para cada queso. El problema que presentan es que la fase de adaptación e hidratación los torna un poco más lentos que el starter líquido, en la primer parte del ciclo de elaboración. La utilización de *starters deshidratados* y altamente concentrados para la inoculación directa de la leche en la tina para las distintas elaboraciones, contribuye a obtener confiabilidad en la producción, ya que se hallan libres de fagos y de contaminantes. Por ello, el trabajo con cultivos madre ya no es necesario (Zamboni, 1994).

Puede accederse a un starter de calidad constante si se utiliza un cultivo que es agregado directamente a la leche en proceso sin ninguna propagación previa, esto puede lograrse mediante la utilización de cultivos D.V.S. (inoculación directa en la tina), además este sistema permite acotar los riesgos

de ataque de fagos (Vindfeldt, Hansen's Laboratorium, 1994, Reinheimer, 1994).

Otro punto importante, es que para preparar un fermento se debe tener en cuenta su capacidad de acidificación, producción de sustancias aromáticas y también la capacidad proteolítica de las diferentes cepas de bacterias acidolácticas, y también la posibilidad de utilizar *fermentos mixtos*, integrados por dos o más especies bacterianas, tanto para la fabricación de quesos blandos, como semiblandos y duros.

Laulund, del Laboratorio Hansen, (1993) clasifica las bacterias ácido-lácticas, según su nombre antiguo y su nombre actual; haciendo incapié en la importancia de elegir el "starter" óptimo para la producción de productos fermentados. En la elaboración de quesos se usan fermentos *mesófilos* y *termófilos*.

Los fermentos mesófilos más usados son:

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*: queso Cheddar

Lactococcus lactis subsp. *lactis*: queso Cottage, manteca

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*: queso Continental (con ojos)

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* : manteca

Leuconostoc lactis: queso Cheddar, leche batida, manteca

En el grupo de los termófilos:

Streptococcus thermophilus: yogurt, queso Emmental.

Lactobacillus delbruekii subsp. *bulgaricus*: queso Mozzarella

Lactobacillus helveticus: queso Grana

Lactobacillus delbruekii subsp. *lactis*: queso Grana

En la elaboración de *quesos blandos* de superficie untuosa se emplean, además de bacterias acidolácticas, mohos (como por ej. *Penicillium roquefortii*, mohos blancos) y fermentos del rojo (para el Lettisch y otros quesos).

En aquellas variedades de quesos, en los que durante la elaboración se somete a la cuajada a una cocción a temperaturas elevadas, los fermentos utilizados deben ser necesariamente termoestables; a fin de garantizar que la cuajada alcance la acidez, firmeza y viscosidad adecuada y favorecer la

sinéresis, además de poseer una adecuada actividad proteolítica y capacidad de producir compuestos aromáticos.

Para lograr un queso de calidad invariable, se ha de prestar atención a la capacidad de las cepas utilizadas, de liberar los aminoácidos característicos de cada tipo de queso. Se ha comprobado que existe cierta relación entre la composición cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos libres y la calidad del queso.

Para las variedades de queso que sufren un proceso de cocción a no más de 40°C, el starter normalmente utilizado consiste en *L. lactis* y/o *L. cremoris*; para temperaturas mayores de cocción se utilizan *S. thermophilus* y/o *Lactobacillus*: *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

La proteólisis es, probablemente, el proceso bioquímico más importante que tiene lugar durante la maduración de la mayoría de los quesos, con un gran impacto sobre la textura y el flavor (P.F. Fox, 1989). El sistema *enzimático proteolítico del lactobacilo* consta de proteasas asociadas a la pared celular, las cuales degradan las proteínas de la leche, especialmente la caseína a péptidos y luego actúan peptidasas intracelulares, degradando los péptidos a aminoácidos. Estos son esenciales para el crecimiento del lactobacilo y además son importantes en la maduración de quesos, porque son los precursores de compuestos que otorgan el "flavor" a los quesos (Khalid y Marth, 1990).

La actividad proteolítica de *L. bulgaricus* sobre proteínas de la leche ha sido estudiada, principalmente con relación al rol que cumple en la maduración de quesos. Se ha demostrado la importancia de la actividad proteolítica para el crecimiento asociado de *L. bulgaricus* con *S. thermophilus*, en leche durante la elaboración de yogur (Chandan, Argyle, Mathison, 1982).

Ciertos lactobacilos pueden causar defectos, como la formación de cristales blancos de lactato de calcio, sobre la superficie de los quesos (Khalid y Marth, 1990).

Los starters bacterianos y otros microorganismos presentes en la cuajada mueren durante la maduración y se autolizan liberando al medio enzimas intracelulares, que van a actuar durante la maduración (Khalid y Marth, 1990).

El lactobacilo cumple un rol importantísimo durante el proceso de maduración de quesos, ya que el sabor en los quesos duros, se atribuye a cambios producidos por lactobacilos (*L. helveticus*, *L. bulgaricus*). Ellos son parte involucrada en la acidificación, proteólisis y contribuyen a la formación de compuestos que otorgan sabor a los quesos (Khalid y Marth, 1990).

Para la elaboración de quesos blandos se utilizan fermentos termófilos compuestos por distintas cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Las propiedades metabólicas del fermento contribuirán a determinar el flavor del producto final.

Entre las dos especies de bacterias lácticas que intervienen en el proceso de elaboración de un queso, se establece una especie de simbiosis; debido a que los metabolitos producidos por *L. bulgaricus* son utilizados por *S. thermophilus* y viceversa. Estos metabolitos desempeñan un papel importantísimo en el desarrollo de las características organolépticas de cada tipo de queso.

El lactobacilo, usado junto con el *S. thermophilus* y fermentos propiónicos, son utilizados para la elaboración de quesos de pasta semidura, con ojos o agujeros. La mayor contribución del lactobacilo es la producción de ácido láctico (Khalid y Marth, 1990).

La flora controlada en quesos ha aportado información valiosa sobre la influencia de las proteinasas del starter, en la degradación de caseína. Mucha información sobre la actividad proteolítica del *S. thermophilus* se ha obtenido partiendo de estudios nutricionales de éstos microorganismos. Las mismas proteinasas y peptidasas, aportadas por *S. thermophilus* durante su desarrollo, estaban involucradas en la producción de aminoácidos libres provenientes de la caseína. Estas proteinasas y peptidasas comenzaban a actuar durante el proceso de elaboración del queso, y continuaban haciéndolo durante el período de maduración (Grappin, Rank y Olson, 1985).

L. bulgaricus posee enzimas importantísimas para la proteólisis, como aminopeptidasas y carboxipeptidasas, por lo que se torna fundamental durante la maduración de quesos (Khalid y Marth, 1990).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de ésta Tesis se planteó en base a la problemática originada a raíz de la dificultad de los fermentos importados para adaptarse a nuestras leches y también a la dificultad de los pequeños productores para adquirir fermentos importados, por su alto costo. Teniendo en cuenta que los quesos de pasta blanda son los más consumidos y que dicho consumo tiene tendencia a aumentar, se decidió optimizar las condiciones de selección de pares de cepas para la formulación de fermentos, a base de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, normalmente utilizados para la elaboración de quesos de pasta blanda. Para realizar éste trabajo se contaba con diferentes cepas de estreptococos y lactobacilos termófilos, aislados previamente en el CIDCA a partir de productos naturales. Como durante el proceso de elaboración de quesos de pasta blanda la temperatura no supera los 32°C, se decidió estudiar en forma comparativa las características metabólicas y tecnológicas de pares de cepas de lactobacilos y estreptococos a 30 y a 44°C, siendo ésta última la temperatura óptima de desarrollo. Se planteó la siguiente metodología de trabajo:

- ✓ Se realizó un screening de cepas de lactobacilos y estreptococos en leche y en medio de cultivo; con la finalidad de descartar aquellas combinaciones de cepas inhibitorias y seleccionar pares de cepas entre los que se observe efecto sinérgico.
- ✓ Con las combinaciones de cepas previamente seleccionadas, se realizó un estudio de propiedades tecnológicas importantes, tales como: proteólisis, viscosidad, capacidad de acidificación y sinéresis de los coágulos.
- ✓ Con algunos de los pares de cepas estudiadas se fabricaron quesos tipo cuartirolo, para corroborar que los resultados obtenidos en laboratorio se repitieran durante la elaboración de quesos.

CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron seis cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y seis de *Streptococcus thermophilus*, aisladas en el CIDCA, y obtenidas del CERELA. En la tabla I se detalla su origen.

Cepas	Origen	Observaciones
<i>Streptococcus thermophilus</i>		
CP2 ó CIDCA 321*	fermento para yogur (lío-filizado)	aislada en el CIDCA**
CP3 ó CIDCA 322	fermento para yogur (líquido)	aislada en el CIDCA**
CP4 ó CIDCA 323	yogur comercial	aislada en el CIDCA**
CP5 ó CIDCA 324	fermento para yogur (lío-filizado)	aislada en el CIDCA**
CRL410	---	provista por CERELA
ATCC19258	---	provista por CERELA
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		
LBB (1) ó CIDCA 331*	fermento para yogur (líquido)	Aislada en el CIDCA***
LBP ó CIDCA 332	Fermento para queso (lío-filizado)	Aislada en el CIDCA****
LBR (1) ó CIDCA 333	Fermento para yogur (líquido)	aislada en el CIDCA***
LBA (1) ó CIDCA 334	Fermento para yogur (líquido)	aislada en el CIDCA***
LB1233 ó CIDCA 336	fermento industrial	aislada en el CIDCA****
ATCC 11842	--	provista por CERELA

Tabla I: Origen de las cepas utilizadas

* otros nombres utilizados.

** Pérez (1991), *** Abraham (1992) y ****de Urraza (1997).

CERELA: Centro de Referencia para Lactobacilos, Tucumán, Argentina.

ATCC (American Type Culture Collection)

(1) cepas aisladas a partir de un mismo producto.

Los criterios seguidos para la identificación de bacterias fueron el estudio de la morfología microscópica por medio de la coloración con Gram y azul de metileno, ensayo de catalasa, desarrollo en caldo a distintas temperaturas y pruebas de fermentación de azúcares (Sistema API, Bio Mérieux S.A., 69280 Marcy l' Etoile- France).

Los extendidos de las distintas cepas de lactobacilos coloreados con Gram presentan bacilos Gram positivos con morfología y agrupación característica. En los preparados teñidos con azul de metileno se observan bacilos cortos o largos dependiendo de la condición de crecimiento (Abraham, Tesis Doctoral, 1992).

Los extendidos de las distintas cepas de estreptococos coloreados con Gram presentan cocos pleomórficos Gram positivos en cadenas (Pérez, Tesis Doctoral, 1991).

Además, en las cepas aisladas se estudiaron otras características fenotípicas como presencia de catalasa (en todos los casos dio negativo), crecimiento a 45°C (en todos los casos resultó +) y coagulación de la leche a 37°C (también resultó +); (de Urraza, Tesis Doctoral, 1997).

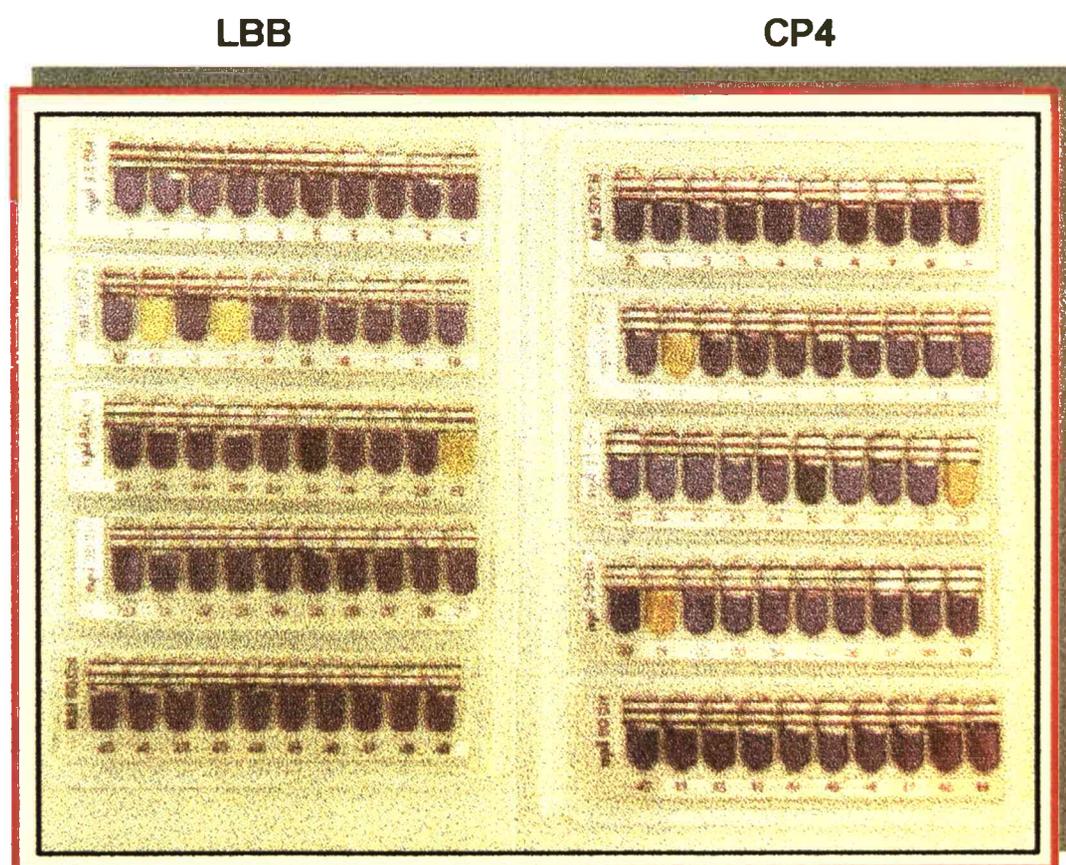


Figura I: Resultados obtenidos con el sistema API para las cepas LBB y CP4, al cabo de 48 horas de incubación a 37°C. Viraje del indicador al amarillo indica fermentación del azúcar (resultado positivo, numeración de azúcares según listado de tablas II A y B)

Tabla II-A: Perfil de fermentación de azúcares de lactobacilos.

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*						
Azúcar	LBB	LBP	LBR	LBA	LB1233	ATCC 11842
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-
Ribosa	-	-	-	-	-	-
D-Xilosa	-	-	-	-	-	-
L-Xilosa	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
β-Metil-xilósido	-	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	-	-
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa	-	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
α-Metil-D-manósido	-	-	-	-	-	-
α-Metil-D-glucósido	-	-	-	-	-	-
N-Acetil-glucosamina	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-
Melezitosa	-	-	-	-	-	-
D-Rafinosa	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-
Glucógeno	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	-	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-	-	-	-
D-Lixosa	-	-	-	-	-	-
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-

+ : indica fermentación del azúcar

*Abraham, 1992 y de Urraza, 1997.

Tabla II-B: Perfil de fermentación de azúcares por estreptococos.

Azúcar	<i>Streptococcus thermophilus</i> *					
	CP2	CP3	CP4	CP5	GRL410	ATCC 19258
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-
Ribosa	-	-	-	-	-	-
D-Xilosa	-	-	-	-	-	-
L-Xilosa	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
β-Metil-xilósido	-	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	-	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa	-	-	-	(+)	-	+
D-Manosa	-	-	-	(+)	-	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
α-Metil-D-manósido	-	-	-	-	-	-
α-Metil-D-glucósido	-	-	-	-	-	-
N-Acetil-glucosamina	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-
Melezitosa	-	-	-	-	-	-
D-Rafinosa	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-
Glucógeno	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	-	-	-	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-	-	-	-
D-Lixosa	-	-	-	-	-	-
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-

+: indica fermentación del azúcar

(+): indica resultado dudoso

* Pérez, Tesis Doctoral, 1991

Medios de cultivo utilizados:

✓ **Medio de Lee** (Lee y col., 1974).

triptona	10 g/l
extracto de levadura	10 g/l
lactosa	5 g/l
sacarosa	5 g/l
carbonato de calcio	3 g/l
fosfato ácido de dipotasio	0.5 g/l
púrpura de bromocresol	0.02 g/l
ágar	18 g/l

✓ **Medio 1.1.1.** (Pérez, 1991)

triptona	10 g/l
extracto de levadura	10 g/l
lactosa	10 g/l

En caso de ser necesario el medio sólido, se le agrega 1.5 % (p/v) de ágar.

✓ **Medio TPY** (Scardovi, V., 1986)

triptona	10 g/l
peptona de soja	5 g/l
glucosa	5 g/l
extracto de levadura	2.5 g/l
tween 80	1 ml/l
clorhidrato de cisteína	0.5 g/l
fosfato ácido de dipotasio	2 g/l
cloruro de magnesio (hexahidratado)	0.5 g/l
sulfato de zinc (heptahidratado)	0.25 g/l
cloruro de calcio	0.15 g/l

El medio sólido se preparó agregando 1.5% (p/v) de ágar.

✓ **Medio PCA** (Plate count agar)

triptona	5 g/l
extracto de levadura	2.5 g/l
glucosa	1 g/l
ágar	18 g/l

✓ **Medio YGC** (agar extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol)

extracto de levadura	5 g/l
glucosa	20 g/l
cloranfenicol	0.1 g/l
agar	14.9 g/l

Todos los medios se llevaron a pH= 7.2 ± 0.2 y se esterilizaron en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

✓ **Diluyente para recuentos:**

Triptona 1 g/l

Autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

✓ **Leche:** se utilizaron distintos tipos de leche, con distintos tratamientos térmicos: leche pasteurizada para la elaboración de quesos, leche UAT totalmente descremada (Parmalat, Bs. As, Argentina) y leche en polvo Difco (Detroit, USA); ésta última se disolvió en agua destilada (10 ó 12 g/l de agua) y se esterilizó por tindalización (3 tratamientos a 100°C).

✓ **Conservación de cepas:**

Las cepas se crecieron en leche Difco reconstituída, incubando a 37°C hasta un pH aproximado a 5. Luego se conservaron fraccionadas en criotubos a -80°C.

✓ **Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC/ml)**

Los recuentos de bacterias viables se realizaron sembrando distintas diluciones de las muestras en agar PCA (heterótrofos totales), 1.1.1 y Lee (recuento diferencial de lactobacilos y estreptococos). El recuento de hongos y levaduras se realizó en YGC. Las cajas de 1.1.1. y Lee se incubaron a 37°C durante 24-48 horas; las cajas de PCA e YGC se incubaron a 30°C durante 2 y 4 días, respectivamente.

PRIMERA PARTE

"Sinergismo y Antagonismo

entre distintas cepas de

Lactobacillus delbrueckii

subsp. *bulgaricus* y

***Streptococcus thermophilus*"**

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados y Discusión

Conclusiones

INTRODUCCION

Las bacterias ácido lácticas juegan un rol importante en la producción y conservación de alimentos, especialmente en la industria láctea. Para la elaboración de yogur y quesos de pasta blanda se utilizan fermentos mixtos compuestos por distintas cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*. Ambas especies, frecuentemente, presentan una relación protooperativa, en la cual se verifica un beneficio mutuo pero no imprescindible para ninguno de los dos microorganismos (Galeslout, Hassing and Veringa, 1968; Veringa, Galeslout and Daveelar, 1968; Driessen y col. 1982; Marshall and Law, 1984; Pérez and De Antoni, 1991; Giraffa, 1993; Beal and Corrieau, 1994; Carminatti, Giraffa, Gatti and Neviani, 1994).

Las enzimas proteolíticas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* degradan caseína, liberando aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular, los cuales han sido identificados como estimulantes para el crecimiento de *S. thermophilus* (Rajagopal and Sandine, 1990). El desarrollo del lactobacilo es estimulado a su vez por el dióxido de carbono y el ácido fórmico que produce el estreptococo.

Si bien la relación simbiótica entre ambas especies es conocida, no todas las cepas son compatibles; un desbalance en el crecimiento puede ocurrir ya que compiten por nutrientes esenciales, (Rajagopal and Sandine, 1990; Beal and Corrieu, 1994). En la elaboración de yoghurt de alta calidad, es importante mantener un balance adecuado entre cocos y bacilos. La relación óptima coco: bacilo es 1:1 para obtener buena calidad en el producto final (Mitchell and Sandine, 1984; Laulund, Hansen's Laboratorium, 1993).

Ha sido descrito en la literatura que debido al crecimiento asociado de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, la relación de producción de ácido láctico y crecimiento es mayor que lo que ocurre en cultivos puros; (Mitchell and Sandine, 1984; Khalid and Marth, 1990; Rajagopal and Sandine, 1990; Visser, 1993).

En cultivos mixtos las características de crecimiento revelaron un pronunciado estímulo para *S. thermophilus*. El predominio del coco ha sido demostrado,

mientras que el metabolismo de *L. bulgaricus* no era significativamente modificado (Beal, Spinnler and Corrieu, 1994).

En la formulación de fermentos mixtos es de fundamental importancia el estudio previo de interacción sinérgica y antagónica entre cepas. De éste modo, es posible descartar las combinaciones de cepas inhibitorias y seleccionar aquellos pares en los que se observe un efecto sinérgico.

Con respecto al efecto sinérgico entre cepas, uno de los parámetros importantes a tener en cuenta es la producción de ácido. La capacidad de un fermento de producir ácido láctico que se origina en el metabolismo de la lactosa, es uno de los principales criterios para la selección de un buen fermento para la elaboración de quesos. Este podría modificarse según las condiciones de elaboración y la interacción con otros microorganismos del fermento (Laulund, Hansen's Laboratorium, 1994).

Las características tecnológicas de un starter se determinan en base a la actividad acidificante, proteolítica, de producción de sustancias espesantes (en el caso de cepas destinadas a la preparación de leches fermentadas), de resistencia a los bacteriófagos y resistencia a la sal, (Salvadori, 1991).

La actividad proteolítica de los fermentos para yogur es una aptitud metabólica a ser considerada dado que la liberación de aminoácidos a partir de las caseínas, produce cambios que afectan la estructura del coágulo (Tamine y Robinson, 1985). Estos aminoácidos son esenciales para el crecimiento de *S. thermophilus* y a su vez son precursores de compuestos como acetaldheído, responsables del aroma del producto obtenido (Abraham, 1992).

Los estudios sobre la actividad proteolítica de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en cultivos mixtos, indican que estos microorganismos poseen proteasas y peptidasas que difieren en su localización celular y su especificidad por el sustrato. El estreptococo tiene mayor actividad peptidásica que el lactobacilo y escasa actividad proteásica. En cambio, el lactobacilo presenta una mayor actividad proteinásica localizada en la pared celular. Durante la fermentación láctica en la elaboración de yogur, las proteasas de *L. bulgaricus* hidrolizan las caseínas para dar péptidos que sirven de sustrato a las peptidasas de *S. thermophilus*, que liberan aminoácidos al medio (Abraham, 1992).

En la elección de las cepas se tiene en cuenta también su capacidad de desarrollo a las temperaturas de trabajo durante los ciclos tecnológicos de elaboración de los distintos productos, como las temperaturas de coagulación, de cocción, de almacenamiento y de maduración en los quesos, o a las temperaturas de acidificación y enfriamiento para las leches fermentadas; (Salvadori, 1991).

Para la elaboración de yogur la leche se fermenta a una temperatura entre 42 y 44°C (temperatura óptima para fermentos lácticos termófilos); mientras que para la elaboración de quesos de pasta blanda la temperatura utilizada es de 30-32°C (temperatura sub- óptima para éstos microorganismos). Por ello resulta fundamental, realizar el estudio de interacción sinérgica y antagónica entre cepas a las dos temperaturas.

Al utilizar cultivos mixtos para la elaboración de yogur se busca una mejora en las características reológicas del coágulo, que sea más viscoso y más resistente a la ruptura estructural. Por otro lado se busca mínima sobreacidificación y desuerado durante el almacenamiento. El rol de los polisacáridos en la manufactura de leches fermentadas y en particular de yogur está bien definido, ellos son esenciales para proporcionar buena textura y consistencia al coágulo. Numerosas cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* son capaces de producir polisacáridos. La composición del medio (fuentes de nitrógeno y carbono disponibles) y las condiciones de fermentación (temperatura y tiempo de incubación) afectan el rendimiento y composición de azúcares del polímero (J. Cerning, 1995).

Definición de parámetros básicos en reología: (Navarro, 1996)

Las características reológicas de los productos lácteos tienen gran importancia para la textura, estabilidad y diseño de procesos. La textura es considerada una de los cuatro factores de calidad de un alimento, siendo los demás el sabor, la apariencia y las características nutricionales.

La reología se define como el estudio de la deformación y flujo de la materia. Esta definición se puede expresar también como el estudio de la relación entre el esfuerzo aplicado a un material y la deformación que sufre dicho material. De ésta forma, si un material se deforma pero no fluye cuando se aplica un esfuerzo, se tiene un material sólido (elástico); en cambio si el

material fluye ante la aplicación de un esfuerzo muy pequeño, entonces se trata de un fluido (viscoso).

Las propiedades reológicas de los alimentos fluidos como la leche, se cuantifican a través de parámetros relacionados con diferentes características de los mismos. Estos parámetros son útiles en la solución de problemas relacionados a la obtención de un producto alimenticio como son:

- determinación de la estructura del alimento, incluyendo cambios fisicoquímicos que ocurren durante el proceso de elaboración y almacenamiento.
- control de calidad
- evaluación de la textura del mismo
- diseño de equipos y control de procesos.

Los parámetros básicos para el estudio de la reología son: *esfuerzo de corte* (τ) ó "shear stress", que relaciona la fuerza aplicada (F) y el área (A) de la superficie sobre la cual se aplica dicha fuerza y el *gradiente de velocidad o de deformación* del material ($\dot{\gamma}$ ó D), también llamado "shear rate", el cual se define como la velocidad de un elemento de fluido con respecto a la distancia.

Para un *fluido newtoniano* existe una proporcionalidad entre el esfuerzo de corte y la deformación, dada por:

$$\tau = \eta \cdot D$$

donde η es la viscosidad del sistema en Pa.s. Sólo tiene sentido hablar de viscosidad cuando se trata de fluidos newtonianos. Para aplicar un concepto similar para los no- newtonianos, es decir para aquellos que guardan una relación no lineal entre esfuerzo y deformación, se ha definido una *viscosidad aparente* de la siguiente forma:

$$\eta_{ap} = \frac{\tau}{D}$$

Es decir que para *fluidos no newtonianos* se debe expresar el valor de la viscosidad aparente indicando el gradiente de velocidad al cual fue medida. Dentro de este tipo de fluidos se clasifican los fluidos pseudoplásticos, es decir aquellos para los cuales la viscosidad aparente disminuye al incrementarse el gradiente de velocidad. En general, las emulsiones o dispersiones de

polímeros, cuando se encuentran en reposo presentan sus partículas (gotas o cadenas de polímeros) altamente desordenadas, ocasionando una gran resistencia interna al flujo que se traduce en una alta viscosidad. Al incrementar el gradiente de velocidad, las partículas que componen la fase dispersa se orientan en la dirección del flujo, fluyendo más fácilmente y disminuyendo así la viscosidad.

Muchos productos lácteos son materiales que poseen un comportamiento intermedio entre sólidos y fluidos y es por ello que se los clasifica como semisólidos o reológicamente como viscoelásticos, pues poseen tanto características viscosas como elásticas.

Otra característica de los fluidos no newtonianos es que sus propiedades reológicas cambian con el tiempo durante el cual se aplica un gradiente de velocidad o una deformación relativa constante. De esta forma, se puede decir que un material exhibe *tixotropía* cuando el esfuerzo de corte y también la viscosidad aparente disminuyen con el tiempo. Este fenómeno, que involucra cambios en la estructura del material, puede ser total o parcialmente reversible dependiendo del tiempo y condiciones en las cuales se recupera la estructura original. En el caso de que estos cambios sean irreversibles, ya no se puede hablar de tixotropía sino de *reomalaxis*, *reodestrucción* o *ruptura estructural*.

El modelo de Ostwald-de Waele o modelo de la ley de Potencia, representado por la siguiente ecuación:

$$\tau = k \cdot D^n$$

es el más utilizado para describir el comportamiento reológico de fluidos no newtonianos. τ es el esfuerzo de corte y D ó γ es el gradiente de velocidad, o sea la velocidad con que el material es deformado. El *índice de flujo* n representa la desviación del comportamiento respecto a fluidos newtonianos, para los cuales $n=1$. El valor de k da una idea sobre la consistencia del producto por lo que se denomina *índice de consistencia*. Si se aplican logaritmos a la ecuación, se obtiene una expresión de la forma:

$$\log \tau = \log k + n \log D$$

OBJETIVOS

Determinar la compatibilidad o incompatibilidad entre cepas de estreptococos y lactobacilos lácticos termófilos. Para ello se realizó un relevamiento de 12 cepas, en su mayoría aisladas en el CIDCA.

Se determinó:

♣ 1-si hubo efecto sinérgico ó antagónico entre distintas cepas de estreptococos y lactobacilos desarrollados en forma conjunta en leche y en medio de cultivo.

♣ 2-si el efecto sinérgico estuvo influenciado por la temperatura de crecimiento.

♣ 3-se seleccionaron combinaciones de cepas y se evaluaron las características tecnológicas de los cultivos desarrollados en leche.

El estudio se realizó a la temperatura óptima para bacterias lácticas termófilas (44°C) y a temperatura sub-óptima (30°C), en leche y en medio de cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Cepas utilizadas:

Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus (LBB, LBP, LBR, LBA, LB1233 y ATCC 11842).

Streptococcus thermophilus (CP2, CP3, CP4, CP5, CRL 410 y ATCC 19258).

En la tabla I y II (ver Generalidades) se detalla el origen de las cepas utilizadas.

Todas las cepas se conservaron congeladas a -80°C ; posteriormente, se reactivaron y desarrollaron en leche UAT.

Metodologías:

Interacción sinérgica y antagónica entre distintas cepas de lactobacilos y estreptococos.

La determinación de interacción sinérgica y antagónica entre cepas se realizó, utilizando 36 combinaciones de cepas de estreptococos y lactobacilos, mediante dos métodos diferentes:

* El primero fue una adaptación del **Método de Difusión en Agar** (Kociubinski, 1996), en el cual sobre una pátina de bacteria indicadora se depositaron gotas o spots de las bacterias potencialmente inhibitorias. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando todas las cepas de estreptococos y lactobacilos para la patina ó para la gota en forma alternativa.

* El segundo, se basó en la determinación de pH y Densidad Optica (DO) de cultivos monomicrobianos y mixtos desarrollados en leche e incubados a 30 y 44°C . Se compararon las características de crecimiento y acidificación en leche UAT (con 0% de materia grasa), de cultivos monomicrobianos y mixtos con un inóculo inicial de 10^7 UFC/ml. En el caso de cultivos mixtos se utilizó una relación coco: bacilo de 1:1, manteniendo la concentración inicial de bacterias de 10^7 UFC/ml.

Spot test:

Se reactivaron las cepas (congeladas a -80°C) en leche UAT a 37°C , luego se hizo un repique en medio TPY incubando a 44°C .

Sobre TPY agar (previamente secado) se colocó una pátina de la bacteria indicadora con un hisopo, luego se agregaron $7\ \mu\text{l}$ de cada una de las cepas en estudio, en forma de gota ó spot y se incubaron a 30 y 44°C . Conviene aclarar que todas las cepas utilizadas se hallaban en fase de crecimiento estacionaria temprana.

✓ *Crecimiento bacteriano en leche por recuentos de bacterias lácticas:* se utilizaron los medios diferenciales de Lee (1974) y 1.1.1 (Pérez, 1991). El medio de Lee contiene dos azúcares, lactosa y sacarosa, que son metabolizados por los estreptococos, mientras que los lactobacilos sólo fermentan lactosa. Por lo tanto, los primeros acidifican más el medio y viran el color del indicador púrpura de bromocresol de violeta al amarillo. El medio 1.1.1 permite también hacer recuento diferencial de estreptococos y lactobacilos por distinta morfología de colonias. En éste medio los estreptococos forman colonias elevadas y brillantes, de $1\ \text{mm}$ de diámetro; mientras que los lactobacilos forman colonias opacas y de bordes irregulares, de 1.5 a $2\ \text{mm}$ de diámetro.

✓ *Determinación de crecimiento bacteriano en leche por medida de DO a 480nm :*

La concentración de bacterias lácticas en leche se determinó a distintos tiempos de incubación por lecturas de absorbancia de las muestras diluidas $1/10$ en $\text{Na}_2\ \text{EDTA}$ (etiléndiamino-tetracético disódico) alcalino ($\text{pH}=12$) al 2% p/v. Con este tratamiento se disuelve el coágulo de caseínas, lo que permite determinar la turbidez debida a las bacterias presentes (Técnica de Kanasaki y col., 1975). Las lecturas de densidad óptica (D.O.) se realizaron a $480\ \text{nm}$, contra un blanco de leche tratado de igual manera que las muestras.

El efecto del crecimiento conjunto de distintas cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* en cultivos monomicrobianos y combinados en relación $1:1$ se expresó como diferencia de densidad óptica ($\Delta\text{DO} = \text{DO}_f - \text{DO}_i$

donde DO_f corresponde a la densidad óptica alcanzada por las muestras luego de incubar durante 6 y 24 horas a 44 y 30°C respectivamente; y DO_i corresponde a la densidad óptica inicial de las muestras, es decir de la leche más inóculo).

✓ Actividad acidificante:

Se determinó el pH de las muestras con un pHmetro con electrodo combinado de Calomel a 25°C.

El efecto del crecimiento conjunto de estreptococos y lactobacilos se expresó como diferencia de pH ($\Delta pH = pH_i - pH_f$, donde pH_i y pH_f corresponden el primero a leche más inóculo y el segundo al pH obtenido luego de incubar durante 6 horas a 44°C y 24 horas a 30°C).

✓ Actividad proteolítica: El Nitrógeno TCA Soluble fue determinado mediante la Técnica de Hull (1947); modificada por Citti y col. (1963). Esta técnica se basa en el hecho que las bacterias proteolíticas agregadas y/o presentes en la leche degradan la caseína en péptidos cortos. El ácido tricloroacético actúa como precipitante de las macromoléculas, de manera que en el sobrenadante quedan las moléculas de menor peso molecular, que serán los aminoácidos y péptidos pequeños, producto de la degradación producida por las proteasas de microorganismos proteolíticos. El nitrógeno TCA soluble se determina en el sobrenadante, mediante una reacción colorimétrica, utilizando reactivo de Folin y midiendo la absorbancia a 650nm. Con estos valores se entra en una curva de calibración (realizada con patrones de tirosina) y se expresa el nitrógeno como (mg tirosina / 100ml).

Se determinó la producción de nitrógeno soluble a tiempo cero (correspondiente a leche más inóculo) y luego de la incubación durante 24 horas a 30 y 44°C.

Características tecnológicas de cultivos monomicrobianos y mixtos.

Se compararon las características de crecimiento, acidificación, proteólisis, producción de suero y viscosidad de cultivos monomicrobianos y cultivos mixtos seleccionados.

✓ *Actividad acidificante:* evaluada como variación de pH de las muestras incubadas a 30 y 44°C durante 24 horas y posterior almacenamiento a 10°C durante 10 y 20 días.

✓ *Sinéresis:* se determinó el volumen de suero liberado espontáneamente, en μl cada 10 ml de cultivo. La producción de suero se midió con pipeta automática, antes y después del almacenamiento de los coágulos a 10°C durante 20 días.

✓ *Viscosidad:* se utilizó un viscosímetro rotacional HAAKE Rotovisco RV2 (Alemania), provisto de un sistema termostático y sensor de cilindros concéntricos del tipo NV. Las propiedades reológicas de coágulos de leche se determinaron a 30°C y se registró el torque obtenido (S) a velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) entre 0 y $512 \times 5.41 \text{ s}^{-1}$ en forma creciente durante 3 minutos, manteniendo constante a máxima velocidad durante 1 minuto y en forma decreciente, durante 3 minutos, con el mismo gradiente de velocidad.

Los valores de esfuerzo de corte (τ) y velocidad de corte ó gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$) fueron obtenidos a través de los correspondientes factores geométricos del viscosímetro:

Esfuerzo de corte, $\tau = A (\text{Pa} / \text{s.kt}) \times S = 1.66 \times S = (\text{Pa})$

Gradiente de velocidad, D ó $\dot{\gamma} = M (\text{min./seg.}) \times n (\text{r.p.m./ min}^{-1}) = 5.41 \times n = (\text{seg}^{-1})$

Donde A y M son constantes que dependen del tipo de sensor utilizado, n= velocidad del rotor y S= torque.

Se determinó la viscosidad aparente (η_{ap} , determinada como el cociente entre τ / D) a $\dot{\gamma} = 256 \times 5.41 \text{ seg}^{-1}$ y se expresó en milipascales por segundo (mPa x seg.).

Se obtuvieron las curvas de esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad para las muestras incubadas a 30 y a 44°C, durante 24 horas. Luego de la incubación, las muestras se almacenaron a 10°C, durante 20 días y nuevamente se determinó el comportamiento reológico de las muestras.

Efectos del agregado de sobrenadantes de cultivos de lactobacilos sobre la actividad metabólica y características tecnológicas de *S. thermophilus*:

✓ *Obtención de sobrenadantes de lactobacilos:*

Las cepas de lactobacilos se desarrollaron en leche hasta pH=5, se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos y luego se filtraron por membrana con un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore Waters Associates).

✓ *Efecto del agregado de sobrenadantes de lactobacilos a cultivos de estreptococos:*

Como primer paso, se realizaron cinéticas de pH utilizando distintas cantidades de sobrenadantes de lactobacilos, a fin de determinar la cantidad óptima de sobrenadante capaz de producir estímulo sobre la actividad acidificante del estreptococo.

Luego, para estudiar el efecto que produce el agregado de la cantidad óptima de sobrenadante de lactobacilo, sobre las características tecnológicas de cultivos de estreptococos, se realizaron experimentos en leche incubando a 30 y 44°C durante 24 horas y almacenando posteriormente las muestras a 10°C durante 20 días. Se determinaron los siguientes parámetros:

* capacidad acidificante, producción de suero y características reológicas de los coágulos a las 24 horas de incubación (utilizando la misma metodología que se detalló anteriormente).

* luego del almacenamiento se determinó: post- acidificación, sinéresis y cambios en la reología de los coágulos.

*producción de ácidos orgánicos: se determinó a tiempo cero (leche más inóculo), a las 6 y a las 24 horas de incubación. a 30 y 44°C, mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

✓ *Determinación de ácidos orgánicos por HPLC:*

Muestras:

Se inocularon 10 ml de leche con distintas cepas de *S. thermophilus* incubando a 30 y 44°C. Se tomaron muestras a tiempo cero, 6 y 24 horas, y se determinó la producción de ácidos orgánicos.

También se analizó la producción de ácidos por distintas cepas de estreptococos con el agregado de sobrenadantes de lactobacilos. Para ello se inocularon 10 ml de leche con 150 μ l de cada una de las cepas de *S. thermophilus* en estudio y 150 μ l de sobrenadantes de cultivos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (obtenidos según metodología detallada anteriormente). Paralelamente se realizaron determinaciones de crecimiento bacteriano por recuento de bacterias lácticas en agar diferencial de Lee y por medidas de densidad óptica a 480 nm. Se tomaron muestras a tiempo cero, 6 y 24 horas incubando a 30 y 44°C.

Para la preparación de las muestras, se compararon varios métodos, entre ellos el de Marsili y col. (1981), el de Bouzas y col. (1991), finalmente el elegido fue una adaptación del método propuesto por Bevilaqua y col. (1989) en el que se utilizó ácido sulfúrico 0.009N, como fase móvil.

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: se partió de 10ml de leche agregando ácido sulfúrico 0.009N para llevar a 50ml en matraz aforado, La extracción de los ácidos orgánicos se realizó agitando en un shaker Burrell (modelo 75, Burrell Scientific, Pittsburgh, PA, USA) durante 1 hora. Luego se centrifugó a 7000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante de cada muestra se filtró 2 veces (por papel de filtro y por membrana filtrante, Millipore Waters Associates, de 0.45 μ m de diámetro de poro) y finalmente se inyectaron en la columna 10 μ l de cada una de las muestras. La columna utilizada fue una de intercambio catiónico Aminex HPX 87H (Bio Rad Laboratories USA).

Se prepararon cinco soluciones estándar de ácido fórmico y láctico, en el rango de concentración: 0-1000 ppm; de ésta forma se obtuvieron las curvas de calibración correspondiente a los dos ácidos analizados.

Equipo:

Se utilizó un cromatógrafo de fase líquida (Waters Associates, Mildford M A) equipado con un automuestreador modelo 717, una unidad controladora modelo 600, un fotodetector con arreglo de diodos UV- visible modelo 996, un horno para columna construido en nuestro instituto, cuya temperatura se

fijó en 65°C y un adquisidor de datos M 730. El detector UV fue fijado en 214 ó 280 nm. La velocidad de flujo en el circuito del cromatógrafo fue de 0.7 ml min⁻¹. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 0.009N filtrada por membrana de 0.2µm (Millipore Waters Associates SMN 11306) y desgasificado por sonicación. La velocidad de flujo en el circuito del cromatógrafo fue de 0.7 ml min⁻¹.

RESULTADOS

Interacción sinérgica y antagónica entre distintas cepas de estreptococos y lactobacilos.

a- En medio de cultivo, incubando a 30 y 44°C:

Con el objeto de determinar si existen efectos sinérgicos o antagónicos entre cepas, se utilizó un método de "screening" rápido, el Spot Test, que evita los problemas ocasionados por la turbidez de la leche en los ensayos en medio líquido. Este método (basado en el Método de Difusión en agar, Kociubinski, 1996), consiste en depositar gotas de las sustancias y/o bacterias potencialmente inhibitorias, sobre una pátina de bacteria indicadora. El antagonismo entre cepas se visualiza como una zona de lisis en el lugar de la gota o un halo de inhibición alrededor de la misma. En el caso de no existir ningún tipo de interacción entre cepas se observa desarrollo normal tanto en la pátina de bacteria indicadora como en la zona donde se depositó la gota de bacteria potencialmente inhibitoria. Este ensayo permite además, evidenciar en forma cualitativa el sinergismo entre cepas, que se manifiesta por un incremento en el crecimiento en la zona de la gota, donde la cepa presente en la gota sería estimulada por la bacteria indicadora. En experimentos control, utilizando bacterias productoras de ácido en muy alta concentración y sustancias inhibitorias (fagos ó bacteriocinas), la inhibición se visualizó como una zona de lisis total en el lugar del spot o producción de un halo de inhibición alrededor de la gota o spot. Es importante destacar que cada cepa sobre sí misma (utilizada a la vez como indicadora y como inhibitoria) no produjo inhibición ni estimulación.

Se utilizaron seis cepas de lactobacilos y seis de estreptococos, empleando el lactobacilo como indicadora y el coco en forma de gota y luego invirtiendo el orden.

De las 72 combinaciones de cepas probadas no se detectó ningún caso de inhibición, es decir no hubo producción de halos ni zonas de lisis.

Las tablas 1-1 y 1-2 se confeccionaron en base a los resultados obtenidos

Sinergismo y Antagonismo

cuando éstos dos géneros fueron utilizados en forma de pátina y en forma de gota alternativamente, reuniendo los datos en una sola tabla, para cada una de las temperaturas de incubación empleadas.

Hubo combinaciones de cepas en las que el crecimiento estuvo favorecido en mayor o menor grado en la zona de la gota y otros casos en que no hubo estímulo.

CEPA	CP2		CP3		CP4		CP5		CRL 410		ATCC 19258	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
LBB	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
LBP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LBR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
LBA	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
LB1233	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ATCC 11842	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Tabla 1-1: Relevamiento en medio de cultivo (Spot Test), temperatura de incubación 30°C.

CEPA	CP2		CP3		CP4		CP5		CRL 410		ATCC 19258	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
LBB	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
LBP	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LBR	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
LBA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
LB1233	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
ATCC 11842	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-

Tabla 1-2: Relevamiento en medio de cultivo (Spot Test), temperatura de incubación 44°C.

Donde cada columna indica: *a* = pátina coco y gota del cultivo de bacilo
b = pátina bacilo y gota del cultivo de coco

Los signos indican: (-) crecimiento normal de la pátina en la zona de la gota
 (+) crecimiento favorecido de la pátina en la zona de la gota.

Analizando las *Tablas 1-1 y 1-2* se observa que:

Las zonas sombreadas corresponden a las combinaciones de cepas en las que el crecimiento estuvo favorecido (+) en los dos géneros. En otros casos sólo se observó estímulo en un sentido (zonas sin sombrear) y en otros no hubo ningún tipo de estímulo (-).

Como se observa en las tablas anteriores, a 30°C el efecto sinérgico producido por las distintas cepas de estreptococos y lactobacilos estuvo más delimitado a determinadas cepas; mientras que a 44°C el efecto fue más disperso, todas las cepas presentan el mismo número de casos en que estimulan y son estimuladas.

Los resultados indican que entre las cepas estudiadas existen lactobacilos y estreptococos fácilmente estimulables, hecho que estaría indicando que poseen alguna carencia que puede ser suplida por otras cepas. De la misma manera, se observa que algunas cepas poseen la capacidad de estimular indistintamente e inespecíficamente a diferentes bacterias.

Tanto cuando se incubó a 30 como a 44°C se obtuvieron 15 combinaciones de cepas en las que el crecimiento estuvo muy favorecido, es decir que hubo un gran estímulo entre cepas, tanto cuando los lactobacilos como los estreptococos fueron utilizados como bacteria indicadora (que corresponden a los parámetros *a* y *b* de las tablas 1-1- y 1-2- con signo + y sombreado). Cuando se incubó a 30°C hubo 10 combinaciones de cepas en que solamente se favoreció el crecimiento de uno de los géneros, mientras que a 44°C fueron 15 combinaciones (que corresponden en las tablas a uno de los parámetros, *a* ó *b* con signo + y zonas sin sombrear).

En el resto de las combinaciones de cepas no se vio favorecido el crecimiento de estreptococos y lactobacilos (*parámetros a y b de las tablas anteriores con signo -*)

Analizando el número de casos en que una cepa produjo estímulo sobre otra cepa y los casos en que fue estimulada, se puede concluir lo siguiente:

A 30°C, las cepas más estimulantes fueron: LBB, LBP, LBR, CP2, CP3 y CP4 y a su vez también fueron las más estimuladas.

El resto de las cepas fueron estimuladas en menor grado.

A 44°C, las cepas más estimulantes fueron: LBB, LBA, CP4 y CRL y las más

estimuladas LBB, LBP, CP3, CP4 y CRL.

El resto de las cepas fueron estimuladas en menor grado.

Es importante destacar que el medio de cultivo utilizado en estos ensayos (TPY) supuestamente posee todos los nutrientes necesarios para el crecimiento. Se podría pensar que el metabolismo microbiano produce otras sustancias capaces de estimular el crecimiento.

Además, cabe destacar que las distintas cepas de estreptococos y lactobacilos al momento de ser utilizadas se hallaban en la misma fase de crecimiento (estacionaria temprana), es decir se utilizaron cultivos con pH 5.0.

b- En leche, incubando a 30 y 44°C.

Luego del relevamiento rápido de cepas realizado en medio de cultivo (spot test), se utilizó leche como medio de crecimiento, ya que es el medio natural para el desarrollo de bacterias lácticas termófilas. Se compararon las características de crecimiento y acidificación de cultivos monomicrobianos y mixtos.

Las *tablas 1-3 y 1-4* presentan los valores de Δ pH y Δ DO correspondientes a cultivos monomicrobianos y mixtos, expresados como diferencia de pH y diferencia de densidad óptica, calculados en base a los datos obtenidos luego de incubar durante 6 horas a 44°C y 24 horas a 30°C, respecto al valor de pH y DO obtenido para la leche más inóculo (tiempo cero).

La primera fila y la primera columna muestran los valores correspondientes a los cultivos monomicrobianos de estreptococos y lactobacilos, mientras que las restantes filas y columnas muestran los valores correspondientes a los cultivos mixtos.

Comparando los valores obtenidos para cultivos mixtos respecto a los correspondientes cultivos monomicrobianos, se pueden dividir las combinaciones de cepas en tres grupos, de acuerdo al efecto sinérgico obtenido sobre el crecimiento. Dichos grupos son:

a)- *Efecto sinérgico importante* (diferencia de DO entre cultivo mixto y control entre 0.15 y 0.20), se obtuvo en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB+CP2, LBB+CP4, LBB+CP5, LBB+CRL

LBP+CP2, LBP+CP5.

CEPAS	CP2	CP3	CP4	CP5	CRL 410	ATCC 19258
	0.078±0.006	0.149±0.022	0.108±0.001	0.196±0.011	0.116±0.010	0.114±0.010
LBB	0.185±0.007	0.398±0.016	0.262±0.019	0.414±0.017	0.411±0.013	0.378±0.011
LBP	0.082±0.011	0.297±0.009	0.275±0.016	0.202±0.006	0.280±0.020	0.216±0.010
LBR	0.134±0.004	0.226±0.007	0.304±0.012	0.255±0.003	0.290±0.010	0.278±0.003
LBA	0.212±0.010	0.187±0.021	0.286±0.014	0.316±0.013	0.221±0.020	0.345±0.014
LB1233	0.197±0.005	0.199±0.007	0.250±0.030	0.241±0.013	0.238±0.015	0.272±0.009
ATCC 11842	0.248±0.008	0.23±0.007	0.305±0.015	0.402±0.010	0.194±0.008	0.340±0.013

Tabla 1-3-A: Crecimiento bacteriano de cultivos monomicrobianos y mixtos de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* subsp. *bulgaricus* a 30°C, determinado como: $\Delta DO = DO_{24h} - DO_{0h}$

Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

b)- Efecto sinérgico menor (diferencia de DO entre cultivo mixto y control entre 0.05 y 0.15), se obtuvo en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB+CP3, LBP+CP3, LBP+CP4, LBP+CRL, LBP+ATCC19258.

LBR en todas las combinaciones con estreptococos ensayadas,

LBA+CP3, LBA+CP4, LBA+CRL

LB1233+CP3 y LB1233+CRL.

ATCC11842+CP3, ATCC11842+CP4, ATCC11842+CRL,

ATCC11842+ATCC19258.

ATCC11842+ATCC19258.

c)- Efecto sinérgico nulo (diferencia de DO entre cultivo mixto y control menor a 0.05), se obtuvo en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB+ATCC19258

LBA+CP2, LBA+CP5, LBA+ATCC19258

LB1233 en combinación con CP2, CP4, CP5 y ATCC19258,

ATCC11842 en combinación con CP2 y CP5.

Sinergismo y Antagonismo

En la tabla 1-3-B, se comparan los valores de ΔpH para cultivos monomicrobianos y mixtos, correspondientes a las 24 horas de incubación a 30°C.

En todos los cultivos mixtos los valores de pH obtenidos fueron menores que en los correspondientes cultivos monomicrobianos.

De acuerdo al efecto estimulante observado sobre la actividad acidificante de cultivos mixtos, éstos se pueden dividir en dos grupos:

a)- *Efecto sinérgico importante* (diferencia de pH entre cultivo mixto y control mayor a 0.50), en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB+CP2, LBB+CP4, LBB+CP5, LBB+CRL

LBP+CP2, LBP+CP3, LBP+CP4, LBP+CP5 y LBP+CRL.

LBR+CP2, LBR+CP4.

CEPAS		CP2	CP3	CP4	CP5	CRL 410	ATCC 19258
		2.14±0.11	1.88±0.02	1.69±0.10	1.88±0.18	1.34±0.08	1.45±0.03
LBB	2.26±0.15	2.77±0.02	2.37±0.02	2.79±0.07	2.79±0.08	2.73±0.04	2.05±0.05
LBP	1.97±0.13	2.59±0.10	2.39±0.03	2.59±0.06	2.47±0.10	2.57±0.07	2.16±0.09
LBR	2.07±0.22	2.58±0.03	2.36±0.06	2.58±0.06	2.36±0.09	2.45±0.10	2.04±0.10
LBA	2.16±0.14	2.28±0.06	2.45±0.10	2.49±0.08	1.85±0.14	1.70±0.05	2.43±0.09
LB1233	2.33±0.03	2.37±0.15	2.44±0.09	2.32±0.10	2.36±0.08	2.35±0.07	2.28±0.07
ATCC 11842	2.27±0.02	2.35±0.10	2.24±0.01	2.32±0.10	1.79±0.09	1.96±0.09	2.41±0.10

Tabla 1-3-B: Actividad acidificante de cultivos monomicrobianos y mixtos de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* subsp. *bulgaricus* a 30°C, determinado como: $\Delta pH = pH_{0h} - pH_{24h}$.

Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

b)- *Efecto sinérgico nulo* (diferencia de pH entre cultivo mixto y control menor a 0.50), en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB+CP3, LBB+ATCC19258

LBP+ATCC19258

LBR+CP3, LBR+CP5, LBR+CRL, LBR+ATCC19258

LBA, LB1233 y ATCC11842 en todas las combinaciones de cepas

ensayadas.

Para la mayoría de las combinaciones de cepas de estreptococos y lactobacilos el efecto sinérgico se observó tanto sobre el pH como sobre la DO.

Surgen algunas discrepancias, al observar los valores detallados en las tablas anteriores, en los siguientes casos:

LBB+CP3, LBP+ATCC19258, LBR en combinación con CP3, CP5, CRL y ATCC19258, LBA+CP3, LBA+CP4, LBA+CRL, LB1233+CP3 y LB1233+CRL; ATCC11842+CP3, ATCC11842+CP4 y ATCC11842+CRL, donde se observó un leve estímulo en el crecimiento, pero no así en la actividad acidificante.

De igual manera, se estudió el efecto sinérgico entre cepas a 44°C. A ésta temperatura los cultivos a las 24 horas se hallan en fase de declinación o muerte, por ello se tomaron en cuenta para el análisis de resultados, los datos correspondientes a las 6 horas de incubación, en que las bacterias se hallan en fase de crecimiento estacionaria temprana.

En la tabla 1-4-A se observan los valores correspondientes a los incrementos de DO para cultivos monomicrobianos y mixtos, luego de incubar durante 6 horas a 44°C.

Comparando los valores obtenidos para cultivos mixtos respecto a los correspondientes cultivos monomicrobianos, se pueden dividir las combinaciones de cepas en tres grupos, de acuerdo al efecto sinérgico obtenido sobre el crecimiento. Dichos grupos son:

a)- *Efecto sinérgico importante* (diferencia de DO entre cultivo mixto y control entre 0.15 y 0.20), se obtuvo en las siguientes combinaciones de cepas:

LBP+CP2, LBP+CP4, , LBP+CP5, LBP+CRL

LBR+CP4

LBA+CRL, LBA+ATCC19258

LB1233+CRL y ATCC11842+CRL.

b)- *Efecto sinérgico menor* (diferencia de DO entre cultivo mixto y control entre 0.15 y 0.05), se obtuvo en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB+CP2, LBB+CP3, LBB+CRL

LBP+CP3, LBP+CRL y LBP+ATCC19258

LBR+CP3, LBR+CP5, LBR+CRL

LBA+CP2, LBA+CP3

LB1233+CP2, LB1233+CP5, LB1233+ATCC19258

ATCC11842 en combinación con CP2, CP3, CP5 y ATCC19258.

CEPAS		CP2	CP3	CP4	CP5	CRL 410	ATCC 19258
		0.514±0.006	0.104±0.016	0.527±0.002	0.520±0.008	0.379±0.006	0.437±0.004
LBB	0.444±0.013	0.614±0.010	0.546±0.001	0.555±0.010	0.480±0.009	0.523±0.013	0.422±0.007
LBP	0.286±0.012	0.736±0.004	0.431±0.007	0.681±0.006	0.737±0.013	0.560±0.015	0.523±0.009
LBR	0.278±0.100	0.511±0.010	0.436±0.004	0.778±0.010	0.670±0.011	0.528±0.012	0.411±0.010
LBA	0.219±0.004	0.578±0.008	0.352±0.003	0.189±0.005	0.510±0.009	0.726±0.006	0.620±0.004
LB1233	0.328±0.005	0.595±0.005	0.357±0.010	0.215±0.004	0.600±0.015	0.650±0.003	0.570±0.005
ATCC 11842	0.345±0.045	0.671±0.001	0.499±0.012	0.121±0.004	0.590±0.019	0.860±0.010	0.580±0.007

Tabla 1-4-A: Crecimiento bacteriano de cultivos monomicrobianos y mixtos de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* subsp. *bulgaricus* subsp. *bulgaricus* a 44°C, determinado como: $\Delta DO = DO_{6h} - DO_{0h}$

Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

c)- Efecto sinérgico nulo (diferencia de DO entre cultivo mixto y control menor a 0.05), se obtuvo en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB en combinación con CP4, CP5 y ATCC19258

LBR+CP2, LBR+ATCC19258

LBA+CP4, LBA+CP5

LB1233+CP3, LB1233+CP4, ATCC11842+CP4.

En la tabla 1-4-B, se comparan los valores de ΔpH para cultivos monomicrobianos y mixtos, correspondientes a las 6 horas de incubación a 44°C.

De acuerdo al efecto estimulante observado sobre la actividad acidificante de cultivos mixtos, éstos se pueden dividir en dos grupos:

a)- Efecto sinérgico importante (diferencia de pH entre cultivo mixto y control

mayor a 0.50), en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB+CP2, LBP+CP2, LBP+CRL

LBA en combinación con CP2, CP5 y CRL.

LB1233 en combinación con CP2, CP5 y CRL

ATCC11842 en combinación con CP2, CP5 y CRL

CEPAS		CP2	CP3	CP4	CP5	CRL 410	ATCC 19258
		1.70±0.055	1.08±0.08	2.02±0.07	2.18±0.04	1.51±0.02	1.75±0.04
LBB	1.73±0.03	2.36±0.06	1.81±0.06	2.13±0.10	2.32±0.04	2.16±0.05	1.77±0.07
LBP	1.51±0.03	2.29±0.07	1.69±0.06	2.19±0.09	2.28±0.05	2.17±0.05	1.66±0.04
LBR	1.13±0.03	2.12±0.05	1.51±0.05	2.08±0.06	2.28±0.06	1.93±0.03	1.62±0.10
LBA	1.82±0.10	2.54±0.04	1.93±0.03	1.95±0.05	2.91±0.05	2.88±0.06	1.95±0.01
LB1233	1.76±0.09	2.65±0.05	1.75±0.05	1.79±0.05	2.65±0.05	2.57±0.03	1.66±0.08
ATCC 11842	1.88±0.03	2.44±0.04	1.88±0.01	2.17±0.10	2.85±0.10	2.99±0.07	1.96±0.10

Tabla 1-4-B: Actividad acidificante de cultivos monomicrobianos y mixtos de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a 44°C, determinado como:

$$\Delta \text{pH} = \text{pH}_{0\text{h}} - \text{pH}_{6\text{h}}$$

Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

b)- Efecto sinérgico nulo (diferencia de pH entre cultivo mixto y control menor a 0.50), en las siguientes combinaciones de cepas:

LBB en combinación con CP3, CP4, CP5, CRL y ATCC19258

LBP en combinación con CP3, CP4, CP5 y ATCC19258

LBR en todas las combinaciones de cepas ensayadas.

LBA en combinación con CP3, CP4 y ATCC19258.

LB1233 en combinación con CP3, CP4 y ATCC19258

ATCC11842 en combinación con CP3, CP4 y ATCC19258.

En la mayoría de los casos el efecto sinérgico entre cepas se observó tanto en la actividad acidificante alcanzada por los cultivos, como en el crecimiento bacteriano. No obstante hubo algunas combinaciones de cepas, como el caso de CP3 combinada con LBB, LBP, LBR, LBA y ATCC11842, también CP4 en combinación con LBP y LBR, de igual forma ATCC19258 en combinación con LBP, LBA, LB1233 y ATCC11842; en las que se observó

efecto sinérgico entre cepas en cuanto al crecimiento pero no se correspondió con un efecto similar en la acidificación de cultivos mixtos.

Para la interpretación de los resultados es conveniente tener en cuenta que:

*para la realización de los ensayos se igualó la concentración inicial de bacterias en los cultivos monomicrobianos y mixtos y ambos se hallaban en la misma fase de crecimiento.

*Se midió DO para evitar errores en los valores de recuentos, debido a rupturas de cadenas.

*Si aumenta la DO tendría que disminuir el pH, pero puede que no suceda de ésta forma, tal sería el caso que predominara una cepa menos acidificante, como en general sucede con el estreptococo, que indicaría un efecto estimulante del lactobacilo sobre el estreptococo ó que los productos de proteólisis liberados produzcan un aumento de pH.

*Otro punto importante es que se tomaron muestras a distintos tiempos de incubación; cuando se realizó a 44°C se tomaron los datos a las 6 horas y 24 horas cuando la incubación se realizó a 30°C, ya que a dichos tiempos es cuando los cultivos entran en fase estacionaria temprana (pH igual ó menor a 5). No se tomaron las muestras a las 24 horas de incubación a ambas temperaturas, ya que a 44°C, se igualan el pH y la densidad óptica de los cultivos mixtos y los correspondientes cultivos monomicrobianos. Esto es lógico, ya que a las 6 horas de incubación, a temperatura óptima de crecimiento para bacterias lácticas termófilas (44°C) alcanzan una actividad metabólica importante (se hallan en fase de crecimiento exponencial); entonces a este tiempo de incubación sí pueden observarse las diferencias entre cultivos monomicrobianos y mixtos. Por otro lado, a temperatura subóptima (30°C) a las 6 horas de incubación las bacterias no han salido aún de la fase de latencia y por lo tanto necesitan mayor tiempo de incubación; entre las 20 y las 24 horas entran en fase de crecimiento exponencial y por lo tanto pueden observarse las diferencias entre cultivos monomicrobianos y mixtos.

Partiendo de los datos mostrados en las tablas (1- 3- A y B y 1- 4- A y B) y a

Sinergismo y Antagonismo

modo de resumen de resultados se realizaron las siguientes tablas, donde se analiza el efecto proto cooperativo entre cepas desarrolladas en leche a 30 y 44°C durante 6 y 24 horas, respectivamente:

CEPA	CP2		CP3		CP4		CP5		CRL		ATCC 19256	
	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO
LBB	+	+	-	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-
LBP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)
LBR	+	+	-	(+)	+	+	-	(+)	-	(+)	-	(+)
LBA	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-
LB1233	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-
ATCC 11842	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-

Tabla 1-5: Efecto proto cooperativo en leche entre cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* desarrolladas a 30°C.

CEPA	CP2		CP3		CP4		CP5		CRL		ATCC 19258	
	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO
LBB	+	+	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-
LBP	+	+	-	(+)	-	(+)	-	(+)	+	+	-	-
LBR	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-
LBA	+	+	-	(+)	-	-	(+)	-	+	+	-	(+)
LB1233	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	(+)
ATCC 11842	+	+	-	(+)	-	-	+	+	+	+	-	(+)

Tabla 1-6: Efecto proto cooperativo en leche entre cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* desarrolladas a 44°C.

Los resultados expuestos en las tablas 1-5 y 1-6 se obtuvieron de la siguiente forma:

$$\text{pH - : } \text{pH}_{\text{cultivo mixto}} - \text{pH}_{\text{cultivo monomicrobiano}} < 0.50$$

$$\text{DO - : } \text{DO}_{\text{cultivo mixto}} - \text{DO}_{\text{cultivo monomicrobiano}} < 0.05$$

$$\text{pH + : } \text{pH}_{\text{cultivo mixto}} - \text{pH}_{\text{cultivo monomicrobiano}} > 0.50$$

$$\text{DO + : } \text{DO}_{\text{cultivo mixto}} - \text{DO}_{\text{cultivo monomicrobiano}} > 0.15$$

$$\text{DO (+) : } 0.15 > \Delta \text{DO} > 0.05$$

En la zona sombreada se observan las combinaciones de cepas en las que

hubo efecto sinérgico en el crecimiento bacteriano y en la acidificación, respecto a los correspondientes cultivos monomicrobianos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, cuando se desarrollaron a 30 y a 44°C.

Los resultados mostrados como (+) corresponden a combinaciones de cepas en las que el efecto sinérgico observado fue poco marcado (ya que se observó solamente sobre la densidad óptica), y por lo tanto se tomaron como resultados dudosos.

Los resultados negativos corresponden a ausencia de efecto sinérgico entre cepas.

Análisis conjunto del relevamiento de cepas realizado en leche y en medio a 30 y 44°C:

Tomando como base para el análisis, los datos mostrados en las tablas 1-1 y 1-5 (relevamiento realizado en leche y en medio de cultivo a 30°C), se puede decir que sobre 36 combinaciones de cepas totales hubo:

-8 casos en que coincidieron totalmente los resultados obtenidos en leche y en medio de cultivo (significa que tanto en leche como en medio se observó sinergismo entre cepas).

-12 casos en que coincidieron parcialmente los resultados obtenidos en leche y en medio de cultivo (sólo se observó sinergismo sobre uno de los parámetros analizados).

-8 casos en que no hubo coincidencias (donde en leche se observó efecto sinérgico entre cepas, no así en medio de cultivo. El hecho de que en leche se vea el efecto sinérgico entre cepas y no en medio de cultivo es esperable, ya que en medio las bacterias disponen de todos los nutrientes necesarios).

-8 cultivos mixtos en que no se encontró efecto sinérgico entre cepas, tanto en leche como en medio de cultivo (significa parámetros a y b, de la tabla 1-1, con signo -, lo mismo que pH y DO de tabla 1-5).

A 30°C hubo un 55% de casos en que se observó efecto sinérgico, en mayor ó menor grado, tanto en leche como en medio de cultivo. Por otro lado, hubo un 22% de casos en que no se observó efecto sinérgico ni en leche ni en medio; lo que significa que el porcentaje total de resultados coincidentes fue 77.

Analizando de igual manera los datos obtenidos del relevamiento realizado en leche y en medio a 44°C (tablas 1-2 y 1-6), se puede decir que sobre un total de 36 combinaciones de cepas ensayadas, se encontraron:

-5 casos en que coincidieron totalmente los resultados obtenidos en leche y en medio de cultivo (significa que tanto en leche como en medio se observó sinergismo entre cepas).

-15 casos en que coincidieron parcialmente los resultados obtenidos en leche y en medio de cultivo (sólo se observó sinergismo sobre la DO ó sobre el pH).

-11 casos en que no hubo coincidencias (significa que en leche se observó efecto sinérgico entre cepas, no así en medio de cultivo. El hecho de que en leche se vea efecto sinérgico entre cepas y no en medio de cultivo es esperable, ya que en medio las bacterias disponen de todos los nutrientes necesarios).

-5 cultivos mixtos en que no se encontró efecto sinérgico entre cepas, tanto en leche como en medio (significa parámetros a y b, de la tabla 1-2, con signo -, lo mismo que pH y DO de tabla 1-6).

A 44°C hubo un 55% de casos en que se observó efecto sinérgico, en mayor ó menor grado, tanto en leche como en medio de cultivo. Por otro lado, hubo un 14% de casos en que no se observó efecto sinérgico ni en leche ni en medio; lo que significa que el porcentaje total de resultados coincidentes fue 69.

En los resultados expuestos anteriormente se observa que no necesariamente tienen que coincidir los resultados obtenidos del relevamiento realizado incubando a 30 y a 44°C. Por ello, para la fabricación de quesos de pasta blanda, la selección de pares de cepas para formular fermentos mixtos debe realizarse a 30°C. Mientras que para la elaboración de yogur, el relevamiento de cepas debe realizarse a 44°C.

c- Desarrollo bacteriano y características tecnológicas de cultivos mixtos y monomicrobianos.

Se formularon cultivos mixtos, en base a los resultados obtenidos del

relevamiento realizado en leche y en medio de cultivo. Las cepas seleccionadas fueron: LBB, LBP, LBR, CP2, CP3, CP4 y CP5.

Se compararon las características de crecimiento, acidificación, proteólisis, producción de suero y viscosidad de cultivos monomicrobianos y mixtos, seleccionados en base a los resultados previamente obtenidos. Los experimentos se realizaron incubando a 30 y 44°C durante 24 horas y posteriormente se determinó sinéresis, viscosidad y post-acidificación luego de almacenar las muestras a 10°C durante 20 días.

En la figura (1-1 A y B) se observan los datos referidos al crecimiento bacteriano, evaluado por recuentos diferenciales de estreptococos y lactobacilos en cultivos mixtos, luego de incubar a 30°C durante 24 horas.

Los resultados obtenidos muestran que los recuentos de lactobacilos en cultivos monomicrobianos fueron mayores ó iguales a los obtenidos en los correspondientes cultivos mixtos (figura 1-1-A).

Cuando se analizaron los recuentos de estreptococos, se observó que en cultivos monomicrobianos éstos fueron menores a los obtenidos en los correspondientes cultivos mixtos; a excepción de CP3 y CP5 en cultivo mixto con LBB y LBP (figura 1-1-B).

Estos resultados indican que en los cultivos mixtos en los que se observa efecto estimulante entre cepas en cuanto a crecimiento bacteriano (CP2 y CP4 combinados con LBB, LBP y LBR), el estímulo fue de los lactobacilos sobre los estreptococos; el crecimiento de éstos últimos podría estar estimulado por aminoácidos y péptidos producto de la actividad proteolítica de los lactobacilos.

Estos resultados concuerdan con los mostrados en la tabla 1-5, en que se evaluó el efecto protooperativo en leche entre distintas cepas de lactobacilos y estreptococos, luego de 24 horas de incubación a 30°C. Se observó un efecto sinérgico importante sobre el crecimiento entre CP2 y CP4 con LBB, LBP y LBR y en menor grado entre CP3 y CP5 con las anteriormente enumeradas cepas de lactobacilos.

Figura 1-1-A: Recuentos de lactobacilos en cultivos mixtos y monomicrobianos

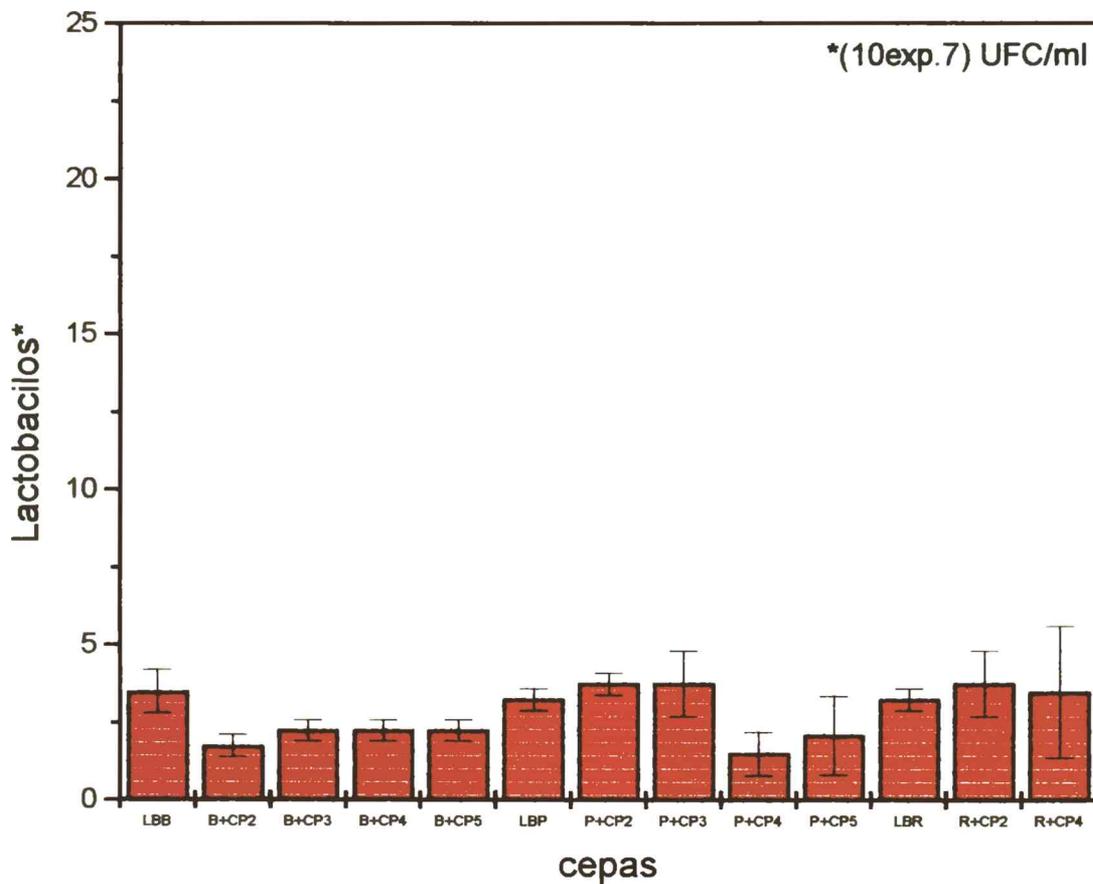
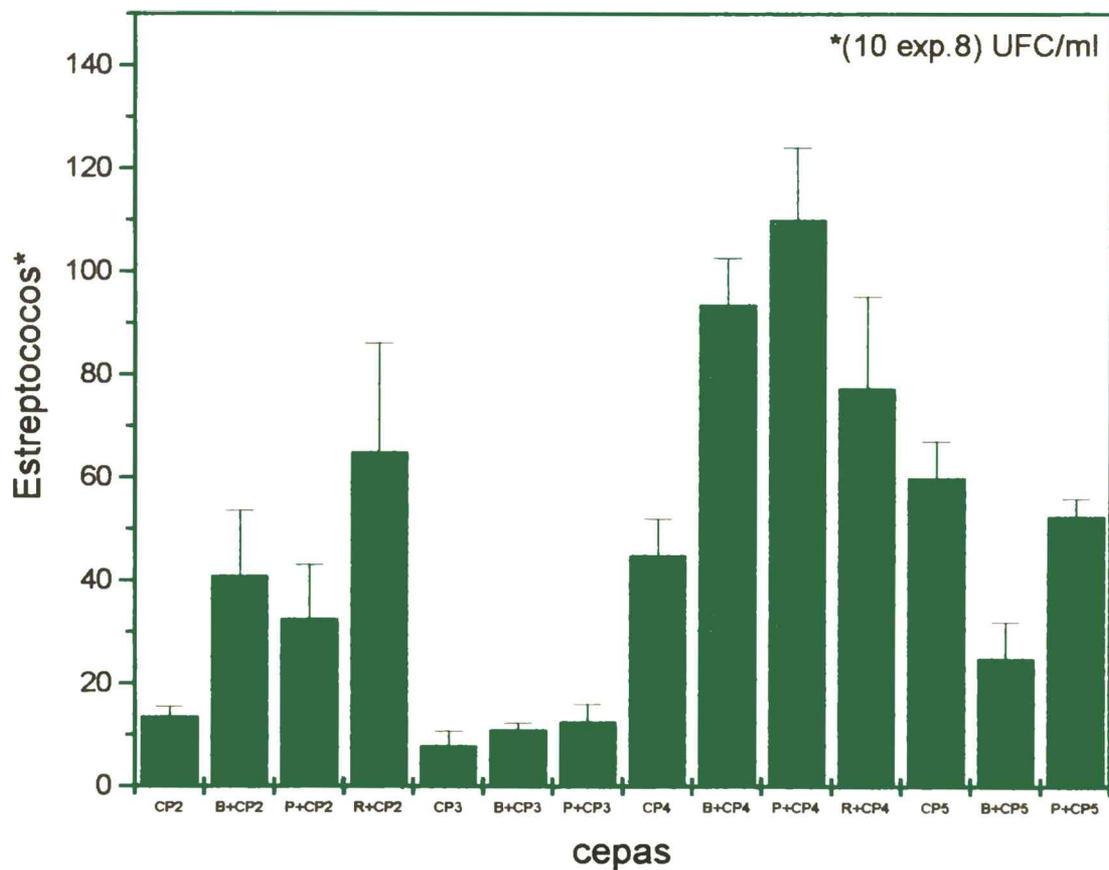


Figura 1-1-B: Recuentos de estreptococos en cultivos mixtos y monomicrobianos



Los fermentos monomicrobianos y mixtos (de las figuras 1-1-A y B) se desarrollaron en leche a 30°C/ 24 hs. y posteriormente se realizó recuento diferencial en medio de Lee.

Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

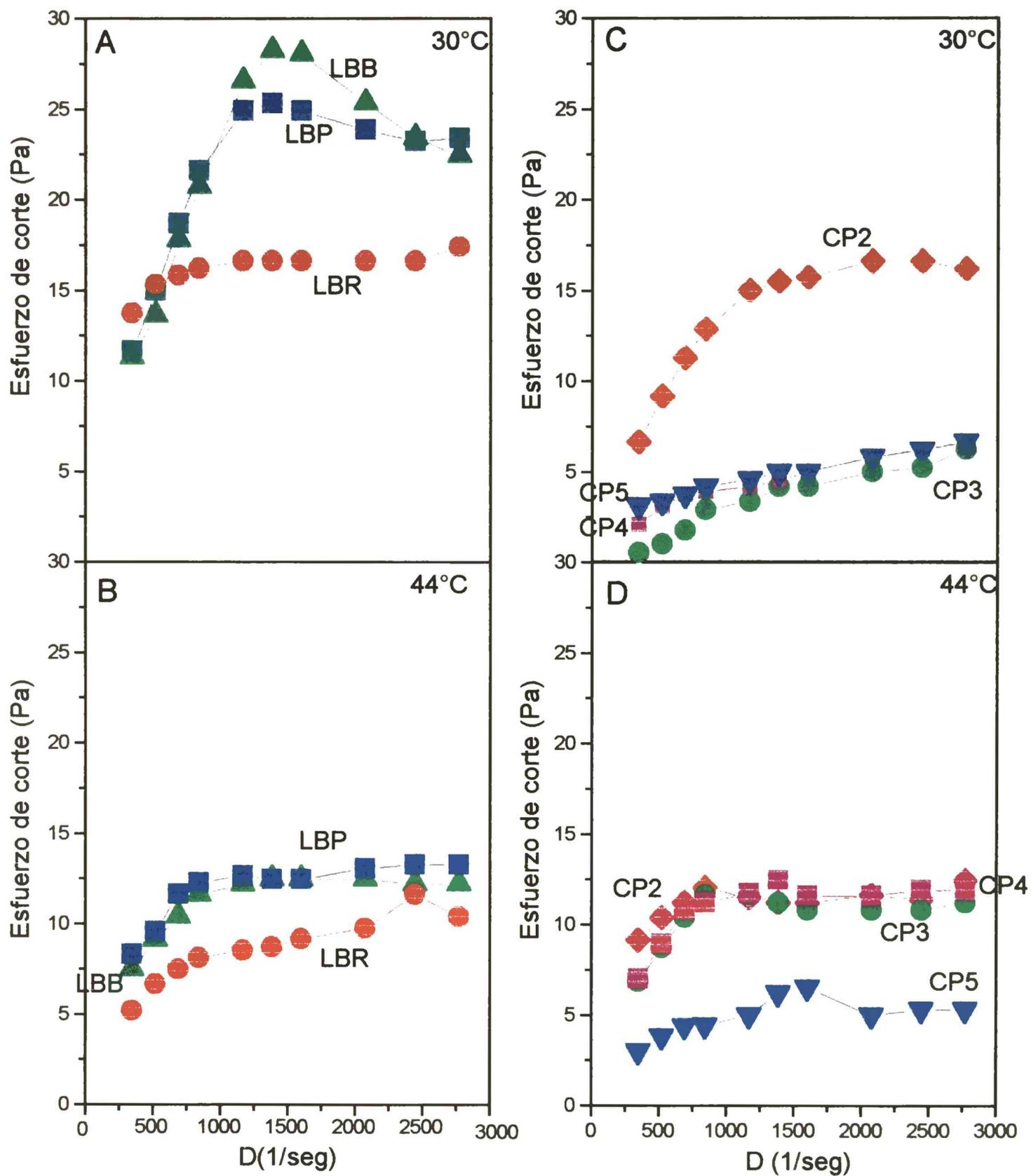
1- Características de coágulos de leche, obtenidos por incubación a 30 y 44°C durante 24 horas.

En la figura (1-2 A y B) se observa que los cultivos monomicrobianos de lactobacilos en leche mostraron un comportamiento reológico dependiente de la temperatura, esto significa que los cultivos desarrollados a 30°C fueron más resistentes a la ruptura estructural, con mayor carácter sólido, respecto a los cultivos desarrollados a 44°C; éstas diferencias no serían debidas a distintas estructuras de coágulos ocasionadas por diferencias en los pH, ya que todos los cultivos fueron cosechados con pH similares y aproximados a 5.0, pero sí podrían atribuirse a la presencia de cepas productoras de polisacáridos.

Se observaron diferencias significativas en los valores de esfuerzo de corte máximo ($\tau_{\text{máximo}}$) entre LBB y LBR respecto a LBP, cuando los cultivos se desarrollaron a 30°C. Sin embargo a 44°C no hubo diferencias en los valores de esfuerzo de corte (τ) obtenidos para las distintas cepas de lactobacilos (figura 1-2-A y B). El diferente comportamiento de las tres cepas de lactobacilos, respecto a la temperatura de incubación, podría atribuirse a que la producción de polisacáridos sería dependiente de la temperatura.

En la figura (1-2 C y D) se observa el comportamiento reológico de distintas cepas de estreptococos, cuando se desarrollaron a 30 y 44°C. La cepa CP2 presentó mejores características de textura cuando se desarrolló a 30°C; sin embargo, los coágulos obtenidos a partir de las cepas CP3 y CP4 mostraron mejores características reológicas cuando se incubaron a 44°C. La cepa CP5 no cambió sus características reológicas con la temperatura. En el caso de los estreptococos éstas diferencias en su comportamiento reológico tampoco podrían atribuirse a estructuras del coágulo pH dependientes ya que los cultivos bacterianos también se cosecharon con pH similares y aproximados a 5.0.

Figura 1-2: Comportamiento reológico de cultivos monomicrobianos de lactobacilos (A y B) y estreptococos (C y D), desarrollados a 30 y 44°C.



Los datos corresponden al promedio de triplicados obtenidos de cultivos independientes.

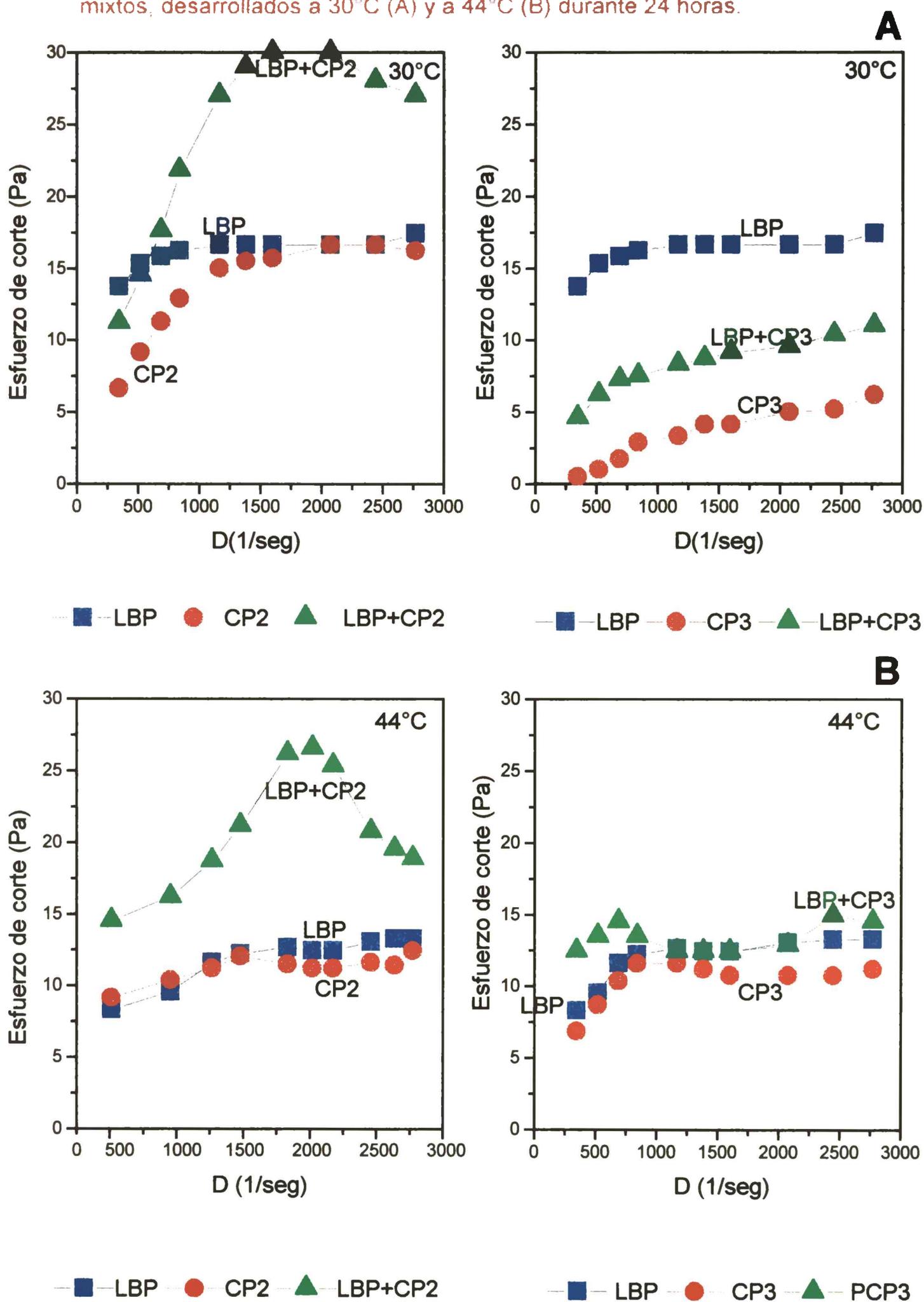
La figura (1-3 A y B) muestra el comportamiento reológico de cultivos monomicrobianos y mixtos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBP) y *S. thermophilus* (CP2 y CP3), desarrollados a 30 y 44°C durante 24 horas.

La combinación de cepas LBP+CP2 presentó un coágulo con mejores características de textura respecto a las obtenidas con los correspondientes cultivos monomicrobianos, esto se observó tanto cuando se incubó a 30 como a 44°C, evidenciándose así un efecto sinérgico importante en el comportamiento reológico.

Por el contrario, los coágulos obtenidos con la combinación de cepas LBP+CP3 no presentaron efecto sinérgico en su comportamiento reológico, tanto cuando se incubó a 30 como a 44°C.

Se observa que a 30°C el cultivo mixto LBP+CP3 presenta valores de τ menores a los obtenidos para LBP, mientras que a 44°C no hubo diferencias en los valores de esfuerzo de corte obtenidos para el cultivo mixto LBP+CP3 y los correspondientes cultivos monomicrobianos.

Figura 1-3 (A y B): Esfuerzo de corte de cultivos monomicrobianos y mixtos, desarrollados a 30°C (A) y a 44°C (B) durante 24 horas.



Los datos corresponden al promedio de triplicados obtenidos de cultivos independientes

Las características reológicas y acidificantes de la totalidad de las cepas estudiadas, se presentan en las tablas 1-7-A y 1-8:

Cepa	30°C		44°C	
	pH del* coágulo	Viscosidad** aparente (η_{ap})	pH del* coágulo	Viscosidad** aparente (η_{ap})
L. bulgaricus				
LBB	4.57± 0.15	16.80± 1.40	4.55± 0.48	9.37± 0.37
LBP	4.80± 0.07	11.00± 1.00	4.58± 0.49	9.50± 0.50
LBR	4.75± 0.04	7.62± 0.62	4.58± 0.41	5.88± 0.40
S. thermophilus				
CP2	4.64± 0.07	10.20± 2.20	4.48± 0.42	8.68± 1.66
CP3	5.17± 0.04	3.23± 0.23	4.71± 0.48	7.12± 0.37
CP4	5.08± 0.18	5.80± 0.80	4.40± 0.60	7.96± 1.04
CP5	4.92± 0.05	4.08± 1.33	4.44± 0.64	4.48± 0.28
Cultivos mixtos				
LBB+CP2	4.03± 0.20	28.00± 3.00	4.05±0.22	15.50± 1.40
LBB+CP3	4.15± 0.07	4.80± 0.43	4.05±0.15	7.35± 0.15
LBB+CP4	3.97± 0.16	7.14± 0.29	4.13±0.23	9.30± 0.30
LBB+CP5	4.01± 0.16	5.15± 0.60	4.41±0.56	4.86± 0.77
LBP+CP2	4.14± 0.12	19.00± 2.00	4.15±0.35	17.70± 1.65
LBP+CP3	4.18± 0.04	5.65± 0.65	4.13±0.21	8.41± 0.58
LBP+CP4	4.10± 0.04	5.90± 0.70	4.04±0.27	8.69± 0.90
LBP+CP5	4.17± 0.04	5.77± 0.52	4.37±0.62	5.06± 0.60
LBR+CP2	4.15± 0.08	19.25± 2.55	4.11±0.29	10.00± 0.70
LBR+CP4	4.64± 0.25	4.60± 0.20	4.20±0.48	11.69± 0.80

Tabla 1-7-A: pH y viscosidad aparente (en mPa.seg) a $\gamma = 256 \times 5.41 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ para cultivos monomicrobianos y mixtos, desarrollados a 30 y 44°C durante 24 horas.

*Los valores de pH corresponden al promedio de dos valores obtenidos en un experimento.

** Los valores de viscosidad aparente (calculados como el cociente entre el esfuerzo de corte y el gradiente de velocidad o de deformación, $\eta_{ap} = \tau / D$, corresponden al promedio de al menos tres valores obtenidos de cultivos independientes y fueron obtenidos a partir de las curvas de esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad.

Se observa que la actividad acidificante fue mayor en todos los cultivos mixtos, respecto a los correspondientes cultivos monomicrobianos. Los cultivos monomicrobianos de estreptococos, presentaron menor ó igual actividad acidificante que los cultivos de lactobacilos, éstos resultados se obtuvieron tanto cuando se incubó a 30 como a 44°C.

Las leches fermentadas con cultivos mixtos compuestos por LBB+CP2,

LBP+CP2 y *LBR+CP2* presentaron un incremento en la viscosidad aparente respecto a los correspondientes cultivos monomicrobianos, a las dos temperaturas de incubación ensayadas.

La viscosidad del resto de los cultivos mixtos no mejoró, respecto a la obtenida con los correspondientes cultivos monomicrobianos, cuando se incubó a 30°C. A 44°C se obtuvieron iguales resultados, a excepción de *LBR+CP4* en el que la viscosidad mejoró respecto a la de los respectivos cultivos monomicrobianos, pero el efecto sinérgico fue menos significativo respecto al presentado por *LBB+CP2*, *LBP+CP2* y *LBR+CP2*.

En algunos casos, se observó una disminución de la viscosidad aparente en cultivos mixtos respecto a los cultivos monomicrobianos de lactobacilos, cuando se incubó a 30°C.

Analizando las viscosidades aparentes se observa que el comportamiento de flujo de todos los coágulos es *pseudoplástico*, es decir que el índice de flujo (n) de la Ley de la Potencia es menor que 1. Por otro lado se observó en los coágulos una disminución de la viscosidad aparente al incrementar el gradiente de velocidad, dicha disminución en la viscosidad durante el minuto en que se mantiene el sistema a velocidad de deformación constante, daría lugar a que se considerara a éstos sistemas como tixotrópicos. Sin embargo como dicho cambio fue irreversible, no puede considerarse como tixotropía sino como ruptura estructural.

Contenido de Nitrógeno TCA-soluble en cultivos monomicrobianos y mixtos, después de 24 horas de incubación a 30°C:

En lo que se refiere a la actividad proteolítica, evaluada como nitrógeno TCA-soluble (mg tirosina /100ml de leche), hubo diferencias entre cultivos monomicrobianos y mixtos, pero resulta difícil evaluar dichas diferencias ya que durante el desarrollo de los coágulos hay producción y también consumo de aminoácidos y péptidos pequeños. Se vio que el Δ Nitrógeno TCA-soluble, (es decir la diferencia entre el contenido de nitrógeno soluble alcanzado por los cultivos a las 24 horas de incubación, respecto al contenido de nitrógeno de la leche + inóculo a tiempo cero) era mayor en las combinaciones de lactobacilos (*LBB* y *LBP*) con *CP3* y *CP5*. Estos datos se correlacionan con una ausencia de estímulo en el crecimiento de los

estreptococos en cultivos mixtos (figura 1-1-B). Esto significaría que al haber menor número de estreptococos el consumo de aminoácidos y péptidos sería menor y por lo tanto mayor el Δ Nitrógeno TCA-soluble (tabla 1-7-B).

Cepas	Nit.TCA-soluble (mg tir./100ml)	Cepas	Nit.TCA-soluble (mg tir./100ml)
<i>L. bulgaricus</i>		Cultivos mixtos	
LBB	5.50± 1.00	LBB+CP2	5.10± 0.55
LBP	5.40± 0.70	LBB+CP3	7.90± 1.00
LBR	5.80± 0.60	LBB+CP4	5.00± 0.65
<i>S. thermophilus</i>		LBB+CP5	6.50± 0.25
CP2	3.20± 0.40	LBP+CP2	5.20± 0.48
CP3	4.70± 0.85	LBP+CP3	7.00± 0.35
CP4	5.50± 0.70	LBP+CP4	6.00± 0.45
CP5	4.00± 0.50	LBP+CP5	6.55± 0.22
--	--	LBR+CP2	6.00± 0.55
--	--	LBR+CP4	7.40± 0.95
--	--		

Tabla 1-7-B: Producción de nitrógeno TCA-soluble por estreptococos y lactobacilos luego de incubar 24 hs. a 30°C.

Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

2- Características de los coágulos de leche luego del almacenamiento a 10°C durante 20 días.

La post-acidificación de los cultivos monomicrobianos de lactobacilos y estreptococos, como así también de los cultivos mixtos fue en general mayor a 30°C que a 44°C, en algunos casos resultó equivalente para ambas temperaturas de incubación (tabla 1-8).

No se observaron diferencias significativas en la post-acidificación alcanzada durante el almacenamiento, por cultivos mixtos y monomicrobianos cuando se desarrollaron a 30°C. A excepción de las siguientes combinaciones: LBB+CP4, LBP+ CP4 y LBR+ CP4, en que la post- acidificación fue mayor. Cuando los cultivos se desarrollaron a 44°C, la post-acidificación en todos los cultivos mixtos fue mayor que en los correspondientes cultivos

monomicrobianos de lactobacilos, pero menor a la obtenida con los correspondientes cultivos de estreptococos.

Cepa	30°C		44°C	
	post-acidificación (pH _c - pH ₂₀)	Sinéresis (μl / 10ml) 20 días	post-acidificación (pH _c - pH ₂₀)	Sinéresis (μl / 10ml) 20 días
L. bulgaricus				
LBB	0.63±0.19	75±25	0.08±0.02	400±100
LBP	0.35±0.07	1350±150	0.19±0.01	1000±200
LBR	0.87±0.37	2500±500	0.12±0.05	400±150
S. thermophilus				
CP2	0.40±0.13	100±50	0.41±0.02	100±25
CP3	0.56±0.19	3500±1500	0.18±0.02	1500±500
CP4	0.78±0.11	150±10	0.45±0.01	75±25
CP5	0.51±0.05	900±200	0.59±0.01	200±50
Cultivos mixtos				
LBB+CP2	0.36±0.08	75±25	0.21±0.02	25±25
LBB+CP3	0.38±0.02	550±50	0.22±0.02	300±50
LBB+CP4	1.16±0.23	500±50	0.31±0.03	50±25
LBB+CP5	0.42±0.05	400±100	0.37±0.03	100±25
LBP+CP2	0.40±0.01	75±25	0.27±0.02	20±10
LBP+CP3	0.41±0.03	550±50	0.29±0.01	300±50
LBP+CP4	1.09±0.13	200±30	0.37±0.03	150±50
LBP+CP5	0.41±0.02	225±75	0.48±0.02	150±25
LBR+CP2	0.31±0.05	50±10	0.30±0.03	75±25
LBR+CP4	0.91±0.04	400±100	0.67±0.13	100±50

Tabla 1-8: Características de coágulos de leche luego del almacenamiento a 10°C durante 20 días.

pH_c = pH del coágulo luego de 24 horas de incubación.

pH₂₀ = pH del coágulo almacenado a 10°C durante 20 días.

*Los valores de post-acidificación y sinéresis de los coágulos corresponden al promedio de dos valores obtenidos en un experimento

En cuanto a la sinéresis, hubo diferencias importantes entre las cepas. Los cultivos monomicrobianos de LBP, LBR, CP3 y CP5 desarrollados a 30°C presentaron mayor sinéresis post- almacenamiento; la cual disminuyó al utilizar cultivos mixtos. De igual manera sucedió con LBP y CP3 cuando se desarrollaron a 44°C.

Al agregar CP2 a cultivos de lactobacilos (LBP y LBR) mejoraron las características de excesivo desuerado durante el almacenamiento.

Sinergismo y Antagonismo

En todos los cultivos mixtos mejoraron las características al disminuir el desuerado durante el almacenamiento, respecto a los cultivos monomicrobianos (tabla 1-8).

Características reológicas de los coágulos luego del almacenamiento a 10°C.

En la tabla 1-8-B se observan los datos obtenidos en cuanto a las características reológicas de los coágulos luego del almacenamiento a 10°C durante 20 días.

Cepas	Viscosidad aparente (η_{ap})		Cepas	Viscosidad aparente (η_{ap})	
	30°C	44°C		30°C	44°C
<i>L. bulgaricus</i>			Cultivos mixtos		
LBB	10.90±0.45	7.47±0.56	LBB+CP2	12.20±1.20	5.75±2.00
LBP	10.00±0.78	7.50±0.90	LBB+CP3	6.00±0.98	4.50±0.70
LBR	6.57±0.32	5.50±0.50	LBB+CP4	6.50±0.50	8.77±0.65
<i>S. thermophilus</i>			LBB+CP5	6.06±0.19	5.38±0.55
CP2	3.12±0.45	3.48±0.35	LBP+CP2	4.00±1.00	8.25±0.80
CP3	2.50±0.23	4.00±0.40	LBP+CP3	4.56±0.81	6.62±0.51
CP4	8.12±1.00	9.50±1.50	LBP+CP4	4.66±0.87	7.59±0.69
CP5	3.00±0.50	3.61±0.48	LBP+CP5	7.00±0.50	6.08±0.88
--	--	--	LBR+CP2	8.57±0.17	7.75±0.64
--	--	--	LBR+CP4	5.12±0.45	10.3±1.55
--	--	--			

Tabla 1-8-B: Viscosidad aparente (en mPa.seg) a $\dot{\gamma}=256 \times 5.41 \text{seg}^{-1}$ de cultivos monomicrobianos y mixtos luego del almacenamiento a 10°C durante 20 días.

** Los valores de viscosidad aparente (calculados como el cociente entre el esfuerzo de corte y el gradiente de velocidad o de deformación, $\eta_{ap} = \tau / D$, corresponden al promedio de al menos tres valores obtenidos de cultivos independientes y fueron obtenidos a partir de las curvas de esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad.

Se observa que en general, luego del almacenamiento, disminuyó la viscosidad de los coágulos obtenidos a partir de cultivos monomicrobianos y mixtos, respecto a los datos mostrados en la tabla 1-7-A, para los coágulos

luego de 24 horas de incubación. Las combinaciones de cepas LBB+CP2, LBP+CP2 y LBR+CP2 cuyos coágulos habían presentado características de textura muy buenas (tabla 1-7-A), las perdieron luego del almacenamiento. En algunos cultivos la textura no se modificó luego del almacenamiento.

Luego de analizar la interacción sinérgica y antagónica entre cepas de lactobacilos y estreptococos, seleccionadas en base a un relevamiento realizado en leche y en medio de cultivo, donde se evaluó el crecimiento bacteriano, la actividad proteolítica y propiedades tecnológicas de cultivos monomicrobianos y mixtos, los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera:

Hubo pequeñas diferencias en cuanto a la actividad acidificante y proteolítica alcanzada por los coágulos obtenidos a partir de cultivos monomicrobianos y mixtos. Sin embargo, las mayores diferencias se obtuvieron al evaluar las *características reológicas* de los coágulos luego de incubar durante 24 horas a 30 y 44°C y a *nivel de liberación de suero* luego del almacenamiento. Se encontró que ciertos cultivos mixtos, como LBB+CP2, LBP+CP2 y LBR+CP2 presentaron coágulos más viscosos, con mínima post-acidificación y sinéresis durante el almacenamiento, mientras que otros cultivos mixtos presentaron baja viscosidad, mayor post-acidificación y desuerado durante el almacenamiento.

También se obtuvieron diferencias importantes en los recuentos alcanzados por algunas cepas de estreptococos en cultivos mixtos, respecto a los correspondientes cultivos monomicrobianos. Estos resultados indican que el crecimiento de los estreptococos podría estar estimulado por aminoácidos y péptidos originados a partir de la actividad proteolítica desarrollada por los lactobacilos en cultivos mixtos.

Efectos del agregado de sobrenadantes de cultivos de lactobacilos sobre la actividad metabólica, crecimiento y características tecnológicas de cultivos de *S. thermophilus*.

a)- Efecto sobre la actividad acidificante:

En los resultados anteriormente expuestos, se vio que el efecto protocooperativo en todos los cultivos mixtos analizados, se dio como un estímulo en el crecimiento de los estreptococos a expensas de los lactobacilos (figura 1-1- A y B). Dado que los productos del metabolismo del lactobacilo permanecen en el medio, luego de separar las bacterias por centrifugación, se decidió utilizar sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de lactobacilos, para realizar experimentos similares a los realizados con cultivos mixtos de lactobacilos y estreptococos.

Por centrifugación, se separó la masa bacteriana, de modo que en el sobrenadante quedaron entre otros, los productos de la actividad proteolítica de los lactobacilos. De esta manera se pudo analizar el estímulo que producían los productos del metabolismo de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sobre los estreptococos, e independizarse de la presencia de los lactobacilos.

Se probaron distintas cantidades de sobrenadantes de cultivos de lactobacilos, a fin de determinar si había una cantidad óptima que produjera máximo efecto estimulante sobre la actividad acidificante de los estreptococos.

Se encontró que el agregado de sobrenadantes de lactobacilos no producía un efecto importante ó marcado sobre la acidificación producida por los estreptococos; esto quiere decir que los valores de pH alcanzados por los cultivos con y sin agregado de diferentes cantidades de sobrenadantes fueron similares.

En todos los casos la diferencia entre los Δ pH de cultivos monomicrobianos y cultivos con agregado de sobrenadantes no fue mayor a 0.20 tanto a 30, a 37 como a 44°C, cualquiera fuera la cantidad de sobrenadante de lactobacilo agregada a los cultivos de estreptococos.

b)- Efecto sobre el crecimiento bacteriano y producción de ácidos orgánicos:

En primer lugar se realizaron cinéticas de producción de ácidos fórmico y láctico en leche, por cultivos de estreptococos, incubando a 30 y 44°C. Las cepas de estreptococos analizadas fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos del relevamiento de cepas realizado en leche y en medio (CP2, CP3, CP4 y CP5). Se inocularon 10 ml de leche con 150 µl de cultivo de las distintas cepas de estreptococos (todos los cultivos se hallaban en fase estacionaria temprana), de manera tal que la concentración inicial de bacterias fue de 10^7 ufc/ml. Se midió la producción de ácidos orgánicos mediante HPLC, a tiempo cero (es decir leche más inóculo), a las 6 horas y a las 24 horas de incubación a temperatura óptima y subóptima para estreptococos termófilos, con la finalidad de determinar si la producción de ácidos estuvo influenciada por la temperatura de crecimiento.

El tiempo de retención para cada ácido se obtuvo a partir de un cromatograma típico realizado con una solución acuosa de los estándares obtenidos en la puesta a punto del método (Bevilacqua, 1997).

Tiempos de retención y ordenamiento de elución:

Ácido cítrico	6.4 min.	214 Longitud de onda, λ (nm)
Ácido orótico	6.6 min.	280
Ácido pirúvico	7.4 min.	214
Ácido láctico	10.0 min.	214
Ácido fórmico	11.0 min.	214
Ácido úrico	11.0 min.	280
Ácido acético	12.0 min.	214
Acido propiónico	14.0 min.	214
Acido butírico	17.2 min.	214

A las curvas de calibración obtenidas para el ácido láctico (datos no mostrados) y el ácido fórmico (figura 1-4), se les aplicó regresión lineal y la siguiente ecuación de la recta: $Y = A + B.X$, donde Y = área debajo de cada pico del cromatograma y X = concentración de ácido fórmico y láctico. Para las constantes A y B se obtuvieron los siguientes valores: 12.160 y 0.4606

para el fórmico; -20.327 y 0.3603 para el láctico.

Despejando la concentración de ácido; resultó, para cada ácido de la forma:

$$(\text{ppm de ácido láctico}) = \text{Area} + 20.327 / 0.3603$$

$$(\text{ppm de ácido fórmico}) = \text{Area} - 12.160 / 0.4606$$

Con éstas ecuaciones se calcularon los datos para realizar las tablas 1-9-A a 1-10-B), partiendo de los cromatogramas (figura 1-5), obtenidos para cada cepa y para cada temperatura.

Figura 1-4: curva de calibración para ácido fórmico

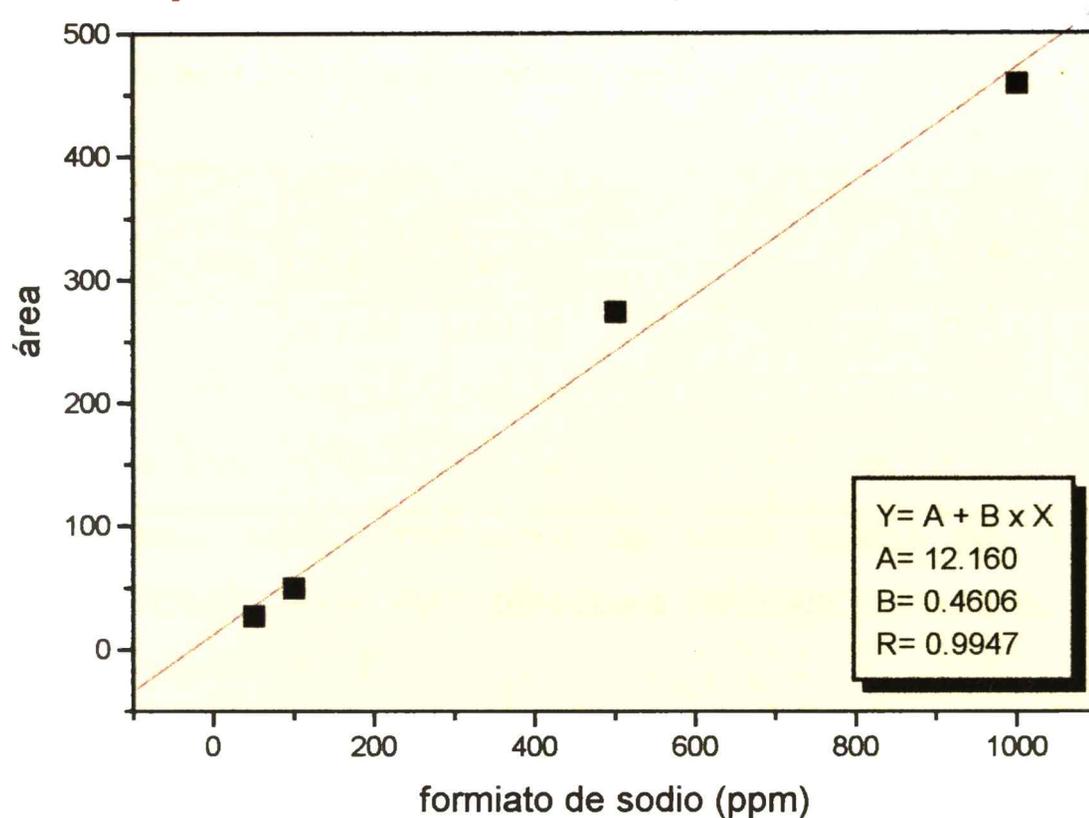
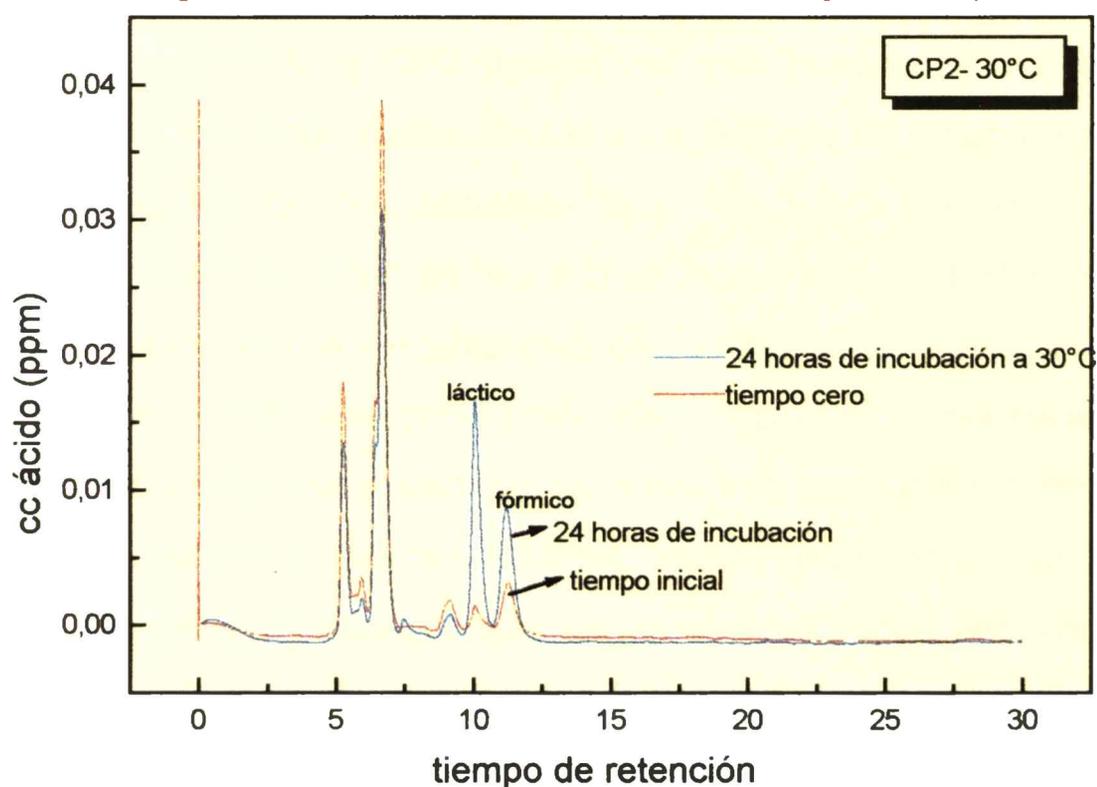


Figura 1-5: Producción de ácido fórmico y láctico por una cepa de estreptococo (CP2)



Cepas	30° C				44° C			
	CP2	CP3	CP4	CP5	CP2	CP3	CP4	CP5
t= 0	188.42	141.75	146.21	152.10	181.11	175.00	167.44	163.84
t= 6h	251.38	173.72	176.60	184.17	481.15	241.62	360.05	291.18
t= 24h	483.35	458.10	199.75	393.03	355.83	187.02	178.85	274.44

Tabla 1-9-A: Producción de ácido fórmico (en ppm), por cultivos de estreptococos, determinados a distintos tiempos de incubación a 30 y 44° C, mediante HPLC.

Los datos corresponden a una determinación.

Cepas	30° C				44° C			
	CP2	CP3	CP4	CP5	CP2	CP3	CP4	CP5
t=0	281.30	180.16	138.85	112.65	255.61	286.69	130.10	204.78
t= 6h	514.33	140.43	178.86	244.65	901.75	708.68	959.99	802.71
t= 24h	1216.10	907.54	453.17	771.16	579.68	450.04	715.70	816.23

Tabla 1-9-B: Producción de ácido láctico (en ppm), por cultivos de estreptococos, determinados a distintos tiempos de incubación a 30 y 44° C, mediante HPLC.

Los datos corresponden a una determinación.

Se observa que luego de incubar a 30°C durante 24 horas, la cepa CP4 fue la que produjo menor cantidad de ácidos fórmico y láctico, mientras que las cepas CP2 y CP3 fueron las que produjeron mayor cantidad de ambos ácidos. Cabe destacar que a las 6 horas de incubación el contenido de ácido fórmico de las distintas cepas no había variado demasiado respecto al contenido inicial de leche más inóculo, esto es lógico ya que a temperatura subóptima el metabolismo es mucho más lento que a temperatura óptima. En cuanto a la producción de ácido láctico, las cepas CP2 y CP5 a las 6 horas habían duplicado su contenido de ácido láctico, pero de todas formas la mayor producción de ácido láctico se observó a las 24 horas.

A 44°C, se observó que en general las cepas analizadas presentaron mayor producción de ácidos a las 6 horas de incubación. Esto es razonable ya que a temperatura óptima de incubación la actividad metabólica alcanzada a las 6 horas (en que las bacterias se hallan en fase de crecimiento exponencial),

Sinergismo y Antagonismo

es mayor que a las 24 horas (en que las bacterias entran en fase de declinación ó muerte). Las cepas CP2 y CP4 fueron las que produjeron mayor cantidad de ácido láctico y fórmico. Comparando la producción de ácidos fórmico y láctico por las distintas cepas de estreptococos a las 24 horas a 30°C y a las 6 horas a 44°C, se observa que en algunos casos fue mayor a 44°C y en otros casos no hubo mayores diferencias entre las dos temperaturas.

En una segunda etapa, se realizaron cinéticas de producción de ácidos fórmico y láctico (tablas 1-10-A y B) por cultivos de estreptococos y con y sin el agregado de sobrenadante de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB), incubando a 30°C. Paralelamente, se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano (por determinaciones de densidad óptica y recuento de bacterias lácticas, tablas 1-11-A y B), con la finalidad de determinar los efectos del agregado de sobrenadantes sobre la actividad metabólica y el crecimiento de los estreptococos.

Los datos obtenidos se muestran a continuación:

cepas	CP2	sob.+CP2	CP3	sob.+CP3	CP4	sob.+ CP4	CP5	sob.+ CP5
t= 0	188.42	145.22	141.75	152.05	146.21	141.30	152.10	119.38
t = 6 hs.	251.38	202.93	173.72	181.51	176.60	167.22	184.17	196.91
t = 18 hs.	nd	458.56	nd	212.66	nd	324.39	nd	242.79
t = 24 hs.	483.35	623.07	458.10	188.72	199.75	357.15	393.03	276.20

Tabla 1-10-A: Producción de ácido fórmico (en ppm) por cultivos de estreptococos con y sin el agregado de sobrenadantes de lactobacilos, determinados a distintos tiempos de incubación a 30°C, mediante HPLC.

nd: no determinado.

sob.: sobrenadante de *L. bulgaricus* (LBB).

Los datos corresponden a una determinación.

A las 6 horas de incubación a 30°C, la actividad metabólica de los estreptococos es poco importante, ya que aún no han salido de la fase de latencia, por lo que no se observan grandes diferencias en el contenido de ácidos láctico y fórmico con respecto al contenido a tiempo cero.

Al comparar la producción de ácidos fórmico y láctico por cultivos de

Sinergismo y Antagonismo

estreptococos con y sin agregado de sobrenadante de LBB, se observa que hubo pequeñas diferencias entre los cultivos. Por el contrario, CP3 produjo menor cantidad de éstos ácidos cuando se desarrolló en presencia de sobrenadante de LBB. Los metabolitos presentes en el sobrenadante de LBB no estimularían la producción de ácidos y hasta se podría decir que en un caso producen efecto negativo, tal es el caso de CP3.

cepas	CP2	sob.+CP2	CP3	sob.+CP3	CP4	sob.+ CP4	CP5	sob.+ CP5
t=0	281.30	390.88	180.16	277.47	138.85	189.32	112.65	93.73
t= 6 hs.	514.33	492.94	140.43	186.18	178.86	160.13	244.65	328.70
t= 18hs.	nd	1247.80	nd	497.63	nd	724.10	nd	582.53
t=24hs.	1216.10	1557.23	907.54	549.90	453.17	1063.57	771.16	785.93

Tabla 1-10-B: Producción de ácido láctico (en ppm) por cultivos de estreptococos con y sin el agregado de sobrenadantes de lactobacilos, determinados a distintos tiempos de incubación a 30°C, mediante HPLC.

nd: no determinado.

sob.: sobrenadante de *L. bulgaricus* (LBB).

Los datos corresponden a una determinación.

Los resultados correspondientes a la producción de ácido láctico concuerdan con los obtenidos mediante cinéticas de pH (ver punto a-, efecto del agregado de sobrenadante sobre la actividad acidificante), en cuanto a la igualdad en la acidificación producida por cultivos de estreptococos con y sin el agregado de sobrenadante de lactobacilo. A excepción de la cepa CP4, para la cual sí hubo diferencias en la acidificación producida por el cultivo con y sin el agregado de sobrenadante de LBB. Para explicar éste hecho debemos tener en cuenta el poder buffer o tampón que presenta la leche en las determinaciones realizadas con un pHmetro, mientras que por cromatografía en fase líquida se determina la producción neta de ácido láctico. En el caso de CP3 habría un efecto negativo sobre la producción de ácido láctico, similar al observado sobre la producción de ácido fórmico.

En las tablas 1-11-A y B, se observa que no hubo diferencias importantes en el crecimiento bacteriano, evaluado por determinaciones de densidad óptica y recuento bacteriano, entre los cultivos de estreptococos y dichos cultivos

con agregado de sobrenadante de LBB, cuando se incubó a 30°C.

cepas	CP2	sob.+CP2	CP3	sob.+CP3	CP4	sob.+ CP4	CP5	sob.+ CP5
t= 0	0.0987	0.0894	0.0892	0.0881	0.0846	0.0909	0.0853	0.0914
t = 6 hs.	0.1358	0.1277	0.0915	0.1008	0.0958	0.0992	0.1013	0.1022
t = 18 hs.	nd	0.1428	nd	0.1189	nd	0.1579	nd	0.1215
t = 24 hs.	0.2000	0.1806	0.1536	0.1741	0.1769	0.2034	0.1474	0.1416

Tabla 1-11-A: Crecimiento bacteriano a 30°C, evaluado por determinaciones de densidad óptica (D.O. a 480nm) de cultivos monomicrobianos de estreptococos y cultivos más sobrenadante de LBB.

nd: no determinado.

sob.: sobrenadante de *L. bulgaricus* (LBB).

Los datos corresponden a una determinación.

cepas	CP2	sob.+CP2	CP3	sob.+CP3	CP4	sob.+ CP4	CP5	sob.+ CP5
t= 0	9.0±1.0	6.5±1.5	0.5±0.2	1.0±0.5	0.7±0.1	0.7±0.1	4.0±1.0	5.0±1.0
t = 24 hs.	300±150	600±200	90±10	200±50	350±150	250±50	150±50	250±50

Tabla 1-11-B: Crecimiento bacteriano a 30°C, evaluado por recuentos de bacterias lácticas (10⁶ ufc/ml).

sob.: sobrenadante de *L. bulgaricus* (LBB).

Los datos corresponden a duplicados de un mismo experimento.

Anteriormente se había visto que los metabolitos presentes en el sobrenadante de LBB en general, no producían efecto estimulante sobre la producción de ácido láctico y fórmico por los estreptococos, éste hecho se corresponde con los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento bacteriano.

Según se detalló previamente, en cultivos mixtos de lactobacilos y estreptococos había un efecto sinérgico entre cepas en el crecimiento, específicamente de los lactobacilos sobre los estreptococos (figura 1-1). Cuando se utilizó sobrenadante de LBB, en reemplazo de los cultivos de lactobacilos, no se observó efecto estimulante sobre la producción de ácidos orgánicos, tampoco sobre el crecimiento bacteriano y sobre la actividad acidificante (tablas 1-10-A y B y 1-11-A y B).

c)- Efecto sobre las características tecnológicas:

-Características de coágulos de leche, obtenidos a partir de cultivos de estreptococos con agregado de sobrenadantes de lactobacilos, incubando a 30 y 44°C durante 24 horas.

En la tabla 1-12, se observa que no hubo diferencias en la acidificación alcanzada por los coágulos obtenidos a partir de cultivos de estreptococos con y sin agregado de sobrenadantes de lactobacilos, tanto cuando se incubó a 30 como a 44°C.

Cepa	30°C		44°C	
	pH del coágulo	viscosidad* aparente (mPa.seg)	pH del coágulo	viscosidad* aparente (mPa.seg)
S. thermophilus				
CP2	4.87±0.15	10.29±2.20	4.75±0.05	8.68±1.66
CP3	4.36±0.09	3.23±0.23	4.59±0.10	7.12±0.37
CP4	4.80±0.12	5.80±0.80	5.20±0.25	7.96±1.04
sobrenadante + cultivos				
LBB+CP2	4.88±0.18	17.42±1.83	4.74±0.14	14.91±1.91
LBB+CP3	4.35±0.07	4.19±0.40	4.50±0.10	7.39±0.39
LBB+CP4	4.20±0.01	9.67±1.44	5.37±0.03	8.00±0.24
LBP+CP2	4.79±0.10	17.91±0.58	4.77±0.17	17.62±0.54
LBP+CP3	4.32±0.06	5.24±0.80	4.56±0.05	11.30±1.19
LBP+CP4	4.48±0.17	9.24±0.24	5.34±0.03	7.59±0.34
LBR+CP2	4.73±0.15	17.18±2.82	4.80±0.10	13.69±0.44
LBR+CP4	4.32±0.05	10.22±0.64	5.40±0.05	8.87±0.13

Tabla 1-12: Acidificación y viscosidad aparente a $\gamma = 256 \times 5.41 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, de coágulos obtenidos por incubación a 30 y 44°C durante 24 horas.

*Los valores de viscosidad aparente corresponden al promedio de al menos tres valores obtenidos de cultivos independientes.

**Los valores de pH corresponden a duplicados de un experimento.

En cuanto a la reología de los coágulos, no se obtuvieron diferencias

importantes en la viscosidad obtenida para los cultivos control de estreptococos (CP3 y CP4) y los cultivos con agregado de sobrenadantes (de LBB, LBP y LBR) a ambas temperaturas. La excepción fue la cepa CP2 que presentó diferencias significativas entre la viscosidad aparente del cultivo control y el cultivo con sobrenadante. Este efecto se observó tanto a 30 como a 44°C. El efecto estimulante producido por el agregado de sobrenadante de lactobacilos sobre la viscosidad (tabla 1-12), fue de menor magnitud al efecto sinérgico observado entre CP2 y la tres cepas de *L. bulgaricus*, LBB, LBP y LBR (tabla 1-7-A).

-Características de los coágulos, obtenidos partiendo de cultivos de estreptococos con agregado de sobrenadantes de lactobacilos, luego del almacenamiento a 10°C durante 20 días.

En la tabla 1-13 se observa que no hubo diferencias importantes en la *post-acidificación* alcanzada por los coágulos obtenidos a partir de cultivos de estreptococos con y sin el agregado de sobrenadantes, luego del almacenamiento a 10°C durante 20 días, tanto cuando se había incubado a 30 como a 44°C.

En cuanto a la *sinéresis*, los cultivos de estreptococos obtenidos con las cepas CP2 y CP4 presentaron características similares luego del almacenamiento, mientras que CP3 presentó mayor desuerado, tanto a 30 como a 44°C. Al incubar a 30°C, el agregado de sobrenadantes de lactobacilos mejora las características de desuerado de los estreptococos en todos los casos. A 44°C, el agregado de sobrenadantes no mejora en general las características de *sinéresis*.

Al comparar las características de *post-acidificación* obtenidas luego del almacenamiento para cultivos monomicrobianos de estreptococos, cuando se había realizado el experimento con agregado de sobrenadante de lactobacilos (tabla 1-13) y cuando se habían utilizado cultivos mixtos (tabla 1-8), se observa que en éste último caso la *post-acidificación* fue mayor.

Cepa	30°C		44°C	
	post-acidificación (pH _c - pH ₂₀)	Sinéresis μl/ 10 ml 20 días	post-acidificación (pH _c - pH ₂₀)	Sinéresis μl/ 10 ml 20 días
<i>S. thermophilus</i>				
CP2	0.17±0.01	150±25	0.31±0.01	80±20
CP3	0.06±0.03	600±100	0.28±0.01	300±30
CP4	0.30±0.05	100±25	0.44±0.05	100±15
sobrenadante + cultivos				
LBB+CP2	0.18±0.01	50±10	0.31±0.01	75±25
LBB+CP3	0.07±0.03	350±50	0.25±0.03	300±50
LBB+CP4	0.19±0.11	50±10	0.58±0.07	75±25
LBP+CP2	0.18±0.03	50±10	0.31±0.02	80±10
LBP+CP3	0.06±0.03	350±100	0.26±0.05	200±50
LBP+CP4	0.27±0.03	75±20	0.52±0.02	100±0.0
LBR+CP2	0.16±0.05	50±0.0	0.33±0.04	110±10
LBR+CP4	0.25±0.04	50±10	0.58±0.05	150±50

Tabla 1-13: Características de los cultivos luego del almacenamiento a 10°C durante 20 días.

pH_c = pH del coágulo luego de 24 horas de incubación.

pH₂₀ = pH del coágulo almacenado a 10°C durante 20 días.

Los valores de post-acidificación y sinéresis de los coágulos corresponden a duplicados obtenidos en un experimento.

Al comparar la post-acidificación entre cultivos mixtos y cultivos con agregado de sobrenadantes, se vio que también resultó notablemente mayor en el experimento en que se habían utilizado cultivos mixtos.

En cuanto a las características de *sinéresis*, también resultó mayor cuando se emplearon cultivos mixtos (tabla 1-8), respecto al experimento en que se utilizaron los cultivos de estreptococos con agregado de sobrenadantes (tabla 1-13). Al comparar el desuerado de cultivos monomicrobianos de estreptococos se observa que fue mayor en el experimento en que se

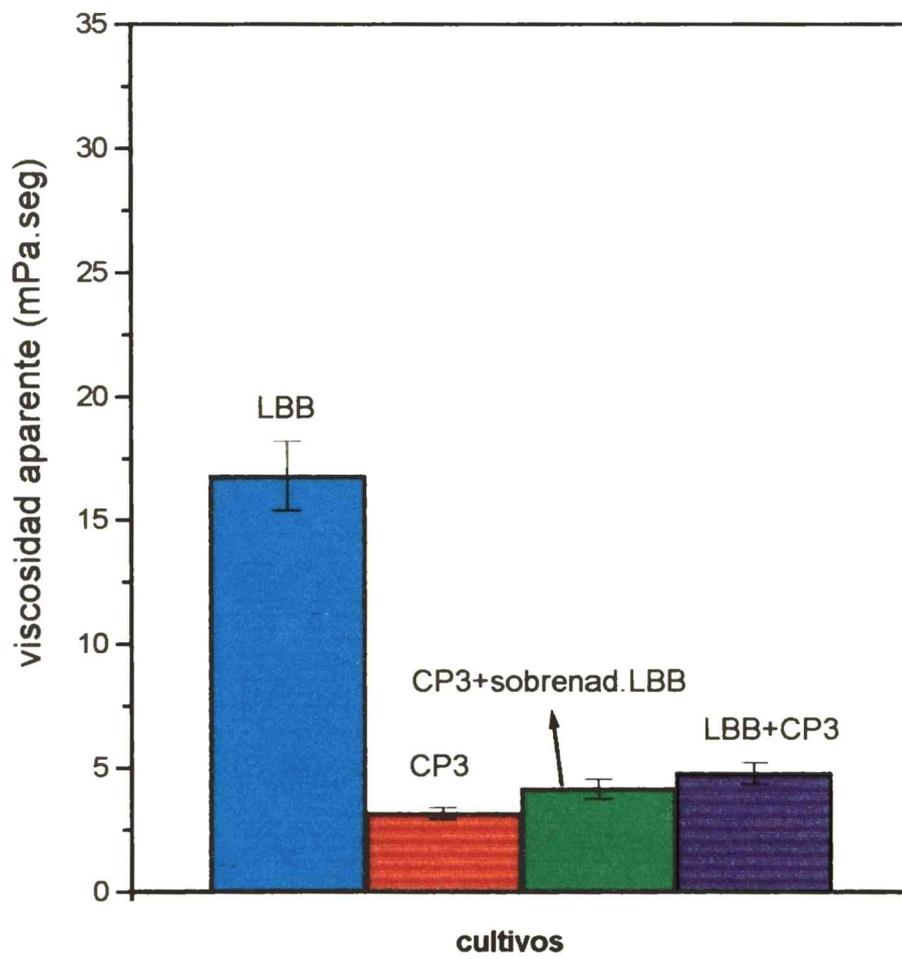
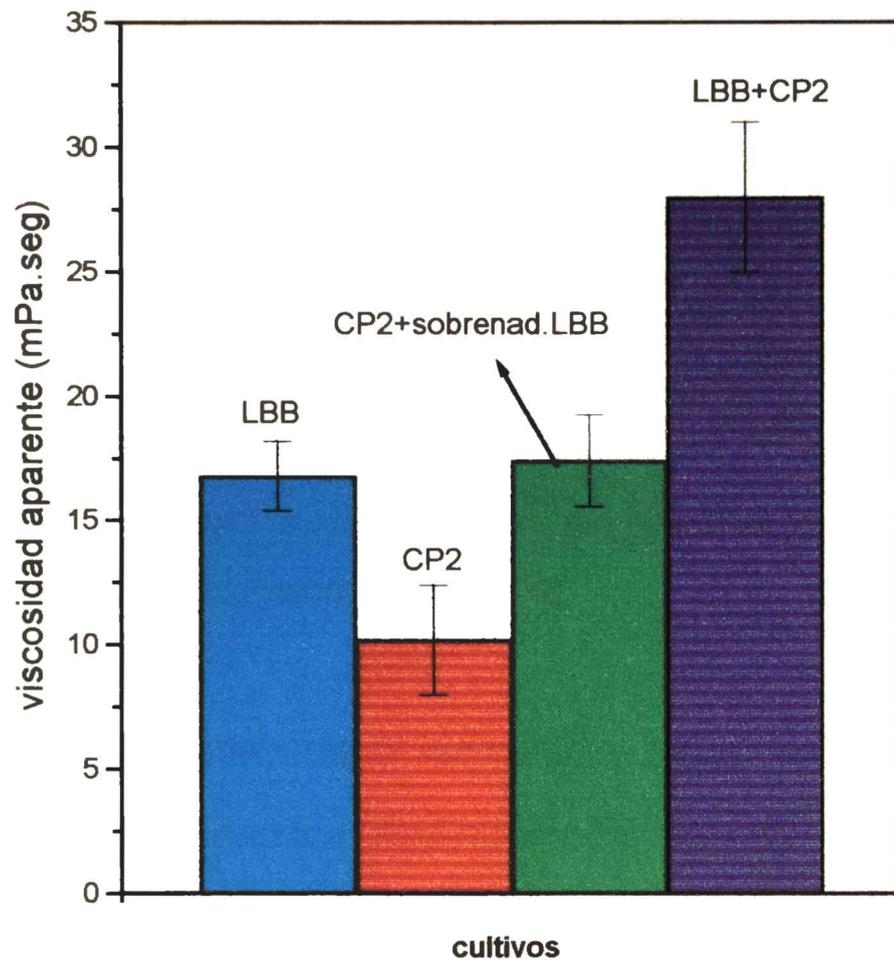
habían utilizado cultivos mixtos, respecto al experimento realizado con sobrenadantes.

Al utilizar cultivos mixtos en todos los casos mejoró la sinéresis, respecto a los cultivos monomicrobianos. Sin embargo, cuando se utilizaron sobrenadantes el desuerado mejoró solamente cuando se incubó a 30°C.

En la figura 1-6 se pueden comparar los valores de viscosidad que presentaron los coágulos obtenidos a partir de un cultivo mixto (LBB+CP2) y a partir de un cultivo de estreptococo (CP2) con agregado de sobrenadante de lactobacilo (LBB), a las 24 horas de incubación a 30°C. Se observa efecto sinérgico sobre la viscosidad del coágulo, tanto cuando se utilizó el cultivo mixto (LBB+CP2), como también cuando se utilizó cultivo de CP2 con agregado de sobrenadante de LBB. Aunque el efecto sinérgico observado sobre la viscosidad del coágulo fue mayor cuando se utilizó el cultivo mixto que cuando se utilizó el cultivo de CP2 con agregado de sobrenadante.

En el caso de CP3 (cultivo monomicrobiano), se observa que no hubo variación en las características reológicas, tanto cuando se utilizó cultivo mixto (LBB+CP3), como cuando se utilizó CP3 con agregado de sobrenadante de LBB. Por otro lado, la viscosidad del cultivo monomicrobiano de LBB fue mayor respecto a la viscosidad obtenida para el cultivo de CP3 con agregado de sobrenadante de LBB.

Figura 1-6: Reología de cultivos de estreptococos con y sin el agregado de sobrenadante de cultivo de *L. bulgaricus*, LBB.



Los datos corresponden al promedio de triplicados obtenidos de cultivos independientes.

CONCLUSIONES:

♣ No se detectó ningún caso de inhibición entre las 72 combinaciones de cepas estudiadas. No hubo producción de halos ni zonas de lisis en las condiciones probadas (tablas 1-1 y 1-2).

♣ A 30 y 44°C, el efecto sinérgico se observó tanto sobre la acidificación como sobre el crecimiento, en algunas de las combinaciones de las cepas estudiadas (tablas 1-5 y 1-6).

♣ En la mayoría de las combinaciones de cepas, desarrolladas a 30 y 44°C, concordaban los resultados obtenidos en leche y en medio de cultivo (tablas 1-1, 1-2, 1-5 y 1-6). Sin embargo, no se puede extrapolar los resultados de forma tal que una ausencia de sinergismo en el Spot Test signifique una ausencia de sinergismo en leche. De aquí surge que para estudiar el sinergismo entre cepas sea importante realizarlo en leche.

♣ Para la fabricación de quesos de pasta blanda, la selección de cepas para la formulación de fermentos debe realizarse en leche y a 30°C, ya que, algunas combinaciones de cepas, por ejemplo: LBB+CP4, LBP+CP4 y LBR+CP4, no presentaron efecto sinérgico a 44°C, pero sí a 30°C. De igual forma, para la elaboración de yogur, el relevamiento de cepas debe realizarse a 44°C porque algunas combinaciones de cepas, como por ejemplo: LBA en combinación con CP2 y CRL; LB1233 combinada con CP2, CP5 y CRL, no presentaron efecto sinérgico a 30°C, pero sí a 44°C.

♣ En todas las combinaciones de cepas en las que se detectó efecto sinérgico en el crecimiento bacteriano, el estímulo fue de los lactobacilos sobre los estreptococos (figura 1-1).

♣ Los cultivos mixtos (LBB+CP2, LBP+CP2 y LBR+CP2) presentaron mayores valores de viscosidad aparente y mínimo desuerado, el efecto sinérgico observado entre éstas cepas fue significativo. El resto de los cultivos mixtos, en general, presentó mayor desuerado y baja viscosidad y no se observó efecto sinérgico entre cepas.

♣ De acuerdo a los parámetros evaluados se puede concluir que las mejores combinaciones de cepas resultaron ser: *LBB+CP2*, *LBP+CP2* y *LBR+CP2*, que presentaron coágulos más viscosos, mínima post-acidificación y sinéresis durante el almacenamiento, tanto cuando fueron incubados a 30 como a 44°C. Por éstos motivos, resultaría muy interesante tener en cuenta dichos cultivos mixtos para la preparación de fermentos en la elaboraciones de queso tipo cuartirolo (tabla 1-7 y 1-8).

♣ No se observó efecto sinérgico sobre la actividad acidificante y el crecimiento de los estreptococos, mediante el agregado de sobrenadantes de *L. bulgaricus*; tampoco sobre la producción de ácidos orgánicos. En algunos casos se observó que el agregado de sobrenadantes de lactobacilos mejoraba las características tecnológicas de los coágulos obtenidos a partir de cultivos de estreptococos, pero el efecto observado era menor que cuando se utilizaban cultivos mixtos (tablas 1-10-A y B, 1-11-A y B, 1-12 y 1-13).

SEGUNDA PARTE

"Estimulación de

lactobacilos con

formiato de sodio"

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados y Discusión

Conclusiones

INTRODUCCION

Efecto del formiato sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *L. bulgaricus*.

Según se describió previamente (ver Primera parte), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produce aminoácidos y péptidos pequeños, a partir de las proteínas de la leche, que estimulan el crecimiento de *S. thermophilus* (Accolas y col., 1971; Radke-Mitchell y Sandine, 1986). A su vez, *S. thermophilus* produce dióxido de carbono, ácido fórmico y otros metabolitos, que estimulan al lactobacilo (Driessen y col., 1982; Accolas y col., 1971; Suzuki y col., 1986).

La estimulación de *S. thermophilus* por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ha sido estudiada en profundidad (Hemme, Schmal and Auclair., 1981; Radke-Mitchell y Sandine, 1984, Beal, Champagne, Brouillette and Girard, 1990; Spinnler and Corrieu, 1994, Primera Parte de éste trabajo: figura 1-1-B). Desmazeud and Hermier, (1972) aislaron de diferentes cepas de lactobacilos, péptidos capaces de estimular al estreptococo, partiendo de hidrolizado de caseína de composición cualitativa variable en aminoácidos. conteniendo desde cuatro a cuarenta residuos de aminoácidos.

Por otro lado, el estímulo que ejercen los estreptococos sobre los lactobacilos ha sido estudiado en menor grado. Se ha informado que el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es promovido por factores producidos por *S. thermophilus* en leche, que podrían ser reemplazados por ácido fórmico y ácido pirúvico (Driessen, Kingma and Stadhouders, 1982; Higashio, Yoshioka and Kikuchi, 1977).

En cultivos de yogur, se comprobó que el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es estimulado por el ácido fórmico sintetizado por *S. thermophilus*, en condiciones de ausencia o muy baja concentración de oxígeno (Driessen y col., 1982).

El ácido fórmico, sintetizado por *S. thermophilus*, actúa como factor de crecimiento, estimulando el desarrollo de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Higashino, Yoshioka and Kikuchi, 1977; Driessen y col. 1982).

Dicho estímulo se evidencia principalmente en la actividad acidificante y proteolítica del lactobacilo (Rajagopal y Sandine, 1990); esto es de

fundamental importancia ya que durante la proteólisis se generan productos específicos que otorgan aroma y sabor a los productos fermentados (Khalid y Marth, 1990).

La producción de formiato depende de la cepa de estreptococo, del medio de cultivo utilizado y de la temperatura. La cinética de producción de formiato sugiere que ésta tiene lugar durante las fases de crecimiento exponencial tardía y estacionaria temprana, tanto en leche como en medio de cultivo. La máxima producción de formiato en leche es de 44.5 ppm y se obtiene después de incubar a 37-44°C durante 6-8 horas (Pérez, De Antoni, 1991). En la Primera Parte (Sinergismo y Antagonismo) también se vio que la producción de ácidos orgánicos depende de la cepa utilizada, de la temperatura de crecimiento y del tiempo de incubación (tablas 1-9-A y 1-9-B).

El efecto estimulante del ácido fórmico sobre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se visualiza por un acortamiento de cadenas, que se relaciona con un aumento de la síntesis de ácido ribonucleico, específicamente actuando a nivel de la síntesis de bases púricas (Suzuki, Kato, Kitada, Yano and Morichi, 1985).

El estímulo producido por el ácido fórmico sobre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se ve potenciado por la presencia de otros ácidos orgánicos; como oxalacetato, fumarato, lactato, citrato y piruvato, que actuarían como factor de crecimiento (Higashino, Kikuchi, Yoshioka, 1977).

Ciertos tipos de lactobacilos termófilos crecen mucho mejor en leches conteniendo 150 ppm de ácido fórmico que en leches sin ácido fórmico (Tamine and Robinson, 1985).

Se ha publicado que *Lactobacillus lactis* crece mucho mejor en leche autoclavada que en leche calentada a 80-90°C. El agregado de 15 mg/ml de formiato de calcio a la leche produce un incremento de la actividad de *L. lactis* a niveles similares a los obtenidos en leche autoclavada, la cual contiene formiato en alta concentración (Auclair and Portmann, 1957).

El mismo efecto fue observado en cultivos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* incubados a 37°C, con el agregado de 150 ppm de formiato de sodio; produciendo un aumento en la producción de ácido (Tamine and Robinson, 1985) y en el contenido de DNA por célula (Suzuki, Kato, Kitada, Yano and Morichi, 1986).

Los trabajos mencionados anteriormente describen el efecto estimulante del formiato de calcio o de sodio, sobre el crecimiento, la producción de ácido y sobre la síntesis de RNA en cultivos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a temperaturas óptimas (Suzuki, Kato, Kitada, Yano and Morichi, 1985 y 1986; Beal, Spinnler and Corrieu, 1994; Tamine and Robinson, 1985). Hasta el momento de iniciada ésta tesis no había información acerca del efecto del formiato de sodio sobre el metabolismo y el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a temperaturas subóptimas de desarrollo (30 a 32°C). Es importante estudiar el efecto del formiato a ésta temperatura ya que durante la elaboración de quesos de pasta blanda la temperatura no sobrepasa los 32°C, y el agregado de formiato para la formulación de fermentos, partiendo de determinadas cepas de lactobacilos, podría resultar una buena alternativa para mejorar las características organolépticas y microbiológicas del producto.

Actividad proteolítica específica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

El pool de aminoácidos y péptidos presentes en la leche no es suficiente para asegurar el crecimiento óptimo de las bacterias lácticas. La hidrólisis de caseínas por la acción de las proteasas de algunas especies de bacterias ácido lácticas constituye su principal fuente de nitrógeno (Reinheimer, 1994). Las bacterias ácido lácticas están equipadas con un complejo sistema proteolítico constituido por proteinasas asociadas a la pared celular y diferentes peptidasas con localización poco conocida. La función del sistema proteolítico es suplir de aminoácidos a la célula para su desarrollo en un medio con bajo contenido de nitrógeno soluble como es la leche. Por otra parte, los productos de proteólisis otorgan características de aroma y sabor específicos en productos fermentados (Fox, 1989; Khalid y Marth, 1990, Tamine, 1980).

El paso inicial en la degradación de caseína es mediado por proteinasas encontrada en la pared celular. Los oligopéptidos producidos son posteriormente degradados por peptidasas a pequeños péptidos y aminoácidos, el tamaño debe ser suficientemente pequeño como para poder atravesar la membrana celular. Este proceso permite a las bacterias ácido lácticas alcanzar una concentración adecuada de aminoácidos y péptidos

para satisfacer sus necesidades nutricionales (Wohlrab and Bockelmann, 1993).

El sistema proteolítico del lactobacilo es muy complejo y está compuesto por proteinasas y peptidasas con diferente localización subcelular (Reinheimer, 1994). Las proteinasas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* están asociadas con la pared celular y reguladas por la temperatura y fase de crecimiento (Abraham A., 1993; Chandan, et al., 1982).

El estudio de la actividad proteolítica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en leche podría tomarse como base fundamental para la selección de un starter. La actividad proteolítica es importante con relación al crecimiento simbiótico con *S. thermophilus* durante la elaboración de yogur (Abraham A., 1993).

S. thermophilus tiene mayor actividad peptidásica que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y escasa actividad proteásica. En cambio éste último presenta una mayor actividad proteínásica localizada en la pared celular. Durante la fermentación láctica las proteasas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hidrolizan las caseínas para dar péptidos que sirven de sustrato a las peptidasas de *S. thermophilus* (Tamine, 1980).

La proteólisis, es probablemente el más importante evento bioquímico durante la maduración de la mayor parte de las variedades de quesos, con una influencia fundamental en la definición de textura y sabor (Fox, P.F., 1989).

La proteólisis del queso influye notablemente en la calidad organoléptica del mismo y por ello ha sido estudiada con detenimiento en muchas variedades de queso. En el estudio de la hidrólisis enzimática de la α_{s-1} y β -caseína y de sus primeros productos de degradación, la electroforesis en geles de poliacrilamida, ha resultado particularmente útil como técnica cuantitativa (Marcos A, Fernández- Salguero J. y Esteban M., 1978). Las proteínas tratadas con el detergente Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) se disocian en monómeros perdiendo su estructura tridimensional. El SDS se fija solidariamente a la cadena polipeptídica por medio de uniones hidrofóbicas, formando una capa con los grupos sulfato expuestos al medio acuoso. Debido a que existe una relación constante entre el SDS fijado y las proteínas (cerca de 1:4 en peso), éstas últimas adquieren una densidad de

carga, aportada por los grupos sulfato, que depende exclusivamente de su peso molecular. La velocidad de migración del complejo SDS-proteína a través de la mallas de un gel de poliacrilamida es entonces función de su masa y no más de su carga total. Este método de electroforesis en presencia de SDS permite determinar el peso molecular de las proteínas o de sus fracciones, (Zalazar, 1994).

La proteólisis primaria en quesos puede ser definido como aquellos cambios en β , γ , α caseínas, péptidos y productos de menor peso molecular que pueden ser detectados por electroforesis en geles de poliacrilamida (Rank, T.; Grappin R.; Olson N., 1985).

Durante el proceso de maduración del queso, las paracaseínas de la cuajada son hidrolizadas catalíticamente por la proteasa de la leche, las enzimas del cuajo empleado como coagulante, las enzimas de los cultivos lácticos agregados y la de los microorganismos contaminantes de la leche original y del producto en fase de elaboración (Marcos A, Fernández-Salguero J. y Esteban M., 1978).

La cantidad de α_{s-1} caseína hidrolizada varía con el tipo de queso, calidad bacteriológica de la leche, condiciones de maduración y edad del queso. El cuajo juega el rol más importante en la iniciación de la degradación de la α_{s-1} caseína. En la degradación proteolítica durante la maduración de quesos de pasta blanda, la condición más favorable para la acción del cuajo es pH cercano a 5 con 4% de cloruro de sodio en base húmeda (Rank, T.; Grappin R.; Olson N., 1985).

La β -caseína permanece inalterada luego de la acción de las enzimas del cuajo. La caseína fue hidrolizada en diferentes grados en las distintas variedades de quesos; la fracción α_{s-1} es degradada en todos los tipos de quesos, mientras que la β caseína aparece prácticamente intacta en algunas variedades de queso. Estos hechos evidencian diferencias importantes en las capacidades proteolíticas de los microorganismos propios de cada tipo de queso. Un exhaustivo estudio de las enzimas bacterianas permitirá un mejor conocimiento o entendimiento del proceso de maduración de quesos (Ledford R., O' Sullivan A. and Nath K., 1966).

OBJETIVOS

El efecto estimulante que ejerce el formiato de sodio o de calcio sobre el crecimiento, la producción de ácido y sobre la síntesis de RNA en cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ya ha sido descrito por varios autores a temperaturas óptimas de crecimiento, 37 a 44°C (Suzuki, Kato, Kitada and Yano, 1985 y 1986; Beal, Spinnler and Corrieu, 1994). Sin embargo no hay estudios realizados a temperaturas subóptimas de crecimiento (30-32°C). Teniendo en cuenta ésto y además el hecho que en el estudio de efecto protocooperativo entre cepas (Primera parte), en ninguna de las combinaciones se observó estímulo del crecimiento del lactobacilo por parte de los estreptococos, se decidió probar *si el formiato de sodio tenía algún efecto positivo sobre el crecimiento y sobre la actividad acidificante y proteolítica de los lactobacilos, aplicable a la elaboración de quesos de pasta blanda*, ya que durante la elaboración de éste tipo de quesos, la temperatura no sobrepasa los 32-34°C. Para ello se estudió el efecto del agregado de formiato de sodio sobre distintas cepas de lactobacilos (**LBB, LBP, LBR, LBA, LB1233 y ATCC 11842**), cuando se incubaron en leche a temperatura subóptima de crecimiento (30°C). Por otra parte, todos los experimentos se realizaron también a temperatura óptima a fin de comparar los resultados obtenidos a las dos temperaturas.

MATERIALES Y METODOS

Cepas utilizadas:

**Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB, LBP, LBR, LBA, LB1233 y ATCC 11842), fueron aislados en el CIDCA a excepción de la cepa ATCC que fue obtenida de American Type Culture Collection.

* *Streptococcus thermophilus* (CP4), también fue aislada en el CIDCA.

En la tabla I (ver Generalidades) se detalla el origen de las cepas utilizadas.

Todas las cepas se conservaron congeladas a -80°C ; posteriormente, se reactivaron y desarrollaron en leche UAT.

Reactivación y preparación de cepas: los cultivos congelados fueron reactivados en 5 ml de leche UAT se incubaron a 37°C durante 18 horas y luego se repicaron en leche a 37°C hasta llegar a $\text{pH}=5$ (fase estacionaria temprana), para obtener un inóculo activo.

Incubación: La leche se inoculó con distintos volúmenes de cada una de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y/o *Streptococcus thermophilus*. A los cultivos se les adicionó *formiato de sodio en cantidades variables entre 0 y 100 ppm*, según correspondía a cada experimento. Posteriormente, las muestras se incubaron a 30 y 44°C y a los distintos tiempos se determinó: pH, actividad proteolítica y crecimiento bacteriano.

Metodologías:

Determinación de pH, se realizó con un pHmetro con electrodo combinado de Calomel, descrito previamente.

✓ **Determinación de Nitrógeno TCA-Soluble en cultivos bacterianos:**

Las proteínas fueron precipitadas con TCA a una concentración final de 8.0g/100ml, seguida por una centrifugación a 7000 x g durante 15 minutos. El nitrógeno TCA soluble fue determinado en el sobrenadante con el reactivo de Folin de acuerdo al método de Hull, (1947) modificado por Citti y col.

(1963), descrito previamente (ver Primera parte: Sinergismo y Antagonismo).

El contenido de nitrógeno fue expresado en mg tirosina/ 100ml.

✓ *Recuento de bacterias ácido-lácticas*, en cultivos monomicrobianos y mixtos, para ello se utilizó medio 1.1.1 que permite hacer recuento diferencial de estreptococos y lactobacilos por distinta morfología de colonias, (según se describió en la Primera parte).

✓ *Determinación de Crecimiento Bacteriano en leche por medida de Absorbancia a 480nm*, según la Técnica de Kanasaki y col., (1975), previamente descrita en la Primera Parte.

✓ *Cosecha de bacterias y preparación de suspensiones bacterianas*: las bacterias fueron cosechadas a partir de cultivos desarrollados a 30 y 44°C, con y sin el agregado de 40 ppm de formiato de sodio. Cuando los cultivos llegaron a pH=5 (fase estacionaria temprana), fueron tratados con Na₂-EDTA 2% p/v, pH= 12 hasta un pH final de 6.5-7.0 (Abraham, 1993) y luego centrifugados a 5000 x g durante 15 minutos a 10°C. El precipitado bacteriano fue lavado 2 veces y resuspendido en buffer fosfato 0.5M con pH=7 para obtener una suspensión bacteriana 10 veces concentrada conteniendo aproximadamente 10⁹ ufc/ml.

Una vez obtenidos los precipitados bacterianos se resuspendieron en buffer fosfato, luego se igualó la carga bacteriana de las suspensiones correspondientes a las muestras con y sin formiato por determinaciones de densidad óptica y por recuento de bacterias lácticas.

✓ *Determinación de Actividad Proteolítica específica de suspensiones bacterianas*: Se utilizó leche diluida como sustrato para determinar la actividad proteolítica específica. La mezcla de reacción (0.5ml de suspensión bacteriana, conteniendo 1-4 x10⁹ ufc/ml y 2 ml de leche diluida, cuya concentración de proteínas era de 2.5 mg/ml), fue incubada a 30 y 44°C y a los distintos tiempos de incubación se determinó.

Preparación de los geles:

Tamaño de geles: de 9x8x0.75cm.

Geles disociantes, continuos:

Gel apilador:

buffer apilador	0.625 ml
agua destilada	0.750 ml
glicerol	0.750 ml
acrilamida-bisacrilamida	0.400 ml
persulfato de amonio 10%	0.030 ml

Gel separador:

	12.8%	15%
buffer separador	2.50ml	2.50ml
agua destilada	3.25ml	2.60ml
acrilamida-bisacrilamida	4.25ml	4.90ml
persulfato de amonio 10%	0.07ml	0.07ml

Procedimiento para el armado de las placas:

Se desengrasan los vidrios de las placas de electroforesis con alcohol.

Se arman las placas utilizando los separadores adecuados al espesor del gel deseado.

Se fija en el soporte de placas y se carga la placa con alcohol (para verificar si hay pérdidas). Corroborado esto se vacían y se secan cuidadosamente con papel de filtro sin sacarlas del soporte.

Se cargan las placas con las soluciones de gel separador y apilador, con ayuda de una pipeta.

Corrida electroforética:

Las muestras se disuelven en buffer de muestra en la proporción adecuada que garantice que, sembrando volúmenes determinados, en el caso de los

geles chicos 10 μ l, se obtengan de 20 a 30 microgramos de proteínas en cada calle.

Para evaluar el peso molecular de las especies proteicas obtenidas en las diferentes muestras se sembró en una calle de cada gel, una mezcla de proteínas de peso molecular conocido. Para ello se emplearon patrones Sigma, conteniendo: fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa), y lactalbúmina (14.4 kDa).

Luego de completar el sembrado de las muestras, se trasladan las placas a la cuba, se incorpora el buffer de corrida 1X frío y se conecta el equipo a la fuente, regulándola a 15 mA por placa, si se trata de geles chicos.

Completada la corrida, los geles se colocan en colorante durante 2 horas y luego en decolorante, cambiándolo tantas veces como se sature de azul.

Completada la decoloración se guardan en agua con una gota de ácido acético.

RESULTADOS

Efecto del formiato sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

En una **primera etapa** de análisis, se estudió el efecto del agregado de formiato de sodio (en cantidades variables entre 0 y 100ppm) sobre cultivos monomicrobianos de las cepas de lactobacilos anteriormente enumeradas. Se utilizó leche como medio de crecimiento y los experimentos se realizaron incubando a 30 y 44°C durante 24 horas y posteriormente, las muestras se almacenaron a 10°C durante 20 días, tratando de simular las condiciones utilizadas en la elaboración de quesos.

Se analizó la influencia del formiato sobre: la actividad acidificante (diferencia de pH, $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{0\text{h}} - \text{pH}_{24\text{h}}$) sobre la actividad proteolítica (producción de nitrógeno soluble, $\Delta\text{N}_{\text{soluble}} = \text{N}_{24\text{h}} - \text{N}_{0\text{h}}$) y sobre el desarrollo bacteriano (recuentos de bacterias lácticas viables)

En la *figura 2-1*: se presentan los datos obtenidos con la cepa LBB cuando fue desarrollada en presencia de distintas cantidades de formiato de sodio en leche, incubando a 30°C durante 24 horas. Se observa que el formiato ejerce un efecto estimulante sobre la actividad acidificante y proteolítica de LBB. Asimismo, el formiato permite a LBB alcanzar mayores valores de recuentos. Aparentemente, con el agregado de 40 ppm el efecto sobre la proteólisis y el crecimiento bacteriano sería mayor, mientras que dicho efecto disminuye al utilizar 100 ppm de formiato de sodio.

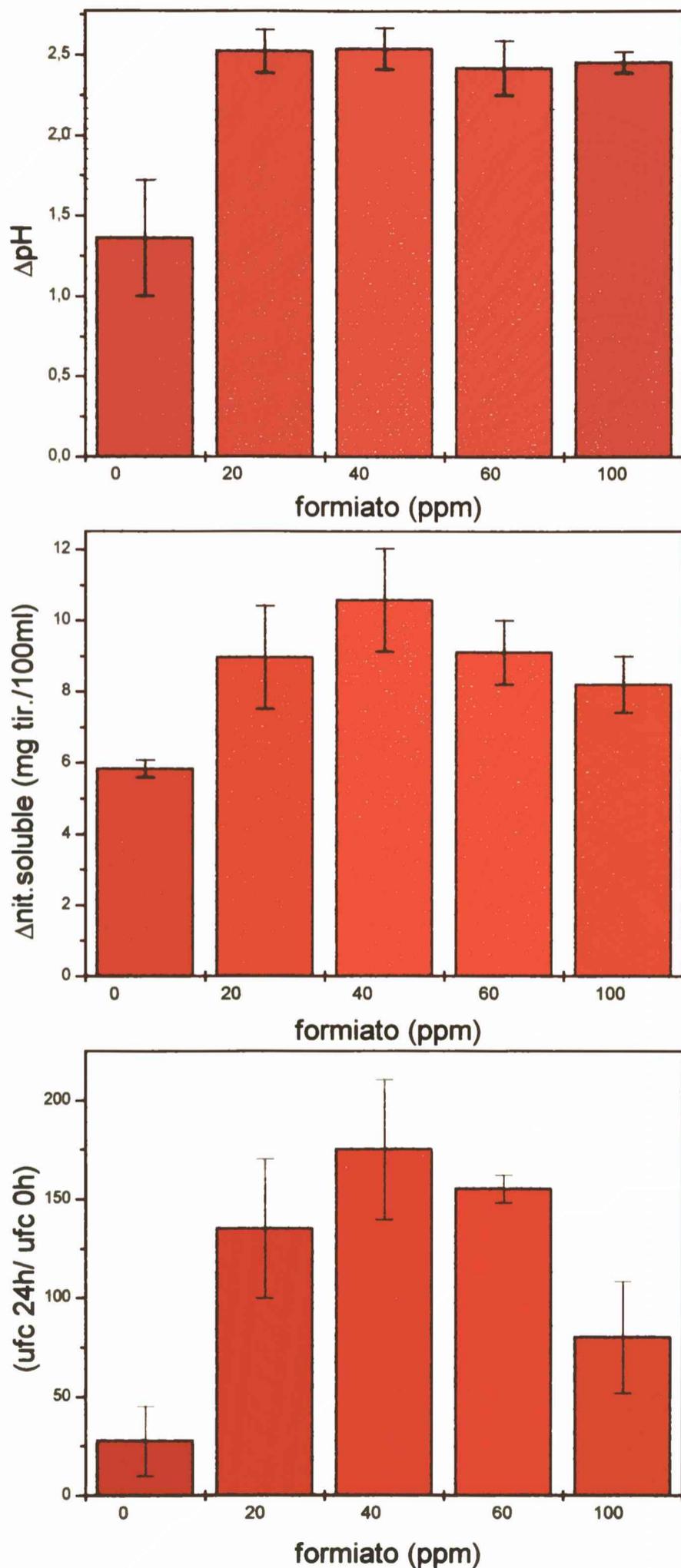
Los datos mostrados son un promedio de tres experimentos independientes.

En la *figura 2-2*: se presentan los datos obtenidos con la cepa LBR cuando fue desarrollada en presencia de distintas cantidades de formiato en leche incubando a 30°C durante 24 horas. Se observa que el formiato no ejerce efecto estimulante sobre la actividad acidificante, proteolítica y el crecimiento de LBR, resultado observado con todas las concentraciones de formiato

probadas.

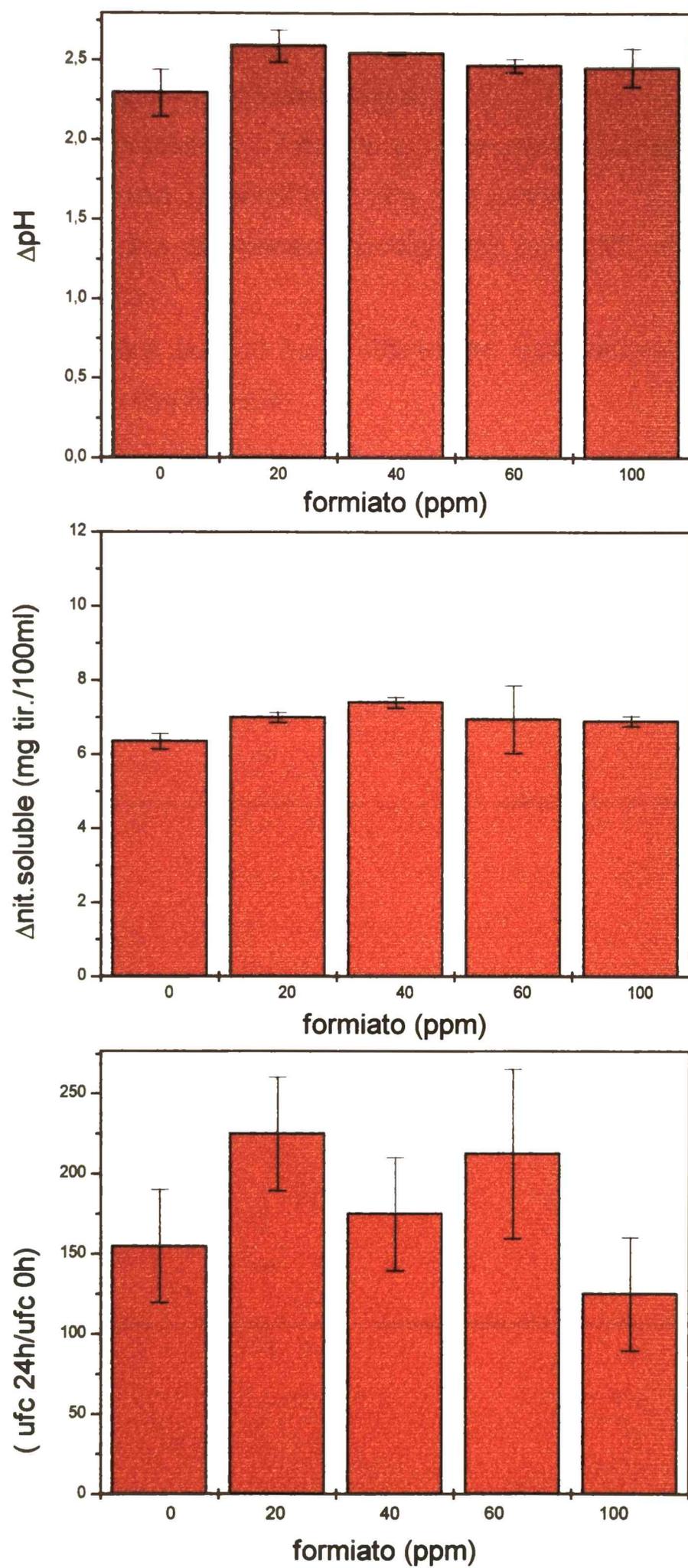
Los datos mostrados son un promedio de tres experimentos independientes.

Figura 2-1: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *L. bulgaricus*, LBB luego de 24 horas de incubación a 30°C.



Estimulación de lactobacilos con formiato.

Figura 2-2: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *L. bulgaricus*, LBR. luego de 24 horas de incubación a 30°C.



Estimulación de lactobacilos con formiato.

Los datos obtenidos con todas las cepas estudiadas, a temperatura óptima y subóptima de crecimiento, se resumen en las **tablas 2-1 y 2-2**.

Los datos que se muestran a continuación, corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

Para establecer un resultado como positivo o negativo se utilizó el Test de Mínima Diferencia Significativa (LSD), que indica:

(+) indica diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre cultivo control y cultivo con formiato.

(-) indica que no hubo diferencias significativas ($\alpha > 0.05$) entre cultivo control y cultivo con formiato.

CEPAS						
	LBB	LBP	LBR	LBA	LB1233	ATCC11842
acidificación	+	+	-	-	-	-
proteólisis	+	-	-	-	-	-
desarrollo bacteriano	+	+	-	-	-	-

Tabla 2-1: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (incubación a 30°C durante 24 horas).

CEPAS						
	LBB	LBP	LBR	LBA	LB1233	ATCC11842
acidificación	+	+	-	-	-	-
proteólisis	+	-	-	-	-	-
desarrollo bacteriano	+	+	-	-	-	-

Tabla 2-2: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad metabólica y el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (incubación a 44°C durante 24 horas).

En las tablas 2-1 y 2-2 se observa que:

El formiato ejerce un gran efecto estimulante sobre la actividad metabólica de LBB, luego de incubar a 30°C durante 24 horas. Los cultivos

Estimulación de lactobacilos con formiato.

desarrollados en presencia de formiato presentaron mayor actividad acidificante y proteolítica, que se correspondió con un gran aumento en el número de bacterias; respecto al control sin formiato (figura 2-1).

Cuando los experimentos se realizaron con LBB incubando a 44°C (datos no mostrados), se observó que el formiato produjo efecto estimulante (sobre la actividad acidificante, proteolítica y desarrollo bacteriano), pero el efecto fue levemente menor que a 30°C. No hubo diferencias significativas entre los valores de ΔpH obtenidos para los cultivos desarrollados en presencia y ausencia de formiato a 30°C ($\Delta\text{pH}= 1.3$) y a 44°C ($\Delta\text{pH}=1.00$). De igual manera sucedió con los valores de $\Delta\text{Nitrógeno soluble}$ obtenidos para las muestras con y sin formiato, a las 24 horas de incubación. A 30°C, el $\Delta\text{N soluble}$ fue de 3mg de tirosina/ 100 ml de cultivo, y a 44°C fue de 2 mg de tirosina/ 100ml de cultivo. En cuanto a los recuentos, a 30°C se observó un orden de diferencia entre los recuentos obtenidos para las muestras desarrolladas con y sin formiato; mientras que a 44°C, las bacterias crecidas con formiato solamente triplicaron los recuentos, respecto a los obtenidos para las muestras sin formiato.

El hecho que el efecto producido por el agregado de formiato a 30°C sea levemente mayor que a 44°C, puede deberse a que se tomaron, para comparar las dos temperaturas, los datos correspondientes a las 24 horas de incubación. Como ya se observó en los resultados mostrados en la primera parte (sinergismo y antagonismo entre cepas), las bacterias desarrolladas a 44°C, a las 6 horas ya se hallan en fase estacionaria temprana y fue cuando se observaron las mayores diferencias entre cultivos monomicrobianos y mixtos. Se podría pensar que a 44°C el efecto estimulante del formiato fuese mayor a las 6 horas y que disminuyese a las 24 horas como consecuencia de la muerte celular.

Cuando se utilizaron cultivos de LBP el formiato produjo un gran efecto estimulante sobre la actividad acidificante, tanto cuando se incubó a 30 como a 44°C durante 24 hs; que se correspondió con un aumento

Estimulación de lactobacilos con formiato.

importante en los recuentos de bacterias lácticas. La diferencia entre los valores de ΔpH de cultivos desarrollados en presencia y ausencia de formiato fue de 1.5, para ambas temperaturas de incubación. Por otro lado, los recuentos de las muestras con formiato fueron el doble, respecto a los obtenidos para las muestras sin formiato, tanto a 30 como a 44°C (datos no mostrados).

Al analizar la proteólisis producida por LBP, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos desarrollados en presencia y ausencia de formiato a las 24 horas de incubación tanto a 30 como a 44°C. Las diferencias entre los valores de nitrógeno TCA-soluble para los cultivos desarrollados en presencia y ausencia de formiato fueron menores a 1 mg de tirosina /100ml de cultivo, a las dos temperaturas de incubación (datos no mostrados).

Por otro lado se observa que el agregado de formiato de sodio no estimuló la actividad acidificante, la actividad proteolítica y el crecimiento de las cepas LBR (figura 2-2), LBA, LB1233 y ATCC 11842; tanto cuando fueron incubadas a 30 como a 44°C durante 24 horas.

Las muestras fueron almacenadas a 10°C durante 20 días, al cabo de éste período fueron analizadas y se observó que se habían mantenido los resultados observados a las 24 horas de incubación a las dos temperaturas.

Al comparar las dos tablas anteriores se observa que los resultados coinciden, es decir que las cepas fueron estimuladas de igual manera y en distinto grado por el agregado de formiato, a 30 y 44°C. LBB fue estimulada en todas las condiciones ensayadas, LBP sólo fue estimulada en algunos de los parámetros analizados, tanto a 30 como a 44°C. Por otro lado, el resto de las cepas estudiadas no fueron afectadas por el agregado de formiato, a las dos temperaturas probadas.

Estimulación de lactobacilos con formiato.

En una **segunda etapa** de análisis, con el objeto de determinar a que tiempo de incubación se producía el máximo estímulo, se realizaron cinéticas de pH y crecimiento con 40 ppm de formiato de sodio, se utilizó ésta concentración, ya que en general, era la que producía máximo efecto estimulante sobre todos los parámetros analizados.

Se emplearon dos cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que en la primera etapa de análisis fueron estimuladas por el formiato en mayor o menor medida (LBB y LBP) y una cepa no estimulada (LBR). Las bacterias fueron crecidas en leche en presencia (40 ppm) y ausencia de formiato, incubando a 30°C durante 48 horas. El inóculo inicial en todos los casos fue de $2-4 \times 10^7$ ufc/ml.

Los datos que se muestran a continuación (figura 2-3), corresponden al promedio de 5 experimentos independientes.

El efecto que el formiato de sodio produjo sobre la cepa LBB se visualizó como una disminución del período de latencia, pero no afectó el rendimiento bacteriano; el efecto estimulante se observó también en la producción de ácido (figura 2-3-A y D).

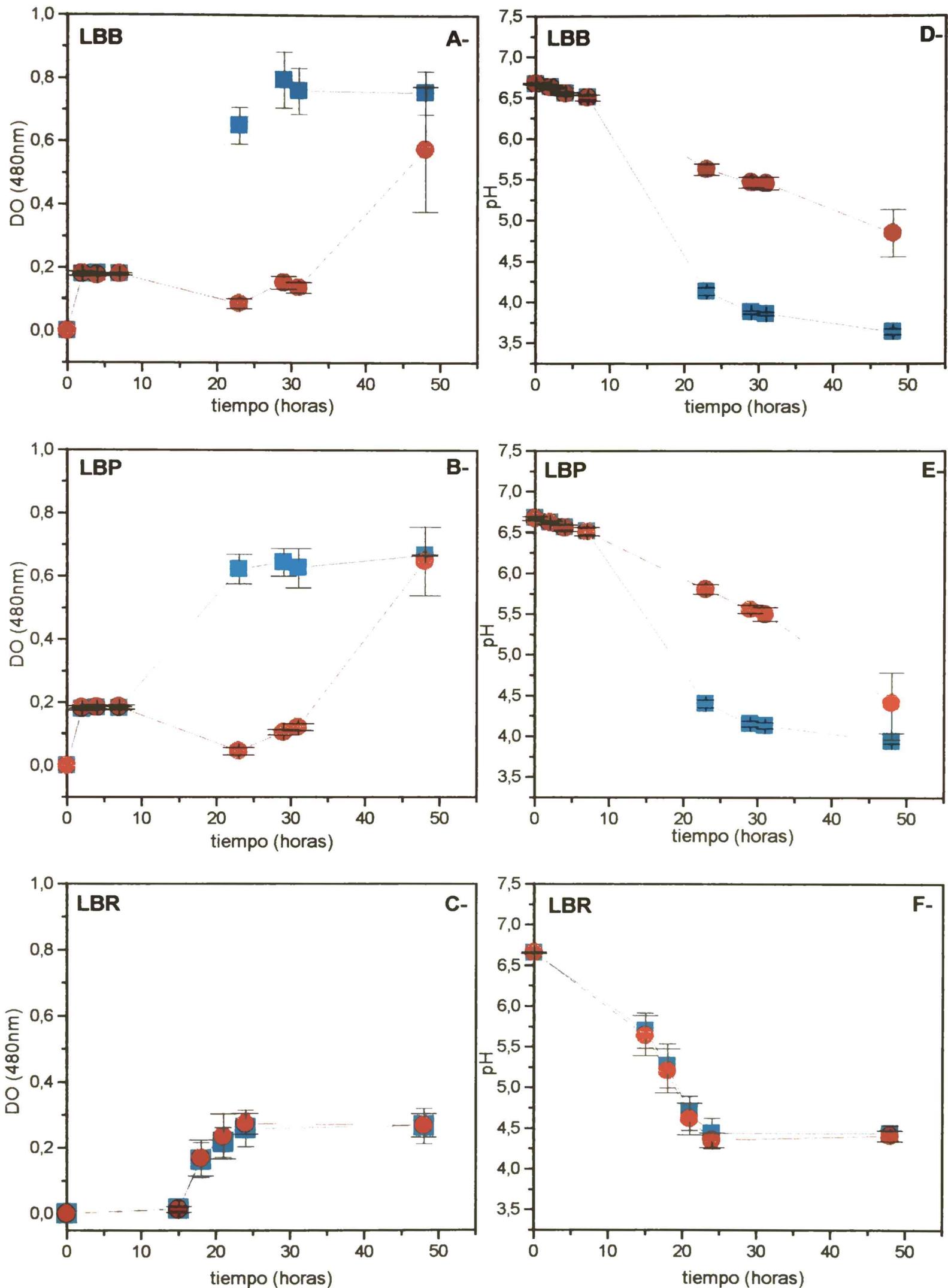
Cuando se utilizó la cepa LBP, se observó el mismo efecto estimulante del formiato sobre el crecimiento y la producción de ácido (figuras 2-3-B y E).

En contraste, la cepa LBR no fue estimulada ni en su crecimiento ni en la producción de ácido (figura 2-3-C y F).

Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos con las tres cepas, para los dos parámetros analizados, se determinó que existen diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre los cultivos de LBB desarrollados en leche y leche con formiato, en cuanto a su actividad acidificante y su crecimiento, entre las 10 y las 40 horas de incubación. También se obtuvieron diferencias significativas para la cepa LBP desarrollada en presencia y ausencia de formiato, en cuanto a su actividad acidificante y su crecimiento. No se obtuvieron diferencias significativas para la cepa LBR desarrollada en presencia y ausencia de formiato (figura 2-3-A, B, C, D, E y F).

Estimulación de lactobacilos con formiato.

Figura 2.3 A, B, C, D, E y F, Cinéticas de crecimiento y acidificación de *L. bulgaricus*, en presencia de 40 ppm ■ y ausencia ● de formiato



Efecto del formiato de sodio sobre el crecimiento y la producción de ácido, a 30 y a 44°C, de tres cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* desarrolladas en leche.

En la figura 2-4, se presentan los datos obtenidos para las cepas LBB, LBP y LBR desarrolladas en leche y leche con agregado de 40 ppm de formiato, incubadas a 30 y 44°C durante 24 horas.

Los datos mostrados son un promedio de al menos tres experimentos independientes.

Los valores tomados para realizar los gráficos fueron calculados de la siguiente manera:

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{0\text{h}} - \text{pH}_{24\text{h}} \quad \Delta\text{DO}_{480\text{nm}} = \text{DO}_{24\text{h}} - \text{DO}_{0\text{h}}$$

Se observa que después de 24 horas de incubación a 30°C la masa bacteriana de LBB y LBP fue de 8 a 15 veces mayor en cultivos crecidos en presencia de formiato respecto a los controles sin formiato. A 44°C la cepa LBB fue levemente estimulada, respecto al fuerte estímulo producido por el formiato sobre LBP.

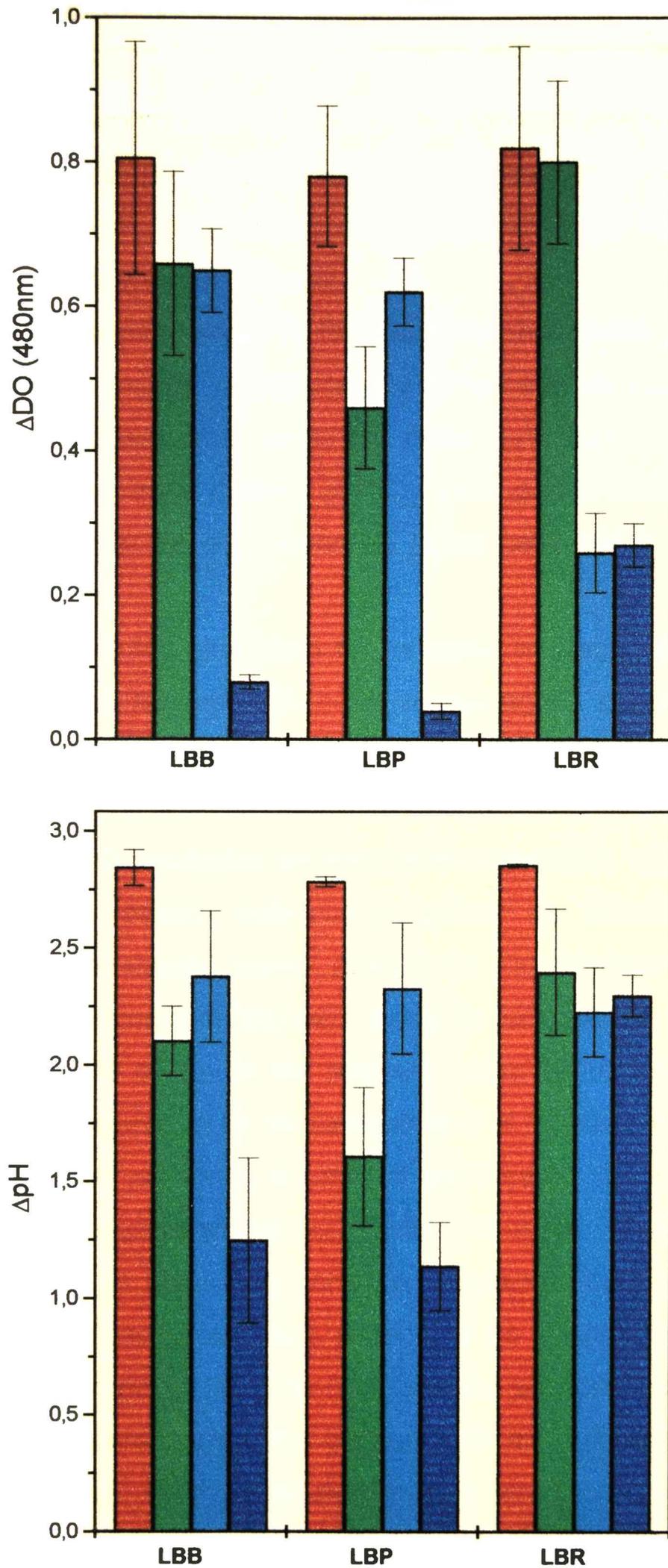
El agregado de 40 ppm de formiato a la leche permitió a las cepas LBB y LBP alcanzar a 30°C una masa similar o mayor que la obtenida a 44°C sin formiato. Estos efectos concuerdan con la producción de ácido, la cual es mayor en leche con formiato a 30°C que en leche sin formiato a 44°C.

Por otra parte, el formiato no estimuló ni el crecimiento ni la producción de ácido de la cepa LBR tanto a 30 como a 44°C. La masa bacteriana desarrollada a 30°C, tanto en presencia como en ausencia de formiato fue significativamente menor que la obtenida a 44°C después de 24 horas de incubación.

No se observaron diferencias significativas ($\alpha > 0.05$) para la cepa LBR en todas las condiciones de crecimiento, y para la cepa LBB incubada a 44°C. El menor estímulo observado a 44°C, puede deberse a que los cultivos de lactobacilos alcanzan la fase estacionaria a tiempos menores que a las 24 horas.

Estimulación de lactobacilos con formiato.

Figura 2-4: Efecto del formiato sobre el crecimiento y la producción de ácido de tres cepas de lactobacilos desarrolladas a 44°C, con  y sin  formiato y a 30°C con  y sin  formiato.



Influencia del formiato sobre la actividad proteolítica específica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

El desarrollo de éste punto del plan de trabajo está destinado a completar el objetivo propuesto para ésta segunda parte, que era determinar *si el formiato de sodio tenía algún efecto positivo sobre los lactobacilos, aplicable a la elaboración de quesos.*

Los experimentos se realizaron incubando temperatura subóptima (30°C), ya que durante la elaboración de quesos de pasta blanda la temperatura no sobrepasa los 32-34°C. Asimismo, también se realizaron ensayos a temperatura óptima (44°C), para poder relacionar los resultados con la elaboración de quesos de pasta semidura y dura y con la fabricación de yogurt.

El objetivo planteado fue analizar el efecto del formiato sobre la actividad proteolítica específica de suspensiones bacterianas obtenidas a partir de cultivos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* desarrollados en leche, utilizando leche diluída como sustrato para el ensayo enzimático.

En los resultados anteriormente expuestos, se vio que el formiato ejercía un gran efecto estimulante sobre la actividad acidificante, proteolítica (determinada como producción de nitrógeno TCA-soluble) y sobre el crecimiento de algunas cepas de lactobacilos. Por ello resultaba interesante probar el efecto del formiato sobre la actividad proteolítica específica del lactobacilo, a fin de determinar si el formiato intervenía en la síntesis de una nueva proteasa, durante el crecimiento; ó cambiaba la especificidad de la proteasa ya sintetizada, durante el ensayo enzimático.

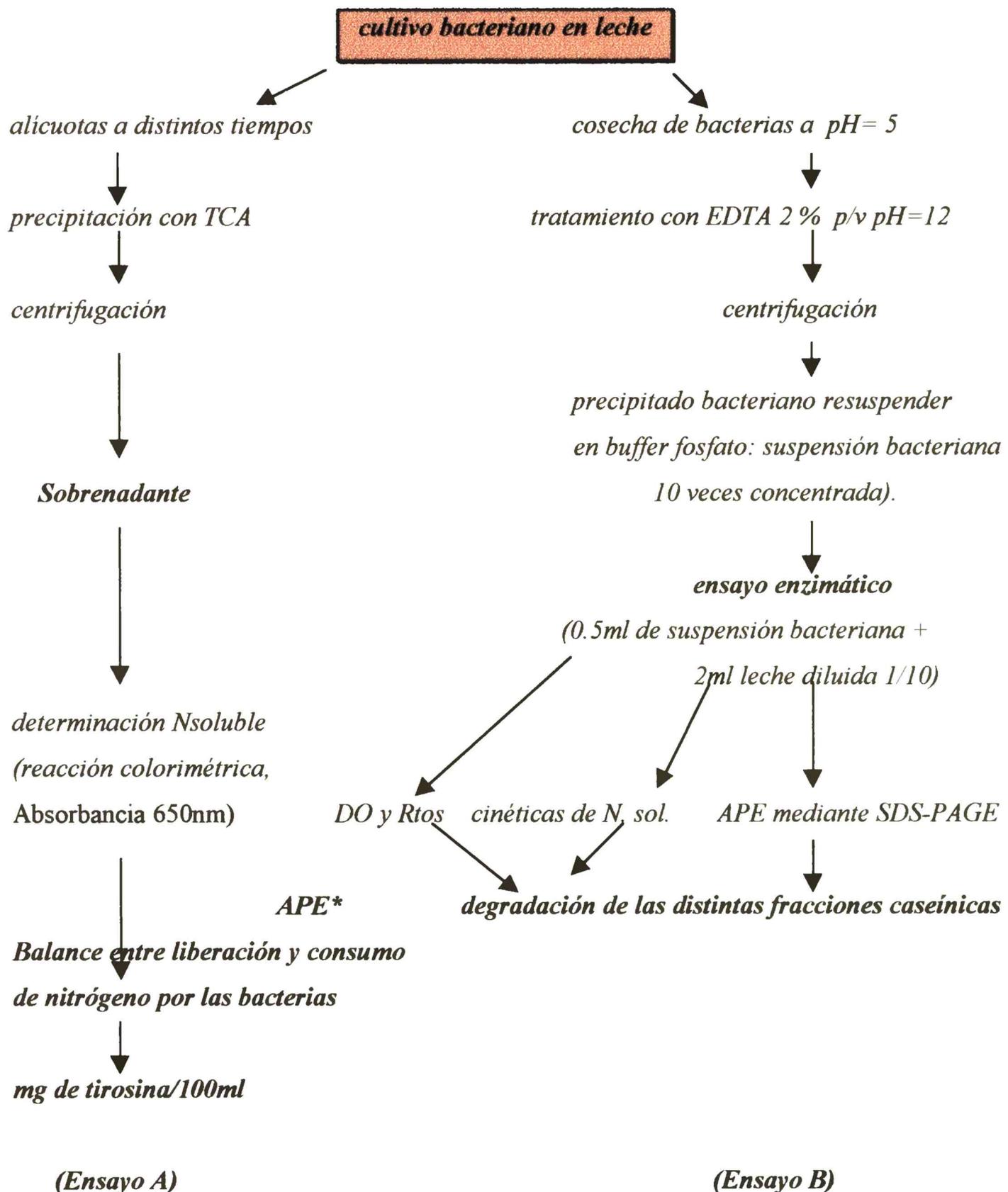
Con el objeto de poner en evidencia posibles diferencias, se estudió la actividad proteolítica específica de suspensiones bacterianas obtenidas a partir de cultivos de lactobacilos, en condiciones de no crecimiento, para independizarnos del consumo de aminoácidos y péptidos. Se utilizó leche diluida como sustrato ya que en leche concentrada queda una alta concentración de caseína intacta y por lo tanto no puede apreciarse la degradación producida por los lactobacilos. Entonces, buscábamos tener

Estimulación de lactobacilos con formiato.

alto número de bacterias y poca caseína, por lo que en los experimentos siguientes se utilizó leche diluida y suspensiones bacterianas 10 veces concentradas, conteniendo aproximadamente 10^9 ufc/ml; con la finalidad de visualizar en un gel la acción proteolítica de las bacterias y determinar que fracción caseínica se degrada en mayor proporción.

El estudio se realizó mediante cinéticas de nitrógeno TCA-soluble y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

El esquema experimental utilizado fue el siguiente: (figura 2-5)



*APE: Actividad proteolítica específica

Análisis de la actividad proteolítica de *L. bulgaricus*, mediante cinéticas de nitrógeno TCA-soluble (ensayo A).

Se analizó cómo variaba la actividad proteolítica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB, LBP y LBR) durante el crecimiento a 30°C, en presencia y ausencia de formiato.

Cuando las cinéticas de nitrógeno TCA-soluble se realizaron empleando cultivos bacterianos hubo liberación de aminoácidos y péptidos pero también consumo, ya que las bacterias se hallaban en condiciones de crecimiento exponencial.

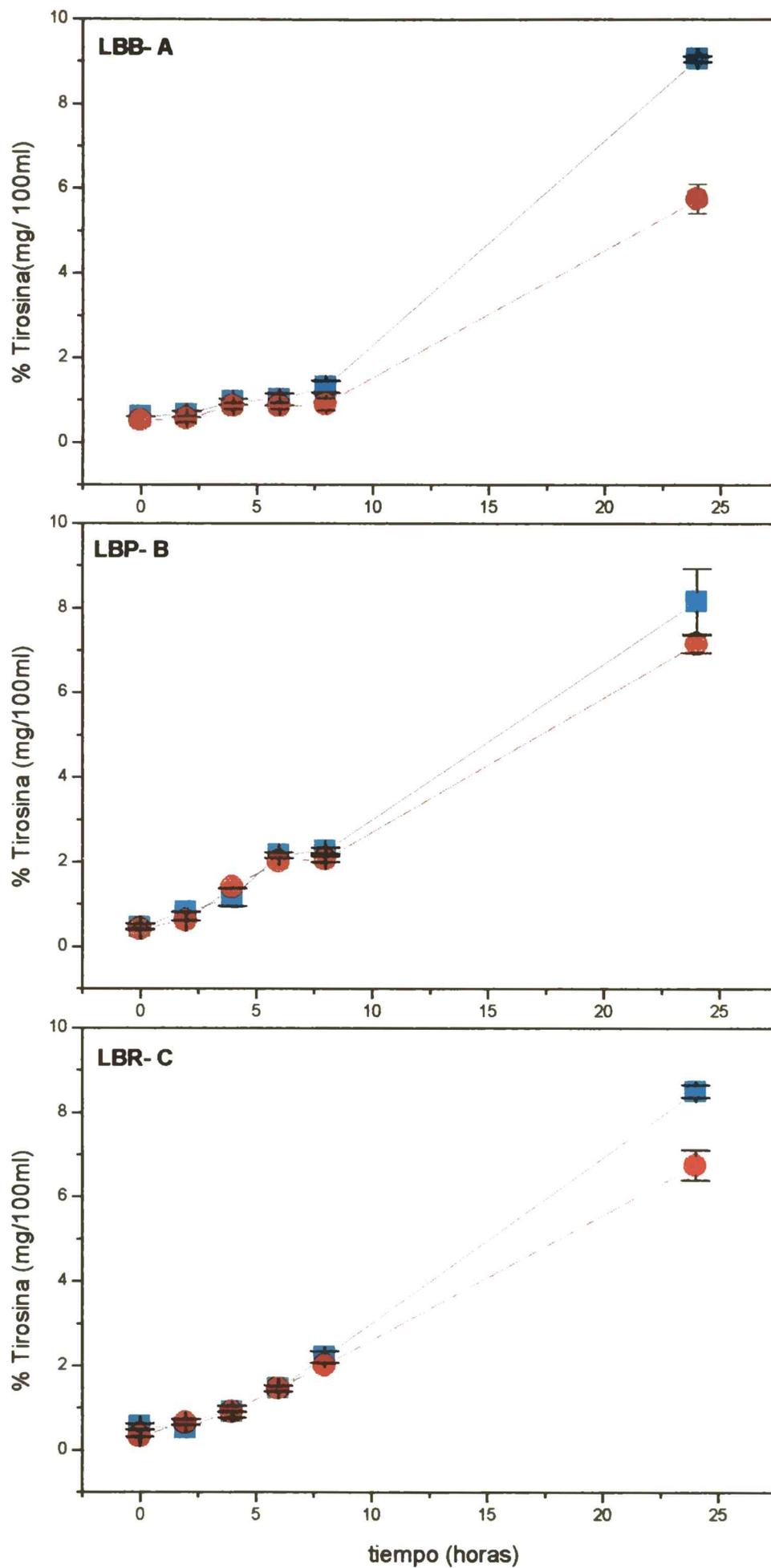
En la figura 2-6, se observa que la cepa LBB presentó un período de aproximadamente 10 horas en que no tuvo actividad proteolítica cuando fue desarrollada a 30°C. Esto coincide con lo visto previamente, en cuanto a su actividad acidificante y su crecimiento; en la figura (2-3-A y D) se había observado un período similar. No se observaron diferencias entre las muestras desarrolladas con y sin formiato durante las primeras 10 horas de incubación. Sin embargo, a las 24 horas el porcentaje de tirosina en las muestras desarrolladas con formiato fue mayor que en aquellas desarrolladas en ausencia de formiato.

Para las cepas LBP y LBR no se observaron diferencias en los valores de nitrógeno soluble alcanzado por las muestras desarrolladas en presencia y ausencia de formiato al cabo de 24 horas de incubación.

Los datos mostrados en la figura 2-6 corresponden al promedio de dos determinaciones, obtenidas de cultivos independientes.

Estimulación de lactobacilos con formiato.

Figura 2-6. Cinética de producción de nitrógeno TCA-soluble, en cultivos desarrollados en leche a 30°C, —■— con 40 ppm de formiato y ● sin formiato



Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

Análisis de la actividad proteolítica específica, por incremento de nitrógeno TCA-soluble: (ensayo B)

En una segunda etapa de análisis, con el objeto de determinar la carga de proteasas y peptidasas de las bacterias crecidas con y sin formiato, las mismas fueron desarrolladas en presencia y ausencia de formiato incubando a 30°C durante aproximadamente 20 horas (hasta que los cultivos llegasen a pH= 5). Posteriormente se cosecharon y lavaron, según se detalla en materiales y métodos. De ésta forma se obtuvieron suspensiones bacterianas 10 veces concentradas que se utilizaron para realizar ensayos enzimáticos, donde se determinó incremento de nitrógeno TCA-soluble por bacteria. Durante el ensayo enzimático no hubo variación de la densidad óptica, ni de los recuentos, lo que indica que las bacterias se encontraban en condiciones de no crecimiento bacteriano, solamente hubo liberación de aminoácidos y péptidos al medio.

Se estudió la actividad proteolítica específica, por incremento de nitrógeno TCA-soluble, utilizando suspensiones bacterianas (conteniendo $1-4 \times 10^9$ ufc/ml). Las suspensiones se obtuvieron a partir de cultivos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB, LBP y LBR) desarrollados en leche a temperatura subóptima (30°C) con y sin agregado de formiato. Es importante destacar que se igualó la carga bacteriana de las suspensiones con y sin formiato, por medidas de densidad óptica y por recuentos de bacterias lácticas. Posteriormente, se realizó el ensayo enzimático a 30 y 44°C (para poder comparar los resultados obtenidos a temperatura óptima y subóptima), utilizando leche diluida como sustrato para el ensayo, sin agregado de formiato. En éstas condiciones de incubación no se produjo crecimiento celular luego de 24 horas de incubación de acuerdo a determinaciones de densidad óptica.

Cuando el ensayo enzimático se realizó incubando a 30°C (figura 2-7-A, B y C), empleando suspensiones bacterianas de LBB se observaron importantes

Estimulación de lactobacilos con formiato.

diferencias entre las muestras desarrolladas en presencia y ausencia de formiato. Los valores de nitrógeno soluble obtenidos para la suspensión desarrollada en presencia de formiato fueron el triple respecto a los valores obtenidos para la suspensión sin formiato a las 24 horas de incubación (figura 2-7-A).

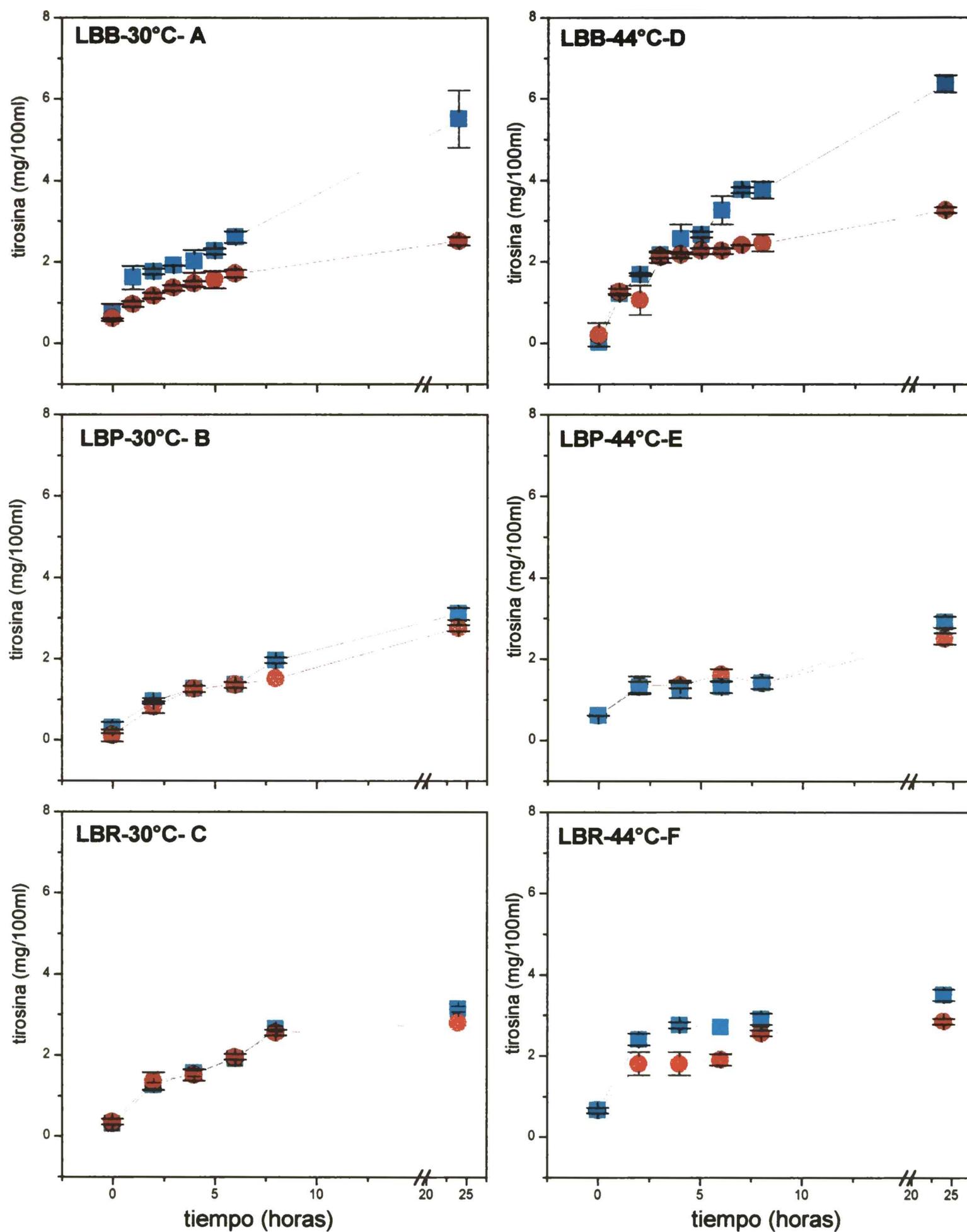
Cuando el ensayo se realizó a 44°C (figura 2-7-D, E y F), también se observaron importantes diferencias en la actividad proteolítica específica, alcanzando la muestra crecida con formiato un valor de nitrógeno soluble de aproximadamente el doble respecto a la muestra desarrollada en ausencia de formiato (figura 2-7-D). Cuando se utilizó la cepa LBB, se observó una mayor velocidad de proteólisis cuando las células habían sido crecidas en presencia de formiato, tanto a 30 como a 44°C. Además, al comparar la velocidad de proteólisis de LBB a las dos temperaturas utilizadas para la realización del ensayo enzimático, se observó que a 44°C tuvo mayor pendiente, es decir mayor velocidad de proteólisis que a 30°C.

Cuando se utilizaron suspensiones bacterianas de LBP y LBR, obtenidas a partir de cultivos desarrollados en leche con y sin formiato, para el ensayo enzimático a 30°C no se observaron diferencias en la velocidad de proteólisis y en los valores de Nitrógeno TCA soluble alcanzados por ambos cultivos al cabo de 24 horas de incubación (figuras 2-7-B y C). Los mismos resultados se observaron cuando el ensayo enzimático se realizó a 44°C (figuras 2-7-E y F). Tampoco hubo diferencias en la velocidad de proteólisis presentada por LBP y LBR a las dos temperaturas.

Los datos mostrados en la figura 2-7 corresponden al promedio de dos determinaciones, obtenidas de cultivos independientes.

Estimulación de lactobacilos con formiato.

Figura 2-7: Cinética de producción de nitrógeno TCA-soluble en ensayo enzimático realizado a 30 y 44°C, con suspensiones bacterianas desarrolladas a 30°C en presencia de 40 ppm de formiato (■) y sin formiato (●).



Los datos corresponden al promedio de duplicados obtenidos de cultivos independientes.

Estimulación de lactobacilos con formiato.

Análisis de la actividad proteolítica específica mediante SDS-PAGE:

(ensayo B)

Se utilizaron suspensiones bacterianas ($1-4 \times 10^9$ ufc/ml) de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB, LBP y LBR) obtenidas a partir de cultivos desarrollados en leche a 30°C con y sin agregado de formiato, realizando posteriormente el ensayo enzimático a 30 y 44°C, en leche diluida con y sin agregado de formiato. El objetivo de la realización de éste punto fue estudiar con mayor profundidad la degradación proteolítica producida por las distintas cepas de lactobacilos, esto significa analizar cuales fracciones de caseína eran degradadas en mayor proporción.

En las condiciones en que se realizaron los ensayos enzimáticos con las distintas cepas de lactobacilos no se produjo crecimiento celular luego de 48 horas de incubación, ya que la densidad óptica (DO_{480nm}) de la mezcla de reacción permaneció constante durante el ensayo.

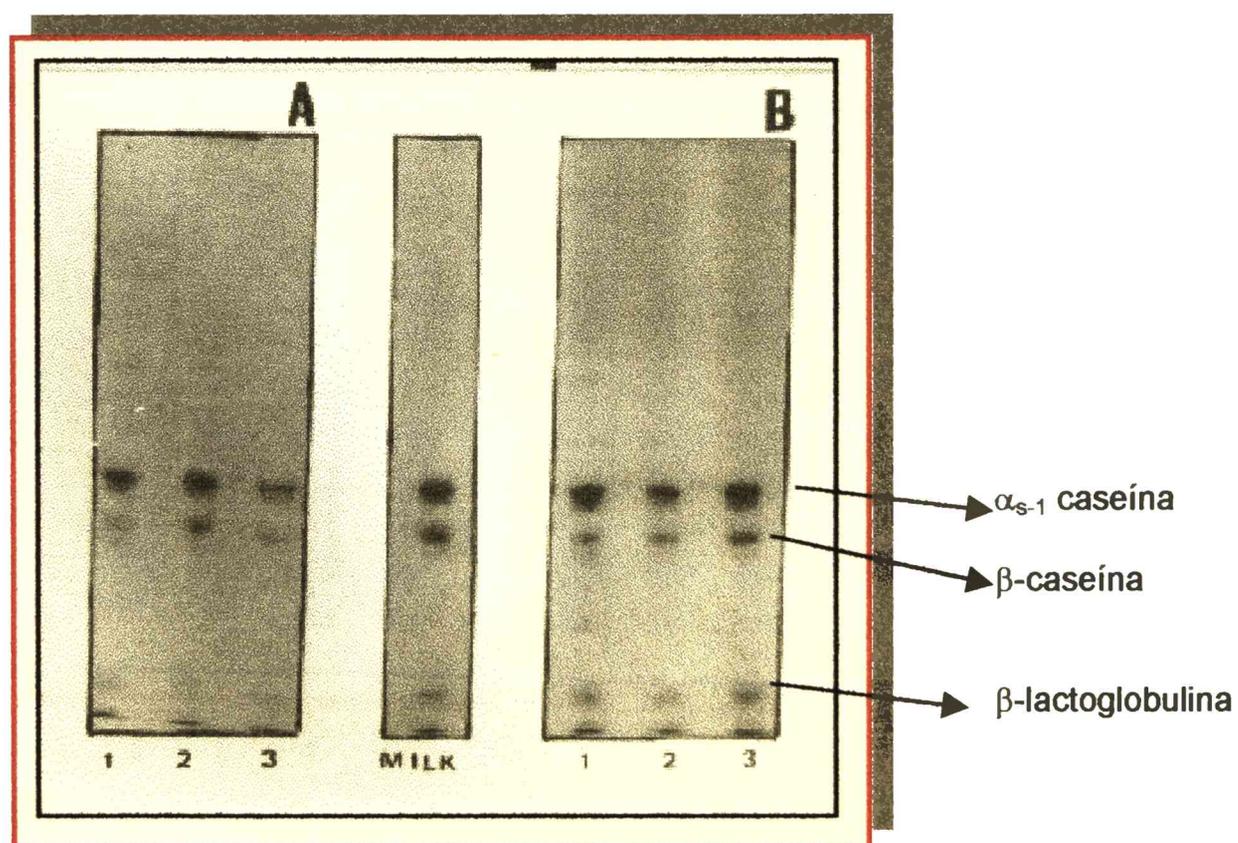
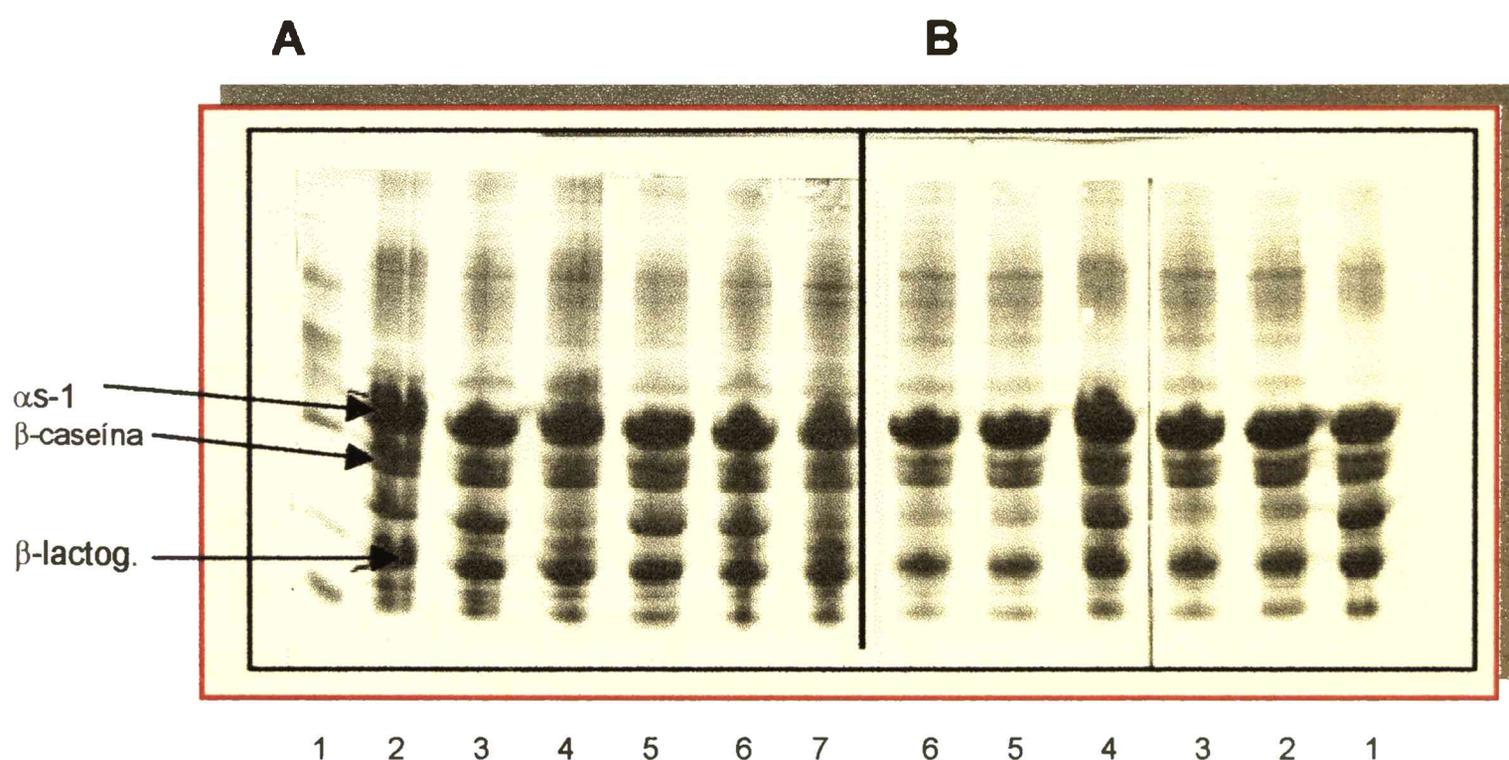


Figura 2-8 A y B: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad proteolítica específica de suspensiones bacterianas de LBB crecidas en leche a 30°C con y sin formiato y posterior ensayo enzimático en leche diluida sin formiato a 30°C.

Las calles 1, 2 y 3-A corresponden a LBB con formiato, la calle central corresponde al control de leche y las calles 1, 2 y 3-B corresponden a LBB sin formiato. Las muestras fueron incubadas durante 0.5 (calle 1 A y B), 24 (calle 2 Ay B) y 48 horas (calle 3 Ay B) a 30°C.

Estimulación de lactobacilos con formiato.

Las corridas electroforéticas (fig. 2-8-A y B), muestran que células crecidas con formiato presentaron una alta actividad proteolítica específica e hidrolizan α_{s-1} y β -caseína, luego de dos días de incubación a 30°C (calles 1 a 3 -A). Por el contrario, las células crecidas sin formiato no mostraron hidrólisis significativa de las fracciones caseinicas, durante igual período de incubación (calles 1 a 3 -B). La calle central corresponde al control de leche. Por otra parte, LBB crecida con formiato tiene la habilidad de hidrolizar β -lactoglobulina, mientras que LBB crecida sin formiato no posee dicha capacidad, al menos cuando se incubó durante dos días (calles 3-A y 3-B). Una concentración bacteriana 10 veces mayor no le permitió a las bacterias crecidas sin formiato degradar α_{s-1} -caseína y β -lactoglobulina. De modo que la habilidad para degradar α_{s-1} caseína estaría dada por un cambio en la especificidad de la enzima o en la producción de una nueva proteasa. Estos cambios serían inducidos por el formiato durante el crecimiento bacteriano.



Figuras 2-9-A y B: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad caseinolítica específica de suspensiones bacterianas de LBP y LBR crecidas en leche a 30°C con y sin formiato y posterior ensayo enzimático en leche diluida en ausencia de formiato a 30°C.

La calle 1-A corresponde al patrón de peso molecular; las calles (2, 3 y 4) corresponden a LBP sin formiato y las calles 5, 6 y 7 corresponden a LBP con formiato (2-9-A). En la figura 2-9-B, se observa el comportamiento electroforético de la cepa LBR, las calles 1, 2 y 3 corresponden a LBR con formiato, las tres calles siguientes (4, 5 y 6) corresponden a LBR sin formiato. Las muestras fueron incubadas durante 0.5 (calles 2 y 5-A y 1 y 4-B), 24 (calles 3 y 6-A y 2 y 5-B) y 48 horas (calles 3 y 7-A y 3 y 6-B).

Los resultados indican que no existen diferencias entre la degradación proteolítica producida por las cepas LBP y LBR en las dos condiciones ensayadas (fig. 2-9-A y B).

En resumen:

*Cuando se utilizaron suspensiones bacterianas de LBB la *presencia de formiato durante el crecimiento hacía posible la degradación de α y β -caseína y β -lactoglobulina, mientras que sin formiato en el crecimiento, LBB solamente degradaba β -caseína* (figura 2-8).

*Cuando se utilizaron suspensiones bacterianas de LBP y LBR no hubo degradación de α -caseína y β -lactoglobulina en ninguna condición, la β -caseína aparece degradada en igual en todas las condiciones ensayadas. *El formiato no aumenta la actividad proteolítica de LBP y LBR a 30°C* (figura 2-9).

Posteriormente, se decidió realizar el ensayo enzimático en iguales condiciones a las utilizadas anteriormente, pero incubando a 44°C.

En la *figura 2-10* se observa que, al utilizar suspensiones bacterianas de LBB la degradación de β -caseína se produjo ya a las 0.5 horas, tanto cuando las bacterias fueron crecidas en presencia como en ausencia de formiato. Por otro lado, la fracción α -caseína solamente aparece degradada cuando las bacterias fueron crecidas en presencia de formiato. Tanto cuando las bacterias fueron crecidas en presencia como en ausencia de formiato no fueron capaces de hidrolizar la β -lactoglobulina.

Para una misma condición (por ejemplo 2 días crecimiento con formiato) la actividad proteolítica específica de suspensiones bacterianas de LBB fue mayor a 30 que a 44°C.

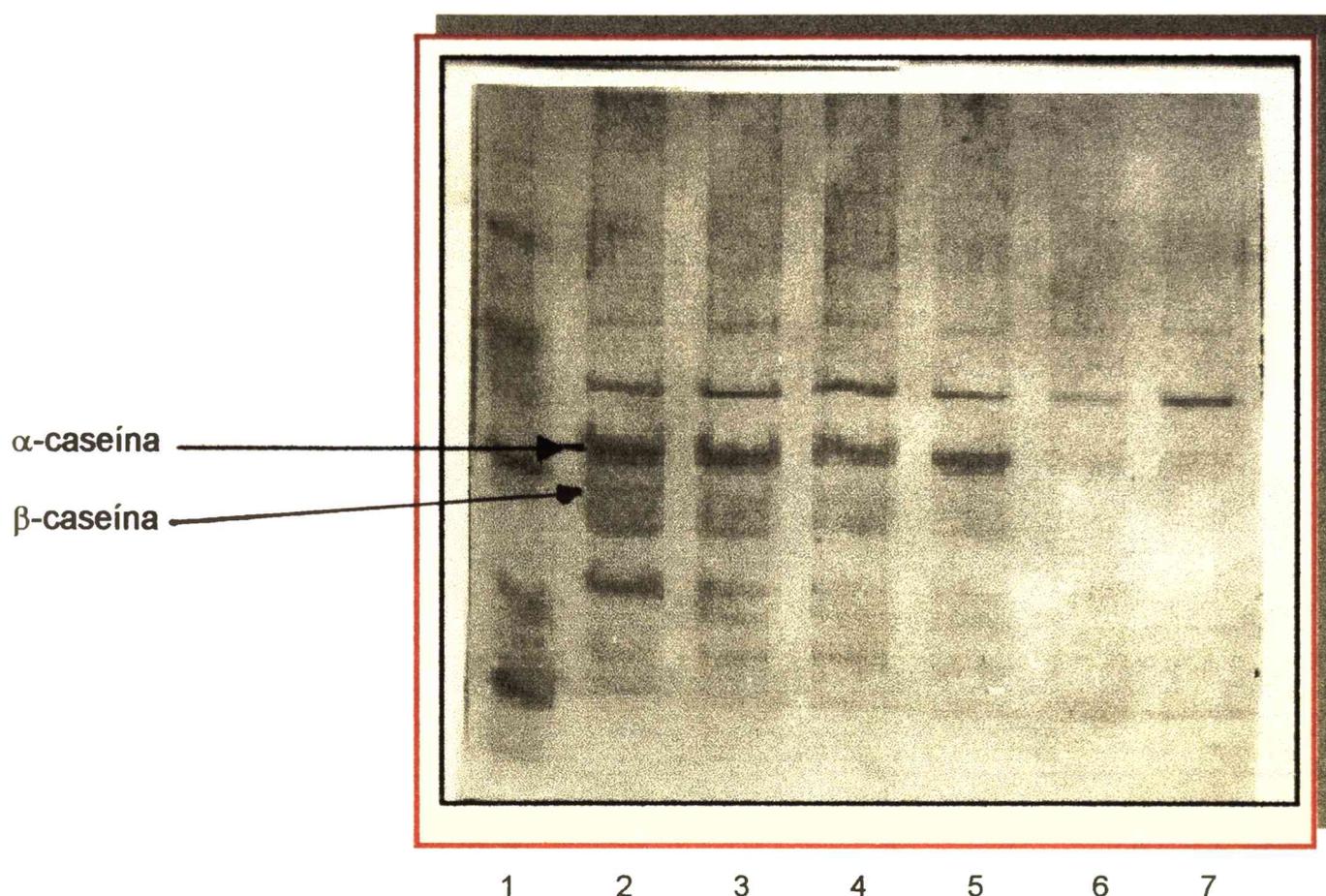
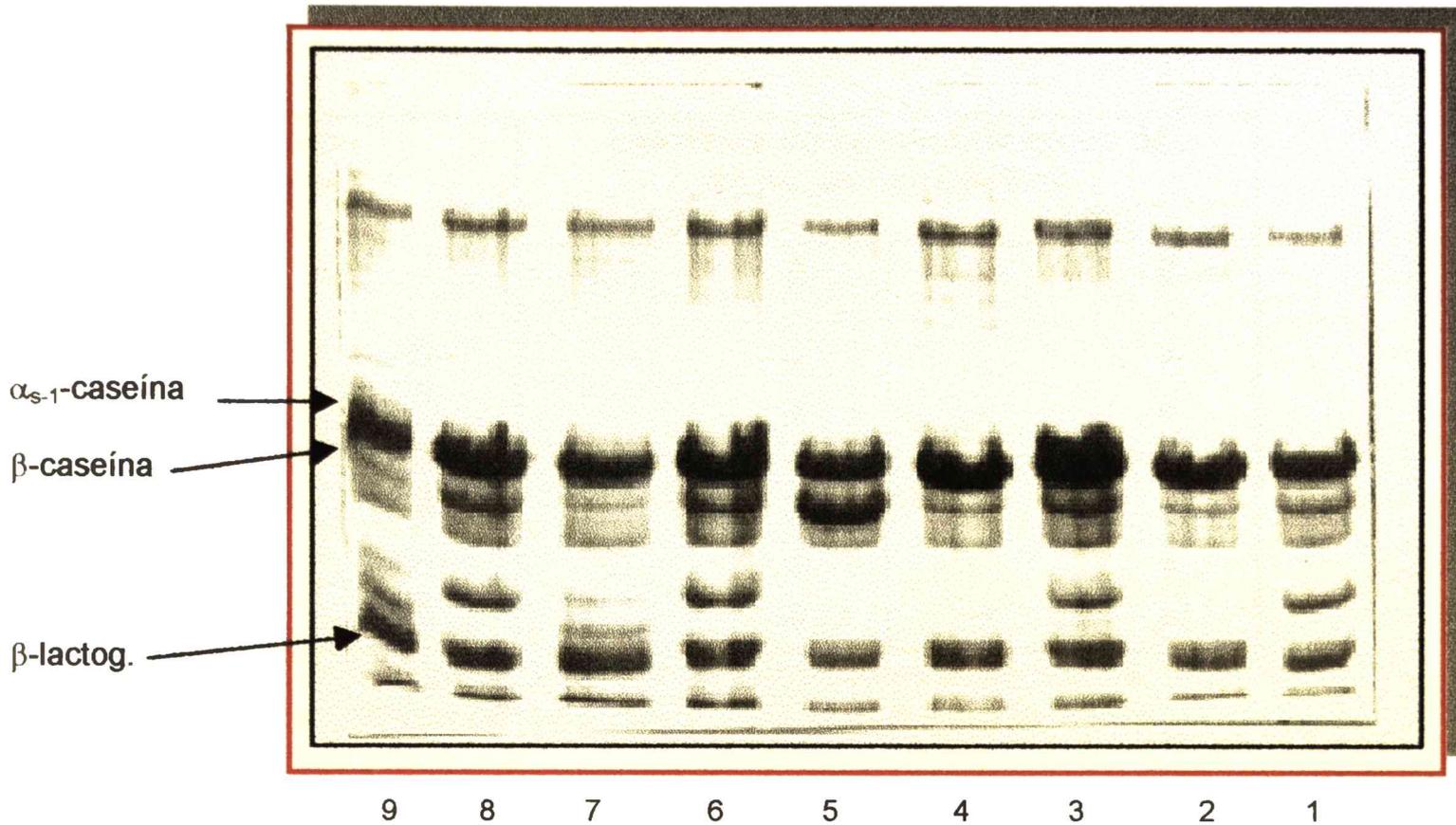


Figura 2-10: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad proteolítica específica de suspensiones bacterianas de LBB crecidas en leche con y sin formiato a 30°C y posterior ensayo enzimático en leche diluida sin formiato a 44°C.

La calle 1 corresponde al patrón de peso molecular, las calles 2, 3 y 4 corresponden a muestras obtenidas a partir de cultivos desarrollados con formiato. Las calles 5, 6 y 7 corresponden a LBB sin formiato en el crecimiento. Las muestras incubadas durante 0.5 (calles 2 y 5), 24 (calles 3 y 6) y 48 horas (calles 4 y 7).

En la *figura 2-11* al utilizar las suspensiones bacterianas obtenidas a partir de las cepas LBP y LBR, se observa que no hubo diferencias en la degradación proteolítica producida por las muestras desarrolladas en presencia y ausencia de formiato, cuando el ensayo enzimático se realizó a 44°C. No hubo degradación de α -caseína, mientras que la β -caseína fue degradada en igual grado en ambas condiciones. La β -lactoglobulina no fue degradada tanto en la muestra con formiato como en la sin formiato.



Figuras 2-11: Efecto del formiato de sodio sobre la actividad caseinolítica específica de suspensiones bacterianas de LBP y LBR crecidas en leche con y sin formiato a 30°C y posterior ensayo enzimático en leche diluida en ausencia de formiato a 44°C.

Las calles 1, 2, 3 y 4 corresponden a LBP con y sin formiato respectivamente, a tiempo 0.5 (calles 1 y 3) y 48 horas (calles 2 y 4). La calle 5 corresponde al control de leche y las cuatro últimas calles (6 a 9) corresponden a LBR con y sin formiato en el crecimiento respectivamente, a tiempo 0.5 (calles 6 y 8) y 48 horas (calles 7 y 9).

Con el objeto de determinar la acción del formiato durante el crecimiento a 44°C, se utilizó el mismo esquema experimental detallado en la figura 2-5, (ensayo B). En éste caso se determinó la actividad proteolítica específica empleando suspensiones bacterianas obtenidas a partir de cultivos desarrollados a 44°C con y sin formiato y posterior ensayo enzimático a 30 y a 44°C (tabla 2-3).

Al utilizar las cepas LBB, LBP y LBR, no se observaron diferencias entre las muestras desarrolladas en presencia y ausencia de formiato a 44°C, solamente hubo degradación de β -caseína. El formiato no aumenta la habilidad proteolítica de LBB cuando se agrega durante el crecimiento a 44°C.

Estimulación de lactobacilos con formiato.

Para resumir todos los resultados anteriormente expuestos, se presentan las siguientes tablas (2-3 y 2-4):

Suspensión bacteriana		hidrólisis de caseína después de 48 hs. de incubación*			
		30°C		44°C	
		α_{s-1}	β	α_{s-1}	β
LBB	FS+	-	+	-	+
	FS-	-	+	-	+
LBP	FS+	-	+	-	+
	FS-	-	+	-	+
LBR	FS+	-	+	-	+
	FS-	-	+	-	+

Tabla 2-3: APE de suspensiones bacterianas obtenidas a partir de cultivos desarrollados a 44°C con y sin formiato y posterior ensayo enzimático en leche diluida a 30 y 44°C (SDS-PAGE).

+ : positivo -: negativo

FS+: crecimiento en presencia de formiato

FS-: crecimiento en ausencia de formiato

Suspensión bacteriana		hidrólisis de las proteínas de leche después de 48 hs. de incubación*					
		30°C			44°C		
		α_{s-1} caseína	β -caseína	β -lactoglob.	α_{s-1} caseína	β -caseína	β -lactoglob.
LBB	FS+	+	+	+	+	-	
	FS-	-	+	-	-	-	
LBP	FS+	-	+	-	-	-	
	FS-	-	+	-	-	-	
LBR	FS+	-	+	-	-	-	
	FS-	-	+	-	-	-	

Tabla 2-4: Actividad Proteolítica Específica (APE) de suspensiones bacterianas obtenidas a partir de cultivos desarrollados a 30°C con y sin formiato y posterior ensayo enzimático en leche diluida a 30 y 44°C (SDS-PAGE).

+ : positivo -: negativo

FS+: crecimiento en presencia de formiato

FS-: crecimiento en ausencia de formiato

*Cabe aclarar que todos los resultados observados en los geles, que se resumen en ésta tabla, corresponden a los experimentos realizados por triplicado.

CONCLUSIONES:

♣ LBB fue la cepa más estimulada por el agregado de formiato de sodio, en su crecimiento, actividad acidificante y proteolítica, tanto cuando se desarrolló a 30 como a 44°C. Además, las suspensiones bacterianas obtenidas a partir de cultivos de LBB desarrollados a 30°C con formiato fueron más proteolíticas que aquellas crecidas sin él; tanto cuando el ensayo se realizó a 30 como a 44°C. Estos resultados indican que bacterias crecidas en leche con formiato tenían mayor actividad proteolítica específica, ya que fueron capaces de hidrolizar α_{s-1} caseína y una proteína de suero, la β -lactoglobulina, mientras que bacterias crecidas en leche sin formiato sólo fueron capaces de hidrolizar β -caseína.

♣ La cepa LBP fue estimulada en menor grado, tanto a 30 como a 44°C, por el agregado de formiato durante su crecimiento.

♣ Sobre la actividad metabólica y el crecimiento de las cepas LBR, LBA, LB1233 y ATCC11842 el formiato no produjo efecto estimulante, tanto a 30 como a 44°C.

♣ Las cepas LBP y LBR no aumentaron su actividad proteolítica específica por el agregado de formiato durante su crecimiento, tanto cuando el ensayo se llevó a cabo a 30 como a 44°C.

TERCERA PARTE

“Elaboración de quesos

de pasta blanda”

Introducción

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados y Discusión

Conclusiones

INTRODUCCION

La elaboración de quesos consta de dos procesos fundamentales: *fermentación ácido láctica y reducción del contenido acuoso*, (Zalazar, Meinardi, Bernal y Candiotti, 1980).

La fabricación de un queso comprende tres fases fundamentales:

a-formación de un gel de caseína. Es el *cuajado o coagulación* de la leche.

b-la deshidratación parcial de este gel por sinéresis, es decir por contracción de las micelas que lo forman. Es el *desuerado* de la cuajada.

c-la maduración enzimática del gel deshidratado. Es el *afinado o maduración* de la cuajada, del que es responsable, en primer lugar, la proliferación de determinados microorganismos (Meinardi, 1994).

El *desuerado* de la cuajada no es una simple deshidratación. Junto con el agua, se separan también los constituyentes solubles de la leche, lactosa y sales minerales, en cantidad más o menos grande, así como las proteínas no floculadas en el curso del cuajado.

La *coagulación y el desuerado* constituyen operaciones destinadas a separar los elementos de la leche que sufrirán luego la acción de las enzimas (Veisseyre, 1980).

La producción de ácido en cantidad adecuada es el paso clave para obtener un buen queso. La producción de ácido láctico afecta varios aspectos de la fabricación, como la sinéresis del gel, ésta controla la humedad del queso y por consiguiente regula el crecimiento de bacterias y la actividad enzimática.

La proporción y duración de la sinéresis depende de la composición de la leche, concentración de calcio y caseína, pH del suero, temperatura de cocción, tiempo y tipo de agitación de la mezcla suero-cuajada (Fox, 1987).

Aptitud de la leche para la elaboración de quesos:

La aptitud de la leche para la fabricación de quesos depende de sus caracteres organolépticos y fisico-químicos, y de la naturaleza de su microflora. Es apta cuando posee un color, sabor, olor y composición normales y cuando cuenta con una microflora apropiada y una buena aptitud para la coagulación.

La mayor parte de la leche utilizada en la fabricación de quesos es pasteurizada; proceso térmico por medio del cual nos aseguramos, desde el punto de vista higiénico, la eliminación de bacterias patógenas del queso. Durante la *pasteurización* algunas bacterias útiles en el proceso de fabricación del queso son destruidas, al igual que algunas enzimas de la leche, como lipasas, muy importantes en el desarrollo del aroma de un queso (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Las condiciones de *temperatura y tiempo* utilizados en la pasteurización de la leche para quesería, dependen del objetivo, que nos planteemos para dicho tratamiento térmico. De este modo, usaremos bajas temperaturas si deseamos mantener intactas las lipasas; pero si nuestro objetivo es destruir todas las bacterias patógenas, deberemos emplear altas temperaturas (71°C, 15").

Durante la pasteurización la aptitud de la leche se ve afectada para una coagulación posterior, y esto se debe a la precipitación de las sales de calcio y al descenso de la acidez provocado por el desprendimiento de CO₂; por eso es necesario incorporar sales cálcicas a las leches pasteurizadas, destinadas a la elaboración de quesos. La pasteurización reduce, además, el diámetro de las micelas de caseína, lo que también afecta negativamente a la aptitud de la leche para la coagulación (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Maduración y Fermentación de la leche:

La leche fresca, recién ordeñada, posee propiedades bacteriostáticas, por lo que los microorganismos no pueden desarrollarse en ella. Contiene *inhibidores*, tales como las lacteninas I y II, también conocidas con el nombre de lisozima; la leche en éstas condiciones no puede destinarse a la fabricación de un queso, necesita un tratamiento previo, ha de someterse a un proceso de *maduración* tendiente a elevar un poco su acidez.

La maduración de la leche es consecuencia de la proliferación de las bacterias acidolácticas, que la fermentan produciendo ácido láctico. La fermentación láctica debe interrumpirse en el momento adecuado, y dicho tiempo varía con el tipo de queso a elaborar (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

El método más seguro para madurar la leche pasteurizada consiste en añadirle fermentos bacterianos, para lo cual se pasteuriza primero la leche a 68-72°C, se enfría luego a 20-22°C y se le añade un 0,5-0,8% de fermentos lácticos. La maduración de la leche es imprescindible, ya que tanto en la cuba de cuajado, como durante las primeras etapas de maduración del queso, debe proseguir la fermentación láctica; 1ml de leche destinada a la elaboración de queso debe contener antes de su coagulación de 3 a 15 millones de bacterias acidolácticas.

Desde el punto de vista de la industria quesera, las fermentaciones más importantes son *la láctica*, *la propiónica* y *la butírica*; aunque ésta última es peligrosa.

La *fermentación láctica* se basa en la producción espontánea de ácido láctico por las bacterias lácticas, cuando utilizan los azúcares como fuente de carbono y energía, es una capacidad sumamente explotada industrialmente. Es el proceso que se trata de favorecer en la elaboración de cualquier producto lácteo fermentado (quesos, yogur, manteca, etc), pero que debe reprimirse durante el almacenamiento de leche cruda destinada a tratamientos industriales por calor (pasteurización, esterilización), ya que un incremento de acidez disminuye su aptitud al tratamiento térmico.

En la leche fresca, recién ordeñada, el ácido láctico se encuentra sólo en trazas (20 a 30 mg/l), incrementándose luego rápidamente su concentración por el desarrollo de las bacterias lácticas. Estas producen uno u otro tipo de isómero y en concentraciones variables según el género. La importancia del tipo de isómero que se produce está relacionada con el hecho de que los alimentos que tienen L(+) láctico son los más recomendados, dado que el D(-) láctico resulta no fisiológico, principalmente en niños, (Reinheimer, 1994).

La *fermentación propiónica* participa en la maduración de quesos con ojos, es consecuencia de la actividad metabólica de la microflora presente en la leche cruda y de la de los fermentos propiónicos sembrados.

La *fermentación butírica* es producida por clostridios butíricos que a partir de la lactosa y el ácido láctico producen ácido butírico, anhídrido carbónico e hidrógeno a través de complejos procesos metabólicos. La fermentación

butírica constituye un problema en quesería; afecta desfavorablemente al sabor del producto acabado y provoca su hinchazón.

Los sistemas enzimáticos de los microorganismos que constituyen la microflora del queso catalizan los complejos procesos bioquímicos de la maduración, influyendo en las propiedades organolépticas características de cada variedad.

Todas las condiciones que se controlan (grado de maduración de la leche, temperatura de coagulación, temperatura a la que se calienta la cuajada, tamaño del grano, grado de desuerado), tienden a crear condiciones óptimas para la proliferación de determinados grupos de microorganismos (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Coagulación o Cuajado de la leche:

Consiste en la floculación de las *micelas de caseína*, que se sueldan para formar un gel compacto, aprisionando el líquido de dispersión que es el *suero*.

Para lograr la floculación, en quesería, se recurre a la acidificación láctica y al cuajo, ninguno de éstos dos métodos se utiliza aisladamente. Por lo general, las cuajadas se obtienen por acción simultánea del *cuajo* y del *ácido láctico*, proveniente de la transformación de la lactosa por las bacterias lácticas (Meinardi, 1994).

Coagulación ácida: el ácido láctico, resultante de la fermentación láctica, reduce el pH de la leche provocando la alteración de las micelas de caseína. Cuando el pH de la leche llega a 5,2 a 20°C, las micelas se han desestabilizado, de tal manera que se aglomeran y forman un gel láctico. A éste pH la desmineralización no es total; para alcanzar este estado es necesario acidificar la leche, hasta un pH=4,6 que corresponde al *punto isoeléctrico* de la caseína.

Para favorecer la fermentación láctica, es conveniente controlar la *temperatura* de la leche, dentro del rango requerido para el óptimo crecimiento de las bacterias lácticas; que la *población microbiana* sea la adecuada, tanto en calidad, como en cantidad y que el *medio* sea apto para

el desarrollo de los microorganismos deseados. La *pasteurización* previa de la leche, seguida de la siembra con las bacterias lácticas apropiadas es un método eficaz para la coagulación láctica. Además es necesario asegurarse la ausencia de *antisépticos* y *antibióticos* (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Cuando se elabora queso Cuartirolo, sin iniciadores, se mantiene la leche a una temperatura entre 22 y 30°C durante un período relativamente largo para permitir la multiplicación de las bacterias lácticas. Si se utiliza un iniciador láctico natural, se añade a la leche en la proporción adecuada (alrededor de 1%) y a una temperatura de 30-34°C (Belfiore, 1979).

Coagulación enzimática: Cuando se añade a la leche tibia una cantidad suficiente de cuajo, se produce la *coagulación enzimática*, en la cual la caseína se halla en forma de un complejo de *fosfoparacaseinato de calcio*; las micelas de caseína, cuya estructura se ha modificado, se agregan en flóculos y después en fibras que finalmente constituyen una red tridimensional, que contiene en su interior el lactosuero y los glóbulos grasos.

Berridge ha puesto de manifiesto que la acción del cuajo sobre la leche se realiza en dos fases:

1-transformación de la caseína, en paracaseína (proceso enzimático).

2-coagulación de la paracaseína bajo la acción de los iones calcio, en esta fase gelifica y forma la cuajada. Estas dos fases son independientes y sucesivas; para la primera fase no es necesario trabajar a altas temperaturas (puede desarrollarse a temperaturas entre 2-5°C), y no necesita la presencia de calcio iónico, basta con el cuajo. La cuajada se forma en la segunda fase, que es consecuencia de la interacción entre la paracaseína y los iones calcio. Necesariamente la temperatura debe ser elevada.

La velocidad máxima de coagulación de la leche, bajo la acción del cuajo se produce a una temperatura de 40-41°C; a temperaturas más altas la enzima se inactiva parcialmente, necesitando entonces más tiempo para que su acción se manifieste. En disolución acuosa se inactiva totalmente a 65°C. La acción del cuajo generalmente se realiza a una temperatura de 37°C, para favorecer el desarrollo de las bacterias ácido-lácticas.

La actividad del cuajo depende de la cantidad utilizada y de la temperatura, acidez, y contenido en sales cálcicas de la leche.

Si el resto de los factores permanecen invariables, se da una relación inversa, entre la dosis de cuajo utilizada y el tiempo de coagulación; cuanto más alta sea la dosis, menos tiempo tarda un volumen de leche en coagular, si la acidez y la temperatura se mantienen constantes y próximas al óptimo (ley cantidad-tiempo de Storch y Segelke). Esta ley sólo es válida dentro del rango de cantidad de cuajo normalmente usado en quesería. Aunque se empleen disoluciones muy concentradas ó dosis muy altas de cuajo, la coagulación no comienza hasta pasado cierto tiempo. Si la cantidad añadida es muy baja, la leche no llega a coagular.

El tiempo de coagulación desciende a medida que el pH va aproximándose a 6,0-6,4. La actividad del cuajo sobre una leche calentada a temperaturas superiores a 65-70°C, difícilmente coagule debido a la insolubilidad de las sales de calcio.

La actividad del cuajo aumenta añadiendo a la leche una cantidad adecuada de sales cálcicas; que aumenta el contenido de calcio iónico y, por lo tanto favorece la coagulación. El Cl_2Ca favorece, además, el endurecimiento de la cuajada y el desuerado y también facilita la retención de la grasa en la cuajada.

Otros factores a tener en cuenta, para una adecuada acción del cuajo sobre la leche son: contenido de la leche en fosfato cálcico coloidal que sensibiliza la paracaseína a los iones calcio. Para una concentración dada de sales de calcio solubles, el tiempo de coagulación disminuye a medida que el contenido en fosfato cálcico coloidal aumenta.

La dimensión de las micelas de caseína también es muy importante; existe una relación inversa entre el tamaño de las micelas y el tiempo de coagulación.

El contenido elevado de proteínas solubles en la leche que siempre va acompañada de una disminución del contenido en caseína, se traduce en dificultades para la coagulación (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Características del coágulo enzimático:

Son bien conocidas por el industrial quesero; el coágulo enzimático es flexible, elástico, compacto e impermeable y contráctil. Esta última propiedad permite efectuar el desuerado.

Su carácter compacto tolera la intervención de acciones mecánicas potentes que facilitan la contracción del coágulo y la salida del suero. Sin esta acción, el gel no desuera debido a su impermeabilidad.

Para la elaboración de quesos blandos se utilizan temperaturas de coagulación bajas y para la elaboración de quesos duros, temperaturas más altas. Si el grado de acidez y el contenido en grasa son normales, la temperatura de coagulación para la elaboración de quesos duros debe oscilar entre 32 y 35°C, y para la de quesos blandos entre 28 y 30°C. En la práctica la coagulación por cuajo suele tener lugar en 20-60 minutos y en la mayoría de los casos en 30-40 minutos.

Debe intentarse reducir el tiempo de coagulación a 15-30 min., acelerando la maduración mediante la adición de fermentos y añadiendo sales cálcicas (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Manipulación de la cuajada.

Modificaciones experimentadas por la cuajada durante el lirado.

El objetivo perseguido por el tratamiento que recibe la cuajada en la cuba es fundamentalmente el de crear, mediante el desuerado y la manipulación de la cuajada, condiciones favorables para el desarrollo de los procesos microbiológicos y enzimáticos implicados en la elaboración de quesos. Al término de la manipulación o trabajo la cuajada debe retener determinada cantidad de suero.

En la cuajada prosigue la fermentación láctica y la proliferación microbiana. A medida que va ganando en firmeza, los elementos estructurales de la cuajada se aproximan más, se va reduciendo la capacidad de los espacios capilares y va disminuyendo el suero que contienen. Al principio, la cuajada contiene tanta agua como la propia leche, una proporción excesiva para el queso. De ahí la necesidad de expulsar parte de ella, lo que se logra destruyendo la estructura cerrada y la impermeabilidad de la cuajada rompiéndola en granos de un tamaño que depende del tipo de queso a

elaborar (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

La deshidratación parcial del gel por *sinéresis* es una etapa necesaria durante la elaboración de quesos, ya que permite:

- asegurar la conservación; a mayor a_w más perecedero será el producto.
- regular la fermentación y el pH. En la concentración del coágulo se elimina, con el suero, la mayor parte de la lactosa. El azúcar retenido en la cuajada debe ser el necesario para que, transformado en ácido láctico, ajuste el pH al óptimo de maduración.
- que el producto alcance la consistencia adecuada.
- regular el desarrollo microbiano, el a_w y el pH acorde a cada tipo de queso.
- regular el balance de sales minerales (Meinardi, 1994).

Se han desarrollado varios métodos para medida experimental de la sinéresis y el efecto que algunas variables producen sobre ella, como pH, temperatura, concentración de sal, composición de la leche, y efectos de pre-tratamientos realizados a la leche (Pearse y Mackinlay, 1989).

Cuando la cuajada toma una consistencia adecuada, se corta suavemente con la lira, con una separación entre los alambres, que dependerá del tipo de queso que se está elaborando (ej.: para quesos de pasta blanda se cortarán cubos de un tamaño de 2 a 3 cm). Hay que dar tiempo para que aparezca un suero transparente, dejando unos minutos en reposo y después continuando el corte usando la lira manual normal o la mecánica, hasta obtener en el segundo lirado, cubos de 1cm. Se deja luego en reposo, durante 25-30 minutos, y durante este período tiene que ser agitado de vez en cuando y con cuidado (Belfiore, 1979).

El *troceado* o *lirado* del gel tiene también como objetivo multiplicar la superficie de exudación y, por lo tanto, favorecer la evacuación del lactosuero.

Según el tipo de queso, el troceado será más o menos intenso; es decir para quesos de pasta blanda se realizará un troceado simple, con la finalidad de obtener cubos grandes; mientras que en los quesos de pasta firme la cuajada se cortará en cubos muy pequeños. La superficie de exudación aumenta linealmente con la intensidad del troceado, por lo tanto, en el primer

caso, se obtendrán cuajadas menos desueradas y más húmedas que en el segundo caso (David, 1965).

Hay otros parámetros importantes que imponen límites al troceado. Cuando es muy intenso, las partículas de coágulo resultantes son muy finas y retienen una cantidad de suero más elevada que la prevista. La excesiva multiplicación de la superficie favorece la elevada hidratación de las partículas, que el prensado difícilmente pueda remediar. Por lo tanto, existe para cada tipo de queso una dimensión óptima de los granos que permite un desuerado correcto.

No debe realizarse un troceado prematuro sobre un gel demasiado blando, pues se corre el riesgo de pulverizar la cuajada, y provocar importantes pérdidas de grasas y proteínas (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Al practicar la "rotura", parte del suero abandona la cuajada y la carga microbiana se reparte entre ambas fases; la mayor parte permanece en los granos, y con el suero se va entre 1/7 y 1/9 de la carga total. Más tarde el valor del cociente gérmenes de la cuajada/ gérmenes del suero aumenta aún más, ya que los microorganismos se multiplican mucho más rápidamente en los granos de la cuajada que en el suero; porque los primeros contienen más proteínas, cuyo poder tampón los protege frente al ácido láctico. El cociente microorganismos de los granos de cuajada/ microorganismos del suero resulta especialmente alto en el momento de proceder a la extracción de la cuajada de la cuba, para comenzar el moldeo (Veisseyre, 1980 Dilanjan, 1984).

Factores que intervienen en el desuerado y en los procesos microbiológicos que se desarrollan en la cuajada.

En la fabricación de quesos blandos, la mayor parte del suero se extrae durante el moldeo y el prensado (autoprensado). En la elaboración de quesos duros se recurre a una intensa trituración de la cuajada y a la aplicación de temperaturas relativamente altas.

**Contenido de grasa:* La grasa de la leche pasa primero al coágulo y después a la cuajada; ésta comienza a adquirir firmeza al unirse las partículas de proteína y expulsar el suero (sinéresis). El suero que durante

este fenómeno se desprende tiene que salir atravesando los finos capilares que quedan en la masa de cuajada, viéndose dificultada su salida por la presencia de los acúmulos de grasa de gran tamaño. Por eso si la leche es rica en grasa, han de potenciarse todos aquellos factores que favorecen la expulsión del suero.

**Contenido en sales cálcicas:* Las sales cálcicas en disolución contribuyen a obtener una cuajada firme, que desuera rápido. Para activar el desuerado se añaden por ello, a la leche, sales cálcicas; especialmente si es "perezosa" y tiende por ello, a dar un coágulo blando de desuerado lento.

**Pasteurización:* La cuajada obtenida a partir de leche pasteurizada desuera lentamente; ésta recupera su aptitud para la coagulación incorporándole cloruro cálcico, fosfato cálcico o bacterias acidolácticas.

**Acidez de la leche y de la cuajada:* el pH es uno de los factores que más influyen sobre el desuerado durante la serie de operaciones a que se somete la cuajada en la cuba. Las micelas proteicas se encuentran, en virtud de su carga eléctrica, hidratadas, por lo que retienen agua. Al aumentar la acidez de la leche por acción microbiana o por adición de ácidos, desciende la carga eléctrica de las proteínas, que terminan por deshidratarse. De ahí que el desuerado de la cuajada sea tanto más fácil cuanto más se eleve la acidez. La formación de ácido láctico, que comenzó antes de que la leche coagulara, prosigue durante el trabajo de la cuajada, en que la temperatura es favorable para el desarrollo de las bacterias acidolácticas.

La acidificación producida por las bacterias lácticas confiere al queso la textura y plasticidad conveniente. Además favorece el drenado del suero, aumentando la permeabilidad del gel debido a una cierta disolución de su armadura cálcica; posteriormente la acidificación regula el contenido final de la cuajada en minerales, parámetro que gobierna la evolución y caracteres finales del queso.

**Temperaturas a aplicar durante la manipulación de la cuajada:* El calentamiento constituye un factor esencial ya que permite disminuir el grado de hidratación de los granos de cuajada favoreciendo la *sinéresis*; además permite controlar los procesos microbiológicos, permitiendo obtener el tipo de queso deseado.

Es preciso insistir sobre la importancia de la temperatura y la velocidad de calentamiento en la cocción de los granos. La elevación de la temperatura debe ser progresiva, sobre todo al comienzo del calentamiento; cuando éste es brusco, se observa la formación de una costra impermeable, en la superficie de los granos, mientras que la parte central de los granos permanece húmeda. El desuerado se detiene; se dice que el grano está *recubierto*.

**Agitación:* a menudo, el troceado va seguido de la agitación de los granos; que tiene por objeto acelerar y completar el desuerado renovando continuamente la superficie de exudación del suero e impidiendo la adherencia de los granos, con lo que se formaría un amasijo que retendría el líquido. La agitación se realiza a una temperatura entre 36 y 42°C. Se decide terminar la agitación, cuando la cuajada ha alcanzado el grado adecuado de elasticidad y de capacidad de soldadura, mediante el examen sensorial. Para ello se toma cierta cantidad de cuajada en la mano y se cierra; los granos comprimidos deben recuperar su forma primitiva al abrirla, sin llegar a formar una pasta o torta.

Lavado de los granos:

Se realiza con agua o salmuera poco concentrada; la operación tiene por objeto diluir los componentes solubles del coágulo, fundamentalmente la capa de suero que cubre la superficie de los granos de cuajada. Además cuando éstos se mantienen durante un tiempo suficiente en contacto con el líquido de lavado se extrae, por difusión, una fracción del suero retenida en el interior de los granos.

Entre los componentes solubles extraídos se encuentra la lactosa. Una cuajada lavada presenta, tras el desuerado, un contenido relativamente bajo en lactosa. Por lo tanto, sus posibilidades de acidificación son reducidas.

Moldeo del queso:

El objetivo fundamental del moldeo es lograr que se suelden los granos de cuajada.

Los quesos de menor superficie relativa son los redondos o esféricos, y los de mayor superficie los prismáticos rectangulares; los cilíndricos ocupan una posición intermedia. Por eso la sal tarda más en difundir por el interior de los quesos redondos y menos por el de los prismáticos rectangulares y cilíndricos. De igual modo, el agua abandona antes éstos que aquellos.

Por todo ello, la microflora encuentra condiciones de desarrollo más favorables en los quesos redondos, seguidos de los cilíndricos. La maduración de los quesos es función de la microflora que contengan, por lo que los redondos son los de maduración más rápida (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Prensado:

Tiene por finalidad endurecer la masa de cuajada y eliminar el suero sobrante.

El *autoprensado* se utiliza en la elaboración de quesos de alto contenido en agua. Para que las piezas adquieran una consistencia y una distribución de agua uniforme, es preciso voltearlas a intervalos regulares.

El autoprensado es un proceso de larga duración (3-24hs.) durante el cual el queso adquiere firmeza y disminuye de volumen. Se da por terminado cuando cesa la expulsión de suero y el queso adquiere su dureza y forma típica.

Cuando convenga activar el desuerado, como ocurre en los quesos blandos que se autopresan, la operación debe realizarse a una temperatura relativamente alta (20°C).

La mayoría de los quesos semi-blandos y duros, deben tener un $pH= 5,3-5,9$ *al final del prensado*; éste parámetro es de una importancia decisiva para el desarrollo microbiano y la maduración del queso.

Salado:

Los quesos se salan después del prensado por dos procedimientos: *con sal cristalizada* o *en un baño de salmuera*. El primero se aplica tanto a los quesos ya moldeados, como a los que no han entrado aún en los moldes; la

sal se extiende formando una capa sobre la superficie de los quesos o se incorpora en una cantidad prefijada a la masa de cuajada.

Para salar con salmuera, se sumergen los quesos moldeados y prensados en un recipiente con una solución salina. Si son duros se usa una solución concentrada y si son blandos, más diluida.

Cuando se introducen quesos frescos en la salmuera, la concentración de ésta desciende rápidamente, porque sale suero de aquéllos y pasa la sal a su interior. El salado se realiza a una temperatura entre 8 y 11°C.

El salado en salmuera posee varias ventajas: salado más regular, economía de mano de obra, y organización más racional del trabajo.

El salado se caracteriza por presentar "envejecimiento", la composición de la salmuera va evolucionando a lo largo del tiempo y no se caracteriza solamente por un descenso progresivo del contenido en cloruro de sodio, sino también por un incremento de la concentración de los componentes del lactosuero.

En el curso del salazonado se reduce el volumen del queso por la salida del suero y los procesos microbiológicos se hacen más lentos. La sal no difunde por igual en el seno de las piezas; alcanza primero las capas superficiales y va penetrando luego hasta llegar por último al núcleo central.

Cuanto más alta sea la concentración de la salmuera, tanto más deprisa penetra la sal, y tanto más intensamente desuera el queso. La masa del queso deshidrata más velozmente si se sala con sal cristalizada que si se hace con salmuera. A medida que se produce la deshidratación parcial de la pasta, se va originando la costra superficial.

Maduración del queso:

Un queso en maduración es un sistema bioquímico muy complejo donde se establecen numerosos equilibrios y se entrecruzan múltiples rutas de degradación y síntesis. Durante la maduración, la cuajada insípida, inodora y de pobre textura se transforma en un producto final de características organolépticas sumamente apreciadas. Este cambio, según la variedad de que se trate, puede ser de una duración tan breve como dos ó tres días, o tan larga como uno o dos años (Zalazar, 1994). La composición de un queso

a lo largo de la maduración sufre por ello cambios y paulatinamente se van acumulando en el mismo las diversas sustancias que contribuyen a su "bouquet" (péptidos, aminoácidos libres, cetonas, ácidos grasos libres) que surgen como consecuencia de las transformaciones metabólicas sufridas por los compuestos mayoritarios de la leche: lactosa, triglicéridos y caseína. Si a esto se asocian procesos físicos como la evaporación del agua y la difusión de la sal, se puede tener en una aproximación global el fenómeno de maduración de quesos (Zalazar, 1994).

Sin restar importancia a los enzimas presentes normalmente en la leche y a los aportados por el cuajo, es indudable que son las *endo* y *exoenzimas microbianas* los que gobiernan la mayoría de las transformaciones que ocurren durante la maduración (Juarez, Alonso y Ramos, 1983).

Las bacterias ácido lácticas deben ser consideradas en conjunto como microorganismos moderadamente proteolíticos, comparadas con otros grupos de bacterias como *Bacillus*, *Proteus*, etc. Sin embargo, su sistema proteolítico resulta esencial durante el proceso de maduración de quesos. Los péptidos y aminoácidos liberados a partir de las proteínas de leche, por la acción concertada del cuajo y el sistema enzimático proteolítico bacteriano, contribuyen al desarrollo del flavor durante la maduración de quesos, ya sea directamente o como precursores (Martí de Castro, Martín-Hernández, 1994; Reinheimer, 1994)).

La *maduración del queso* comienza durante el salado, pero la transformación de los componentes de la leche que pasan a constituirlo comienza mucho antes; la lactosa, las sales y la microflora comienzan a experimentar cambios cualitativos y cuantitativos durante la preparación de la leche previa a la coagulación, que se prolongan durante la coagulación, tratamiento y manipulación de la cuajada (Dilanjan, 1984).

En los quesos, la acción concertada del sistema enzimático residual del coagulante de la leche, proteinasas del starter y las proteinasas propias de la leche generan pequeños péptidos y aminoácidos libres. Las desviaciones de este proceso de degradación proteolítico, (que necesariamente debe contar con un delicado balance), pueden producir textura y flavor no deseados en los quesos. Un defecto de sabor agrio, puede producirse cuando la

degradación tardía produce acumulación de péptidos amargos, con inhibición de las peptidasas adecuadas (Visser, 1993).

El papel fundamental en la maduración del queso lo desempeña su microflora; sus enzimas contribuyen a catalizar las transformaciones que sufren todos los componentes de la cuajada, incluso después de muertas las células microbianas. Además durante la maduración aumenta la digestibilidad y el valor nutritivo de la cuajada.

El sistema aminopeptidásico específico de las bacterias lácticas de importancia fundamental en la Tecnología del Queso, ha sido estudiado en distintas ocasiones. Las bacterias ácido lácticas *termófilas* poseen un sistema aminopeptidásico más efectivo que las bacterias ácido lácticas *mesófilas* (Martí de Castro, Martín- Hernández, 1994).

Se dan tres grandes fenómenos, aunque en diverso grado, en todos los *procedimientos de afinado*: (Jacquet y Lenoir, 1969).

- fermentación de la lactosa
- hidrólisis de la grasa
- degradación de las proteínas

Agentes del Afinado

Durante el proceso de maduración del queso, las paracaseínas de la cuajada son hidrolizadas catalíticamente por la proteasa de la leche, las enzimas del cuajo empleado como coagulante, las enzimas de los cultivos lácticos añadidos, y las de los microorganismos contaminantes de la leche original y del producto en fase de elaboración (Creamer, 1975).

Enzimas presentes en la leche:

La proteasa natural de la leche es la plasmina, es termo-resistente; su pH óptimo es 8.0-8.5 está por encima del pH de la cuajada (5.0-5.5); esto, ligado a su baja concentración, hace que no sea demasiado importante en el afinado, sobre todo si se compara su acción con la correspondiente a las proteasas microbianas.

El papel de las lipasas originarias de la leche puede ser más importante. La lipasa plasmática, presenta actividad máxima a pH=8,5-9,0; pero la actividad todavía es alta a pH ácido (5.0-6.0), por lo que es más importante. Su

escasa termoresistencia, hace que sólo pueda intervenir en quesos elaborados con leche cruda, ya que se inactiva durante la pasteurización.

Otra enzima que puede intervenir en la maduración es la fosfatasa ácida, debido a su acción desfosforilante hace a la caseína más sensible a la acción de las proteasas. Por todo esto, el papel de las enzimas presentes en la leche es limitado, pero puede ser más importante en quesos elaborados a partir de leche cruda (Veisseyre, 1980).

Enzimas del cuajo:

Posee un conjunto de enzimas proteolíticas que no sólo intervienen en la formación del coágulo, sino también en su evolución posterior, desarrollando una acción endopeptidásica sobre el conjunto de las proteínas de la cuajada. Esta acción se traduce por la fragmentación en cadena de las moléculas proteicas con la liberación de productos de peso molecular elevado de tipo polipeptídico. La zona de pH= 5-6 en que el cuajo es muy estable, el pH de actividad proteolítica óptima (3,8-4.0) sobre la caseína bruta y la acción favorecedora del ClNa a una concentración del 3% son factores que hacen pensar en la intervención del cuajo en el afinado.

No está totalmente claro el modo de acción del cuajo en el desarrollo del sabor y el aroma del queso. Se sabe que estos caracteres están ligados a la formación de ciertos aminoácidos, oligopéptidos y aminas. Por lo tanto, el cuajo no podría tener una influencia directa, ya que su acción no produce estos compuestos, aunque se sabe que algunos polipéptidos por él liberados pueden ser de sabor amargo. Por otra parte su acción libera moléculas nitrogenadas que son utilizadas por las enzimas microbianas, que las transforman en moléculas de bajo peso molecular, que son productoras de sabor y aroma (Veisseyre, 1980; Grappin y col.,1985; Lawrence y col., 1987).

Grappin asegura que las enzimas del cuajo escapan en su mayor parte con el suero (Grappin, Rank y Olson, 1985).

Lawrence, en un trabajo realizado con un grupo de colaboradores, afirma lo enunciado por Grappin; es decir que durante la elaboración de quesos, la enzima coagulante se remueve junto con el suero, pero una pequeña

cantidad puede ser detectada en la cuajada, luego del prensado. La acción residual de la enzima combinada con la de las enzimas de los starters determina el *patrón proteolítico* en la maduración de un queso. La renina produce una degradación *primaria* de las caseínas y a posteriori, las bacterias producen una degradación *secundaria*, a fragmentos peptídicos menores y aminoácidos libres (Lawrence, 1987).

La textura generalmente, cambia marcadamente en las primeras semanas de maduración, debido a un debilitamiento general de la red de caseínas por la acción de la renina sobre la α_{s1} caseína. Estos mismos autores determinan que la *velocidad de proteólisis* durante la maduración, está afectada por la relación sal / humedad en el queso (Lawrence y col., 1987).

En conclusión, las enzimas coagulantes son un factor importante del afinado; inician la proteólisis cuando el sustrato es aún ácido y lo preparan para la acción de las enzimas provenientes de los fermentos lácticos (Veisseyre, 1980; Grappin y col., 1985; Lawrence y col., 1987).

Enzimas presentes en la flora microbiana:

La cuajada contiene una población microbiana de numerosas especies; los microorganismos nacen, se multiplican y mueren modificando más o menos profundamente el sustrato, no solamente porque degradan y consumen algunos componentes, sino también porque vierten al medio secreciones celulares.

Los aspectos microbiológicos de la maduración de un queso son muy complejos, ya que existe una gran variedad de microorganismos implicados y de condiciones necesarias para poder desarrollarse; además cada tipo de queso se caracteriza por una microflora específica.

La población microbiana de un queso es extremadamente densa, ya que a menudo sobrepasa los 10^9 microorganismos por gramo.

Los *estreptococos lácticos* representan habitualmente la flora dominante al comienzo de la maduración. En los quesos de pasta blanda y firme están presentes fundamentalmente *S. lactis*, *S. cremoris* y *S. diacetylactis*; mientras que en los de pasta cocida se halla el *S. thermophilus*. La principal función

de este grupo de *bacterias heterofermentativas es transformar la lactosa en ácido láctico*.

Otro grupo de microorganismos que son parte de la flora habitual de todos los quesos son los *lactobacilos*. Las especies mesófilas, como *L. casei* y *L. plantarum*, proceden de la contaminación de la leche y de la cuajada, las especies termófilas, como *L. lactis*, *L. helveticus* y *L. bulgaricus*, son aportados por los fermentos lácticos y contribuyen a la acidificación de la cuajada.

En todos los quesos las bacterias ácido-lácticas siguen multiplicándose mientras queda lactosa por fermentar; y comienzan a declinar cuando ésta se ha agotado. Esta es la razón de que se encuentran en mayor número en los quesos menos desuerados, que son por lo tanto más ricos en lactosa (Veisseyre, 1980; Dilanjan, 1984).

Otras bacterias que pueden estar presentes en los quesos, son los *micrococos*, cuya resistencia al ClNa hace que puedan existir en las salmueras; intervienen directamente en la evolución de las pastas por su actividad proteolítica.

Las *bacterias propiónicas*, son muy importantes en la maduración del queso Gruyere y Emmental. El *Propionibacterium shermani* es la especie más frecuente; en una cava caliente éstos gérmenes se multiplican abundantemente, en el seno de la pasta debido a su carácter anaerobio. A partir de la lactosa y, sobre todo, del ácido láctico, forman ácido propiónico, ácido acético, compuestos volátiles y gas carbónico, que es el origen de la abertura del queso (es decir la formación de ojos).

En resumen, el soporte químico del sabor de un queso no es un componente, ni un grupo de componentes. Un tipo de queso debe probablemente sus caracteres organolépticos a la presencia de una mezcla compleja de componentes cuyo equilibrio juega un papel fundamental. El aroma de un queso se distingue del de otro, más que por el número de componentes aromáticos, por las proporciones relativas en que se encuentran (Veisseyre, 1980).

Condiciones para la maduración o afinado

Puesto que la maduración del queso depende esencialmente de la actividad microbiana, los factores que regulan ésta tienen un papel determinante en el desarrollo del afinado.

*La aireación: permite asegurar las necesidades de oxígeno de la flora superficial de los quesos.

*La humedad: favorece el desarrollo microbiano, por lo que las pastas húmedas se afinan rápidamente, mientras que las pastas muy desueradas se afinan lentamente. Para el desarrollo de los gérmenes es necesario tener en cuenta la actividad de agua.

*La temperatura: la mayor parte de los gérmenes de la flora superficial de los quesos, tienen un desarrollo óptimo entre 20 y 25°C.

Las bacterias lácticas, si son mesófilas proliferan más rápidamente entre 30 y 35°C; por otro lado si son termófilas, lo hacen a 40-45°C. En general, la producción máxima de enzimas tiene lugar a una temperatura ligeramente inferior a la temperatura óptima de desarrollo de los gérmenes. En la práctica industrial, el afinado de las pastas se realiza siempre a una temperatura muy inferior a la óptima de actuación de las enzimas. Estas serán 3 a 8°C para los quesos entreverados, 7 a 10°C para los de pasta blanda, 10 a 12°C para las pastas prensadas, 12 a 13°C en la cava fría y después a 16-20°C en la cava caliente para las pastas cocidas.

Es interesante retardar la maduración al principio para controlarla mejor y asegurar el máximo desarrollo de los caracteres organolépticos.

*El contenido de sal: que regula la actividad de agua en la pasta, contribuyendo a seleccionar los microorganismos. En la fase acuosa, en que está disuelta la sal, su concentración alcanza el 4-5%, dosis suficiente para inhibir el desarrollo de la mayor parte de las bacterias lácticas.

Pudo constatarse que en algunos quesos salados, se mantiene una flora predominantemente láctica. Para explicar esto se ha señalado la posibilidad de que algunos gérmenes proteolíticos, incrementen la resistencia a la sal de las bacterias lácticas.

*El pH: las bacterias prefieren los medios neutros, siendo en general, inhibidos por los pH inferiores a 5.0, aunque los lactobacilos soportan pH muy bajos, del orden de 3,5. En el caso de pastas blandas, donde el pH de

la cuajada es de 4,2-4,4, la proteólisis se halla inhibida. Conviene, por lo tanto, realizar una desacidificación.

Formación de compuestos que otorgan aroma y sabor, durante la maduración en productos fermentados

En los productos fermentados, ya sea leche cultivada o quesos blandos de corta vida, el sabor es impartido por productos metabólicos de bacterias lácticas. En quesos sometidos a un proceso de maduración, se desarrolla una compleja microflora secundaria, las cuales ayudan a producir una mezcla de compuestos, que darán a los quesos su sabor típico. El espectro de éstos compuestos es, a menudo, amplio y complejo lo que lleva a aplicar técnicas sofisticadas para poder determinarlos (Law, 1981).

La *maduración* es un proceso complejo que involucra la degradación de la cuajada por proteólisis, lipólisis, y otras reacciones catalizadas por enzimas; para dar origen a cambios en la textura y sabor que darán las características propias de cada queso. La relación entre degradación de proteínas y grasas y desarrollo del sabor no está claramente dilucidado (Law, 1982)

Transformaciones sufridas por los lípidos durante la maduración

Los lípidos de los quesos también se transforman en el curso de la maduración. Es difícil estudiar los procesos que han sufrido, porque es preciso para ello separarlos mediante extracción, con lo que se arrastran también, junto con los lípidos procedentes de la leche, los ácidos grasos volátiles formados a partir de la lactosa y las proteínas. Las transformaciones de los lípidos son, en los quesos duros, reducidas y se deben a la acción de los enzimas lipolíticos. Algunos autores opinan que los productos resultantes de la degradación de las grasas contribuyen al olor y al sabor característicos de cada tipo de queso.

En los quesos blandos, que como el Roquefort maduran por acción de los mohos, se conocen bien los cambios químicos que experimentan los lípidos: por hidrólisis de los glicéridos aparecen ácidos grasos libres sin que se detecte, en cambio, glicerol, que es metabolizado por la flora microbiana. El

gusto característico del Roquefort, en especial si es de leche de oveja, es consecuencia de la acción de los mohos sobre los lípidos (Dilanjan, 1984).

Durante la maduración del queso Cabrales hay una variación de los índices de ácidos grasos volátiles solubles e insolubles, del índice de refracción y del de acidez; esto permite saber que las transformaciones experimentadas por la fracción grasa son profundas (Juárez, Alonso y Ramos, 1983)

El queso Cabrales evidencia, a través de la variación de éstos índices, una lipólisis notable, debida a la acción lipolítica de los mohos (*Penicillium*), encontrados como flora predominante durante la maduración (Law, 1981).

Transformaciones de la lactosa, del ácido láctico y sus sales.

La leche que se destina a la elaboración de queso sufre una preparación previa durante la que fermenta la lactosa, bajo la acción de la microflora generando ácido láctico; la fermentación de la lactosa se prolonga a lo largo del trabajo de la cuajada en la cuba, el moldeo y el prensado. El queso reciente contiene ya una cantidad bastante alta de ácido láctico; en los primeros siete días de maduración fermenta toda la lactosa, que se agota en todos los quesos en unas dos semanas. Cuando a partir de la lactosa, sólo se produce ácido láctico, el proceso se denomina *homofermentativo*; si se generan además otros productos secundarios, se dice que es *heterofermentativo*. En el queso se dan ambos tipos de fermentaciones.

La *paracaseína* (paracaseinato bicálcico), producida durante la coagulación por el cuajo, cede poco a poco calcio bajo la acción del ácido láctico, transformándose en *paracaseinato monocálcico* o en paracaseinato libre de calcio. El ácido láctico se combina de inmediato con la paracaseína resultando dos compuestos: el *monolactato* y el *bilactato de paracaseína*; ambos son capaces de ligar y retener agua, propiedad de la que carece la paracaseína y que influye decisivamente sobre la consistencia del queso. Si se libera de la caseína una cantidad insuficiente de calcio, el queso resultante tendrá una consistencia elástica. Lo contrario sucede cuando la disociación es más abundante, el queso se desmigaja y ofrece consistencia friable. De aquí concluimos que cada tipo de queso debe contener una cantidad óptima de lactatos cálcicos; el resto será arrastrado por el suero.

La fermentación láctica juega un papel esencial durante el afinado: impide la multiplicación de los microorganismos que generan putrefacción; los cuales invadirían rápidamente la cuajada si el pH se mantuviera demasiado elevado.

El ácido láctico generado no se acumula en la cuajada, sino que sufre transformaciones diversas; generando sustancias que contribuyen al "flavor" del queso terminado. El ácido láctico no es el único componente que sufre transformaciones en el queso, también la experimentan el ácido cítrico procedente de la leche, cuya fermentación da origen al diacetilo (sustancia muy aromática) y la acetoína (Dilanjan, 1984).

Transformaciones que experimenta el agua de los quesos

Todos los quesos pierden durante la maduración cierta cantidad de agua, la mayor parte de las pérdidas tienen lugar en el curso del salazonado; durante el cual el queso expulsa suero e incorpora sal; la cantidad de sal que se incorpora es inferior al volumen de suero expulsado y el queso reduce su peso y tamaño.

Terminado el salado, continúa la deshidratación, para frenarla es necesario que se forme pronto la corteza, que, aunque no puede impedirla, reduce su velocidad. Luego, para evitar la deshidratación posterior, se pueden frotar las piezas con vaselina y se parafinan.

Transformaciones sufridas por las proteínas

El cambio que se produce en la consistencia de los quesos, durante la maduración (si no hay deshidratación) ha sido relacionado con la *proteólisis*. En general, se observa un ablandamiento del queso que se produce por la ruptura de la matriz proteica debido al ataque de las enzimas proteolíticas (de Jong, 1976; Lawrence, 1987)

Las proteínas y esencialmente la caseína, constituyen los compuestos que juegan el papel más importante en la maduración de los quesos. Una combinación de enzimas actúan sobre las proteínas, rompiendo la estructura y produciendo cambios en cuerpo y textura. Además proveen péptidos como sustratos para los principales enzimas intracelulares de la microflora del

queso, que producen aminoácidos, los que contribuyen al "flavor" (Law, 1987; Aston y col, 1983).

Simultáneamente con la producción de aminoácidos tienen lugar procesos de desaminación, por lo que éstos se transforman en ácidos y amoníaco, procesos que afectan también a proteínas y peptonas. También sufren decarboxilaciones que rinden anhídrido carbónico y otros productos (Dilanjan, 1984).

Los enzimas involucrados en los complejos cambios que experimentan los quesos, provienen de la leche, starter de bacterias lácticas y otros microorganismos nativos de la leche. La acción sobre las fracciones caseínicas de éstos agentes se ve afectada por las condiciones ambientales (Grappin, Rank y Olson, 1985).

Durante la maduración se observa un aumento progresivo de las fracciones nitrogenadas (Nitrógeno total, Nitrógeno soluble, Nitrógeno no proteico, tirosina, triptofano y aminoácidos libres). Los contenidos en tirosina y triptofano, son utilizados ampliamente como índice de proteólisis, ya que existe una correlación positiva y altamente significativa entre ellos y el Nitrógeno soluble (Vakaleris y Price, 1959)

La *proteólisis* de un queso influye notablemente en la *calidad organoléptica* del mismo y por ello ha sido investigada en profundidad en muchas variedades de queso. La *electroforesis* es un método muy efectivo y simple para estudiar la proteólisis de un queso durante la maduración. Tiene alta resolución comparado con el *método de determinación de Nitrógeno soluble* a pH=4,6 o Nitrógeno soluble en agua (Kuchroo, 1982). En el estudio de la hidrólisis enzimática de la α y β -caseína y de sus primeros productos de degradación, la electroforesis en geles de poliacrilamida, ha resultado particularmente útil como técnica cuantitativa (de Jong, 1976; Lawrence, 1984).

Ledford realizó un estudio de los cambios producidos en un queso durante su maduración, en lo referido a los componentes caseínicos. Desarrolló un método para determinar la fracción de caseína residual, al término de la maduración, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Determinó que la caseína era hidrolizada en distintos grados, en las diferentes variedades

de queso examinadas. La fracción α -caseína es degradada en todos los quesos, la β -caseína aparece casi intacta en algunas variedades, mientras que en otros, su contenido ha disminuido notablemente. Esto refleja importantes diferencias en las propiedades proteolíticas de los microorganismos, que infieren características particulares a cada tipo de queso (Ledford, 1966).

Se encontraron diferencias apreciables en la degradación de la fracción α -caseína para quesos con alto (60%) y bajo (40%) contenido de humedad (de Jong, 1978)

La cantidad de α -caseína hidrolizada varía con el tipo de queso, calidad bacteriológica de la leche, condiciones de maduración y edad del queso. El cuajo desempeña el rol más importante en la iniciación de la degradación de α -caseína (Grappin, Rank y Olson, 1985).

En cuanto a la hidrólisis de β -caseína, en solución de pH= 6.5, dio como resultado tres productos con distinta movilidad electroforética. La actividad del cuajo sobre la β -caseína es marcadamente dependiente del pH y concentración de cloruro de sodio. En solución acuosa la concentración de cloruro de sodio tiene un fuerte efecto inhibitorio, el cual disminuye con la disminución del pH (al variar éste de 7,0 a 4,6), (Grappin, Rank y Olson, 1985).

La flora controlada en quesos ha concedido información valiosa sobre la influencia de las proteinasas del starter, en la degradación de caseína. *S. thermophilus* es capaz de atacar la α - caseína (Grappin, Rank y Olson, 1985).

Vinculación entre la maduración y el desarrollo de las características organolépticas del queso.

El desarrollo de los caracteres organolépticos del queso está ligado a las modificaciones sufridas por los componentes de la cuajada en el curso de la maduración. Sin embargo, dado que estas modificaciones son numerosas y muy complejas, resulta difícil establecer una relación precisa entre alguna de ellas y una característica organoléptica determinada.

Elaboración de queso cuartirolo

El aroma del queso procede principalmente de los componentes volátiles surgidos de los procesos de maduración de la cuajada. Estos compuestos incluyen ésteres, ácidos grasos, aldehídos, cetonas, alcoholes, aminas, sulfuro de hidrógeno y amoníaco. Los aldehídos, cetonas y alcoholes son posiblemente los más importantes (Veisseyre, 1980).

La degradación de aminoácidos que contienen sulfuros, da como resultado la formación de mercaptanos, ácido acético, ácido fórmico amoníaco, dióxido de carbono e hidrógeno.

Las reacciones producidas durante la fermentación del ácido cítrico forman importantes compuestos aromáticos, como ácido acetoláctico, el cual produce acetilmetilcarbinol y diacetilo (Scott, 1981)

Los aminoácidos están siempre en cantidades elevadas, aumentando con el curso de la maduración (Aston, 1983)

Otra de las características que determinan la identidad y calidad del queso es la textura. Sus variaciones pueden reflejar los cambios estructurales ocurridos durante la maduración. Entre los factores que pueden afectarla están la humedad, el pH, la proteólisis de la caseína (de Jong, 1978, Creamer y Olson, 1982).

La textura de los quesos es una importante propiedad por la cual el consumidor identifica la variedad específica de un queso. Además, según las diferentes variedades de quesos en estudio, estas cualidades son propias y distintas.

Todos los quesos tienen como componentes mayoritarios caseína, grasa y agua que contribuyen a la estructura de los mismos y por consiguiente a las propiedades reológicas. Las caseínas forman una malla en la cual atrapan a la grasa que en origen son los glóbulos de grasa de la leche. El agua, que normalmente contiene las sales disueltas que fueron agregadas en el curso de la manufactura, está parcialmente ligada a las proteínas rellenando los intersticios entre la matriz de caseína y la grasa. Esta estructura es la misma para todos los quesos. La variación en esta estructura está producida por las variaciones en los procesos particulares de manufactura, que dan las diferencias entre los distintos quesos.

La naturaleza sólida del queso está determinada principalmente por las

caseínas. La estructura primaria está dada por una celda tridimensional cuyos lados consisten en cadenas de moléculas de caseína. Esta estructura es la que le confiere rigidez. Las cadenas no son lineales pero tienen una estructura semejante a un tornillo helicoidal. Esto le da cierta elasticidad que modifica la rigidez de la celda (Bevilacqua, 1997).

Durante la coagulación estas cadenas se han formado en el suero alrededor de los glóbulos grasos de la leche, de manera que inicialmente encierran al menos un glóbulo de grasa. El tamaño y la distribución de tamaños de estas celdas está controlada por los glóbulos grasos. Es así que el queso consiste en un agregado de estas celdas caseínicas más grasa, bañadas por la salmuera (Fox, 1987).

Si se aplica una fuerza a esta estructura matricial, la rigidez de la celda y la elasticidad de sus partes estructurales controlarán la deformación. En ausencia de grasa y salmuera se esperaría un comportamiento similar a cualquier otra estructura abierta, un sólido relativamente blando cuya deformación estaría caracterizada por un único módulo de elasticidad. Sin embargo, la presencia de grasa limita la deformación. A bajas temperaturas la grasa dará mayor rigidez. A las temperaturas de maduración de quesos la grasa se comporta como un material plástico. Cualquier deformación de la matriz caseínica con respecto a la grasa es lubricado por la salmuera. Como resultado la rigidez de la grasa se suma a la de la caseína de una forma compleja, exhibiendo características viscoelásticas.

La masa total del queso consiste en un agregado de los gránulos obtenidos durante el lizado. Esto forma una estructura secundaria con propiedades reológicas propias, que pueden ser modificadas durante el prensado, definiéndose una estructura terciaria. Esta estructura básica puede ser modificada durante la maduración tanto por los tratamientos mecánicos y térmicos como por la acción bacteriana y enzimática. Como resultado de todo esto, la estructura proteica puede modificarse, los glóbulos de grasa contiguos coalescen y se puede perder agua por evaporación en la superficie.

No es posible considerar aisladamente la contribución de cada contribuyente a las propiedades reológicas del queso, es su interacción la que produce la

vicoelasticidad. Sin embargo es posible examinar alguna de las particularidades con cada uno de los constituyentes mayoritarios. Si consideramos la caseína, es ella la que le da al queso su aspecto sólido. Dado que las cadenas caseínicas se forman dentro de los espacios que quedan entre los glóbulos de grasa, debe necesariamente existir una cantidad mínima de caseína por debajo de la cual no se puede formar una red continua. Por encima de esta cantidad la caseína adicional servirá para fortificar las ramas y uniones. Es de esperar entonces que exista una relación general entre la cantidad de caseína presente en el queso y su firmeza. En contraste con la caseína, la grasa es reológicamente muy sensible a los cambios de temperatura y por lo tanto impartirá esta sensibilidad al queso.

El agua, o más estrictamente el contenido de salmuera del queso, influye en la firmeza del mismo. Actúa como lubricante de baja viscosidad entre las superficies de la grasa y la caseína. A mayor contenido acuoso, y consecuentemente mayores espacios disponibles para que el agua fluya, habrá menor impedimento para el movimiento de la celda proteica alrededor de la grasa encerrada. Este movimiento más libre se manifiesta como una menor resistencia global a la deformación y como una mayor facilidad para recobrase después de haber sido deformado (Fox, 1987).

Existen buenas correlaciones entre firmeza de un queso y cantidad intacta de α_{s1} -caseína en el queso (de Jong, 1976). Debido a que la hidrólisis de pequeñas fracciones de α_{s1} -caseína dan, por la acción del cuajo, péptidos, resulta un debilitamiento general de la red caseínica. Esto es concordante con el hecho que los productos de ruptura de las caseínas son muy solubles en agua y no pueden contribuir a la matriz proteica. Existe otro aspecto importante de la proteólisis: como cada puente peptídico está anclado se generan dos nuevos grupos iónicos y cada uno de ellos puede competir con el agua disponible en el sistema. Entonces, el agua previamente disponible para la solvatación de las cadenas proteicas puede verse restringida por los nuevos grupos iónicos, (Fox, 1997).

Rendimiento quesero de los distintos componentes de la leche:

*Rendimiento en lactosa y sales:

Por lo general, en los quesos madurados no queda lactosa porque las bacterias acidolácticas la fermentan en su totalidad. Si pasara al queso toda la lactosa que contiene la leche, las bacterias acidolácticas no podrían utilizar la totalidad, ya que se verían inhibidas por la concentración de los productos del metabolismo del azúcar. De ahí que el normal desarrollo de las bacterias lácticas exija que todo el ácido láctico formado se combine con las sales presentes en el queso, especialmente con las cálcicas. Para fijar todo el ácido láctico producido basta con las sales cálcicas que pasan de la leche al queso.

En la elaboración de quesos duros no se aprovecha al máximo la lactosa, sólo alrededor de un 10% de la contenida en la leche, el valor exacto depende del tipo de queso.

*Rendimiento en caseína:

La proporción de caseína contenida en la leche que pasa al queso y, por tanto se aprovecha, depende fundamentalmente de la relación existente entre sus fracciones α , β y γ . La caseína γ no coagula bajo la acción del cuajo, por lo que el rendimiento en caseína es tanto menor cuanto mayor sea la contribución de ésta fracción al contenido total en caseína.

Cuanto más pequeño sea el grano de la cuajada, mayores son las pérdidas en caseína y más bajo el rendimiento quesero.

Otro factor que influye sobre el aprovechamiento de la caseína es la dureza de la cuajada. Las cuajadas duras tienen un rendimiento de un 5-6% más alto que las blandas. La leche pasteurizada coagula peor tras la adición del cuajo; si se corrige este defecto mediante la incorporación de cloruro de calcio, aumenta su rendimiento en caseína y por lo tanto el rendimiento en general.

*Rendimiento en grasa:

Muchos factores influyen sobre la cantidad de grasa de la leche que pasa al queso. Los de menos rendimiento quesero son los de mayor tamaño. Este hecho se debe a que al coagular la leche, y especialmente si la coagulación

es lenta, los glóbulos grasos de mayor diámetro ascienden a la superficie para formar nata, no se incorporan a la cuajada y pasan al suero, y a que los de menor diámetro no son siempre retenidos por la cuajada durante su tratamiento y son arrastrados en cierta extensión por el suero (Veisseyre, 1980).

OBJETIVOS

El objetivo general fue determinar si los efectos sinérgicos observados entre ciertas cepas de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *S. thermophilus* y el efecto estimulante que produjo el agregado de formiato de sodio sobre cultivos de determinadas cepas de lactobacilos, se observaba también durante la elaboración de quesos de pasta blanda.

♣ A fin de analizar la influencia de la relación simbiótica que se establece entre cepas sobre las características proteolíticas y organolépticas del producto final se elaboraron quesos con fermentos mixtos de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *S. thermophilus*.

♣ Se estudió el efecto del formiato sobre el crecimiento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y su correlación con las características organolépticas y microbiológicas de los quesos elaborados.

MATERIALES Y METODOS:

Cepas utilizadas: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB, LBP, LBR) y *S. thermophilus* (CP2, CP3 y CP4).

Los quesos elaborados según la tecnología detallada a continuación, cumplen con las especificaciones del CAA (detalladas previamente) para encuadrarse dentro de la clasificación de queso cuartirolo.

La elaboración de quesos se dividió en dos etapas:

* En una **primera etapa** se elaboraron quesos tipo cuartirolo a escala de laboratorio, de aproximadamente 500gs. partiendo de 6 litros de leche entera, con los fermentos monomicrobianos y mixtos, seleccionados en base a los resultados obtenidos del relevamiento de cepas efectuado en leche y en medio de cultivo.

Para elaborar dichos quesos se emplearon las siguientes cepas: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB, LBP, LBR) y *S. thermophilus* (CP4).

Se utilizó el siguiente esquema de reactivación de cepas y preparación de fermentos:

cepa (-80°C) se colocó en 5 ml de leche UAT



incubar a 37°C hasta coagular



repique en 300 ml de leche



incubar a 42°C hasta pH= 4.8 - 5.0



fermento monomicrobiano listo para elaboración a escala de laboratorio



se agregaron 300 ml de fermento (LBB, LBP, LBR ó CP4) en 6 litros de leche (al 1%).

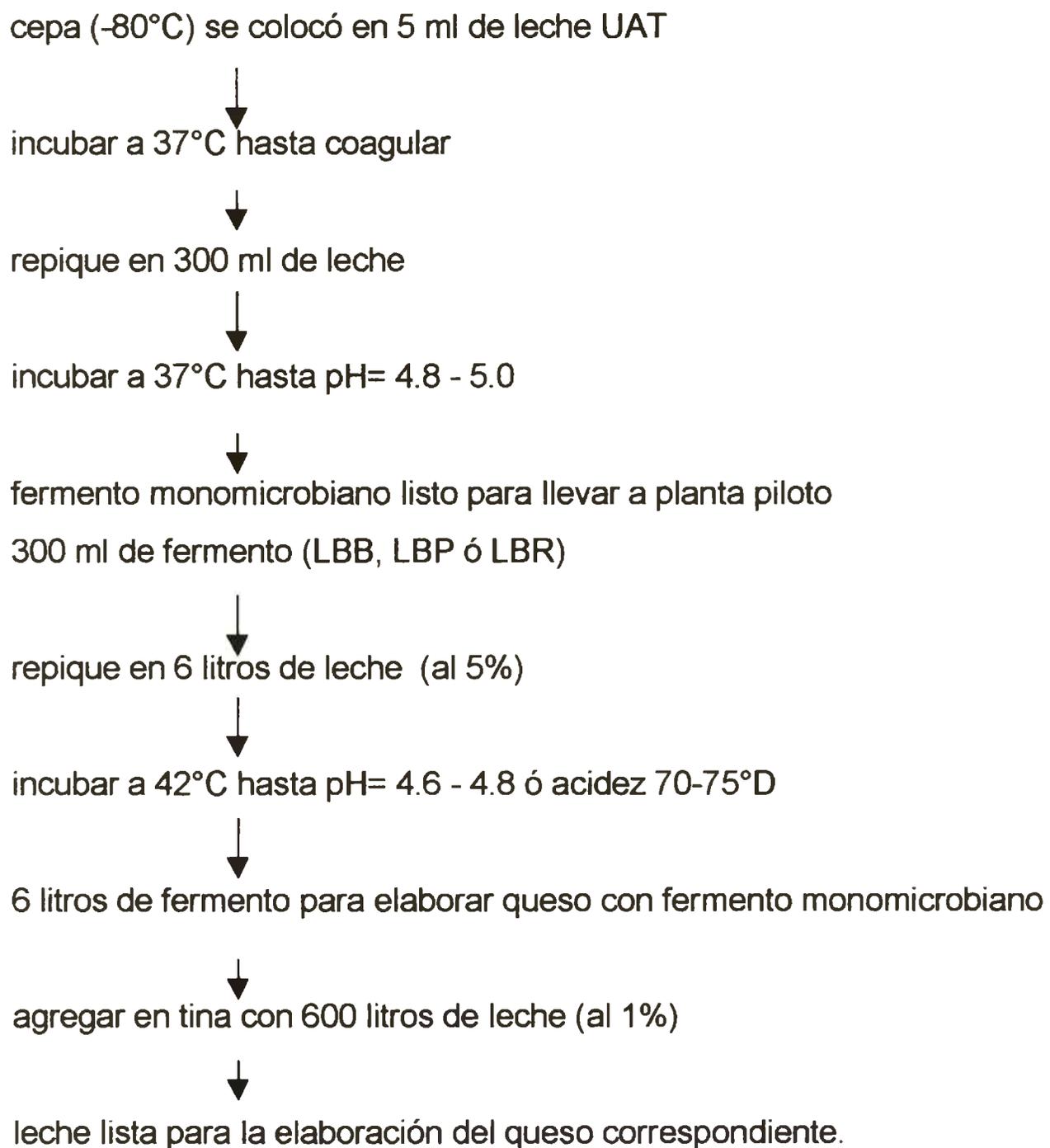


Leche lista para la elaboración correspondiente.

En el caso de utilizar fermentos mixtos el repique se realizó en 150 ml de leche, de modo de obtener 150 ml de fermento de estreptococo y 150 ml de fermento de lactobacilo; que recién se mezclaron al momento de agregarlos a la tina con 6 litros de leche.

En una **segunda etapa** se elaboraron quesos a escala de planta piloto utilizando fermentos monomicrobianos y mixtos y también fermento monomicrobiano preparado con una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB) con agregado de 40 ppm de formiato de sodio.

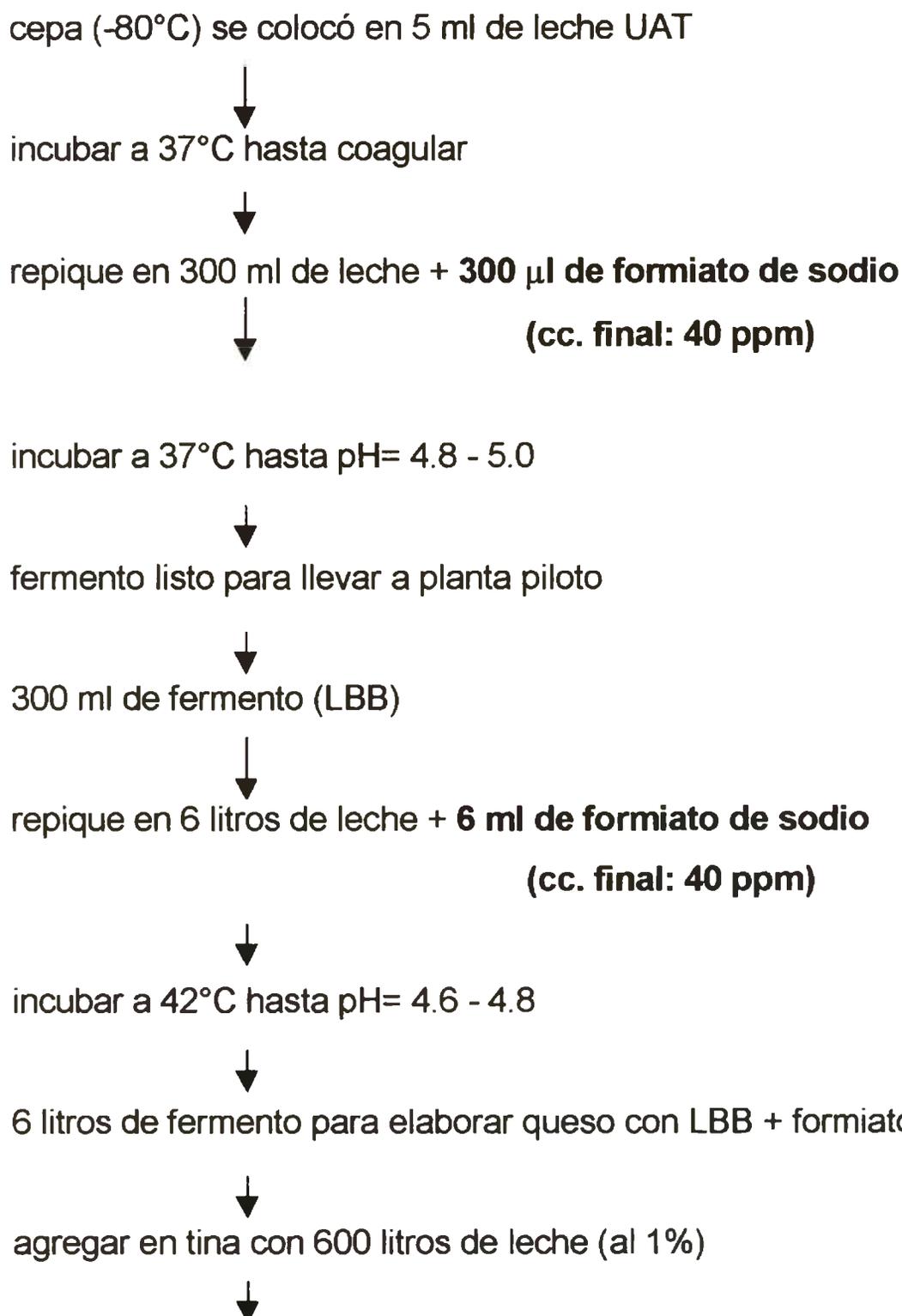
Se utilizó el siguiente esquema de reactivación de cepas y preparación de fermentos:



Elaboración de queso cuartirolo

Conviene aclarar, que para la elaboración de quesos con fermentos mixtos, en la planta piloto el repique se hizo partiendo de 150 ml de fermento del estreptococo y 150 ml de fermento del lactobacilo correspondiente y se colocaron en 3 litros de leche (al 5 %), incubando a 42°C hasta llegar a pH= 4.6- 4.8; de ésta manera obtuvimos 3 litros de cada uno de los fermentos, que fueron mezclados recién en el momento de agregar a la tina con leche, en relación 1: 1 (coco: bacilo); volumen total de fermento 6 litros, que se colocaron luego en 600 litros de leche (al 1%).

Para la elaboración de quesos con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB) con agregado de 40 ppm de formiato de sodio, se utilizó el siguiente esquema para la reactivación de cepas y preparación de fermentos:



agregar 600 ml de formiato de sodio (cc. final: 40ppm)



leche lista para la elaboración de queso.

La metodología utilizada para la elaboración de quesos en las dos etapas fue la siguiente:

Tecnología para la elaboración de queso cuartirolo:

*Leche: de buena calidad y pasteurizada, acidez: 16-18°D, pH: 6.6, 6.7; cantidad de leche: 6 litros (escala de laboratorio) ó 600 litros (escala de planta piloto).

*Fermento para queso: acidez 68-70°D; se adicionó al 1% con respecto a la cantidad inicial de leche (6 litros ó 600 litros), fueron preparados según el procedimiento anteriormente detallado.

*Calcio: 30g/100 litros de leche

*Acidez de la mezcla: 1 a 2° D sobre la acidez de la leche

*Temperatura y tiempo de coagulación: 32-35°C, 40-60 minutos.

*Adición de cuajo: 300ml/500ls., pH óptimo 5.2, temperatura 35-38°C.

*Tiempo al corte 30-40 minutos

*Secado: agitación suave durante 10-15 minutos sin aumentar la temperatura.

*Moldeo y apilado: se dejan hasta que el suero llegue a la acidez deseada.

*Acidez del suero final: 12-13° D.

*Salado: (previamente se dejaron los quesos durante una noche en cámara a 8-10°C para detener la fermentación, al otro día se colocaron en salmuera durante 4hs. para un queso de 3- 3.5kg.

*Maduración: a 10°C durante 20 días.

Técnicas utilizadas:

En la *primera etapa* de elaboración de quesos (escala de laboratorio), se realizaron los siguientes análisis:

-Control de parámetros de maduración: (a tiempo cero, 10 y 20 días), se controló:

✓ pH y acidez °D (según la metodología dada por la AOAC 16.023 (1984), expresado como ml de OHNa 0.1N/ 100 g de muestra).

✓ Recuento de bacterias aerobias mesófilas (medio PCA: plate count agar).

- ✓ Recuento de bacterias lácticas: medio diferencial de Lee (1974).
- ✓ Recuento de hongos y levaduras (medio YGC: agar extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol).
- ✓ Actividad proteolítica: la producción de Nitrógeno TCA soluble se cuantificó utilizando la Técnica de Hull, 1947; modificada por Citti y col. (1963) que ya fue descrita previamente; y expresada como (mg de tirosina / 100ml).

Al término de la maduración (20 días) se realizó:

- ✓ Análisis Sensorial: se utilizó un panel no entrenado, compuesto por 30 personas que evaluó los quesos elaborados por medio de un Test de "Scoring", se les pidió que evaluaran textura, sabor.
- ✓ Observación de características externas de los quesos: aspecto de la masa y elasticidad.
- ✓ Fundibilidad: se cortaron cilindros de un diámetro determinado, de cada uno de los quesos elaborados, se colocaron en estufa a 100°C durante 1 hora y se comparó capacidad de derretimiento entre las muestras, en base al diámetro que se había expandido cada trozo de queso (Kosikowski, 1982).

En la *segunda etapa* de elaboración de quesos (escala de planta piloto), se realizaron las siguientes determinaciones:

1- Control de parámetros de proceso:

- ✓ acidez, pH y materia grasa de la leche que se va a utilizar para cada elaboración.
- ✓ acidez y pH de cada uno de los fermentos utilizados y de la leche mezcla (leche + fermento en la tina).
- ✓ acidez y pH del suero de corte.
- ✓ pH del queso.

2-Control de parámetros de maduración: (a tiempo cero, 10 y 20 días), se realizaron los controles enunciados previamente y además, los siguientes:

- ✓ Sinéresis: se cortaron cilindros de queso de un diámetro determinado y se colocaron sobre papel de filtro, se midió el diámetro del halo de suero; se

repitió un suficiente número de veces (ocho) como para obtener un resultado seguro (Kosikowski, 1982).

✓ **Fundibilidad:** se define como la capacidad de las partículas de queso para fluir juntas y formar una masa continua y uniforme (Kindsted, 1993). Para determinarla, se cortaron cilindros de quesos de un diámetro determinado. Se colocaron en estufa a 100°C durante 1 hora y se comparó la capacidad de derretimiento entre las muestras, midiendo el diámetro en cuatro ángulos diferentes y se calculó un valor promedio de éstas medidas, calculando el % de fundibilidad en base al diámetro inicial del cilindro de queso, las determinaciones se efectuaron por cuadruplicado para cada queso y por duplicado para cada elaboración (Kosikowski, 1982).

✓ **Humedad:** se determinó como pérdida de agua en estufa hasta peso constante. Se expresó como gramos de agua por gramo de queso; las determinaciones se efectuaron por duplicado.

✓ **Textura:** se utilizó un método instrumental para la caracterización de la textura de los quesos. En éste método las fuerzas ejercidas sobre el producto ensayado y las respuestas obtenidas dependen de la temperatura, de la relación de compresión, de la forma y del tamaño de las muestras (Bevilaqua, 1997). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente con un texturómetro Instron Universal Testing Machine modelo 1132 (Instron Corp., Canton, MA, USA); equipado con una celda de compresión de 500 N (50 kg) que opera a distintas velocidades de cabezal.

Esta máquina fue diseñada para estudiar las propiedades mecánicas de materiales y realizar ensayos de compresión, tensión, flexión, puntura, extrusión y otros estudios más sofisticados. La máquina consta de dos partes:

a- un mecanismo de conducción: que maneja un cabezal horizontal en dirección vertical, que se desplaza a velocidad controlada en el rango 0.02 - 50 cm/ min.

b- un sistema de detección y registro de la fuerza ejercida: que consiste en celdas cuya salida alimenta el registrador (Bertola, 1992).

Desde el punto de vista de las propiedades organolépticas, la dureza del queso es una de las características de textura más importante con respecto a las preferencias de los consumidores y a la percepción sensorial. Se puede definir la **dureza** como la fuerza requerida para penetrar la muestra de queso con los dientes y se corresponde en un ensayo instrumental a la máxima fuerza ejercida sobre la muestra.

Los valores de los parámetros determinados por métodos sensoriales e instrumentales muestran una buena correlación si la elección de las condiciones de los ensayos es correcta. Generalmente no existen condiciones únicas que resulten en un óptimo para todos los tipos de queso ni para todas las propiedades mecánicas medidas con un test fuerza- deformación. Por lo tanto es necesario encontrar la combinación más adecuada para el queso a ser analizado y para los parámetros que se van a medir.

Para la realización de los ensayos fuerza-deformación deben tenerse en cuenta: la velocidad a la cual la muestra es deformada, la temperatura a la cual se encuentra la muestra durante el ensayo (que debe fijarse y mantenerse constante en los distintos ensayos) y la relación de compresión (Bevilacqua, 1997).

En éste estudio se trabajó con celda de compresión de 50 kg., se utilizó el accesorio pistón del Texturómetro Instron Universal, de 3.5 cm de diámetro y una velocidad de desplazamiento de cabezal de 10 cm/min.

Los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente (de aproximadamente 20°C). Se efectuaron un mínimo de 6 replicados por cada tiempo de muestreo y por duplicado para cada queso analizado y se calcularon los valores medios. Durante los ensayos, los platos de metal de la Prensa Instron no fueron lubricados, sin embargo la humedad exudada durante la compresión fue suficiente para reducir la fricción entre la muestra y el plato.

Las muestras fueron tomadas de la parte central del queso, con forma cilíndrica utilizando un sacabocados, con un tamaño de: 2.5 cm de altura y 1.5 cm de diámetro. Las muestras fueron comprimidas en un 80% de su altura original.

Se utilizó el Test de compresión uniaxial (Bevilacqua, 1997) y se determinó el parámetro **dureza (D)**, midiendo la altura de los picos obtenidos,

correspondiendo ésta a la máxima deformación ó fuerza producida sobre la muestra.

Análisis estadístico: Los valores obtenidos en la determinación de dureza y en la proteólisis producida en los quesos fueron tratados estadísticamente, empleando la Tabla G de valores críticos de Dixon (Caulcutl Body, pag. 248) para descartar ó no datos que se alejaran de los valores medios. Luego se aplicó el análisis estadístico a los datos experimentales, usando el Systat-Software (Systat version 5.0, Systat Inc. USA). Análisis de LSD (Test de mínima diferencia significativa) se realizó con un $\alpha < 0.05$, para decidir si las diferencias halladas entre las muestras eran significativas ó no.

✓ Análisis sensorial: Para su realización se contó con la colaboración del grupo de trabajo del Ing. Hough, pertenecientes al Instituto Superior Experimental de Tecnología Alimentaria (ISETA), situado en la ciudad de 9 de Julio (prov. de Bs. As.).

El análisis sensorial de los quesos se realizó en tres etapas:

1) Desarrollo de descriptores para queso cuartirolo: se realizó con un panel entrenado de 9 evaluadores, del Departamento de Evaluación Sensorial del ISETA.

Se realizaron cuatro sesiones de entrenamiento que consistió en el aprendizaje de las definiciones para cada descriptor. Se utilizaron dos marcas comerciales de quesos que presentaban marcadas diferencias entre los atributos a evaluar.

De la búsqueda, los descriptores encontrados se agruparon en los atributos de:

Apariencia:

Externa: manchas: observación visual de la cantidad de manchas presentes en la superficie de la corteza en un queso entero.

grasosa: observación visual de la presencia de grasa sobre la superficie de la corteza en un queso entero.

uniformidad de superficie: grado de desviación de la superficie del queso.

Interna: intensidad y uniformidad de color: observación visual de la cantidad de color.

brillo: observación visual del brillo de la superficie del queso.

ojos: observación visual de la cantidad de ojos.

rajaduras/fisuras: observación visual de la cantidad de rajaduras.

granuloso: estructura reticulada abierta con manchas blancas.

Aroma: intensidad total: intensidad de aroma total percibido en la muestra de queso.

dulce: aroma dulce percibido en la muestra de queso

ácido/ agrio: aroma ácido percibido en la muestra de queso

crema/leche: aroma a crema/leche percibido en la muestra de

queso fermentado: aroma debido a la presencia de bacterias lácticas en la muestra de queso.

Sabor: intensidad total: intensidad de sabor percibido cuando la muestra es solubilizada en la boca mediante masticación.

salado: sensación de gusto percibido en la muestra de queso, en el que el cloruro de sodio es típico.

dulce: sensación de gusto percibido en la muestra de queso, en el cual la lactosa es típica.

ácido/agrio: sensación de sabor percibido en la muestra de queso, en el cual el ácido láctico es típico.

amargo: sensación de gusto percibido en la muestra de queso, en el cual el amargo es típico.

crema/leche: sensación de sabor percibido en la muestra de queso, en el cual el sabor a crema/ leche es típico.

yogur: sensación de sabor percibido en la muestra de queso, en el cual el sabor a yogur es típico.

cocido: sensación de sabor percibido en la muestra de queso, en la cual la leche en polvo reconstituida y hervida es típica.

suero: sensación de sabor percibido en la muestra de queso, en la cual el suero es típico.

picante: sensación de sabor a picante percibido en la muestra de queso.

Intensidad residual: intensidad de sabor que permanece en la boca después de tragar la muestra.

Textura:

bucal:

dureza: colocar la muestra entre los incisivos, morderla una vez y evaluar la fuerza requerida para morder hacia el interior del queso.

adhesividad: luego de masticar el queso de 8 a 10 veces, evaluar la cantidad del mismo que queda adherido a la boca.

cremoso: de textura untuosa y consistencia semifluida, como la nata fresca.

cohesividad de masa: grado en que la muestra forma un bolo con la saliva luego de masticar el queso de 8 a 10 veces.

elasticidad: colocar la muestra entre los molares, comprimirla parcialmente sin romper la estructura, liberar la presión de los dientes y evaluar el grado en el cual el queso retoma a su forma original.

dúctil: que se deja deformar fácilmente, varias veces, no recuperando completamente el estado inicial.

fundente: sensación que se manifiesta cuando la muestra forma una pasta con la saliva y funde continuamente dando una percepción de presencia en la boca.

trabajo bucal: energía requerida para desintegrar la muestra antes de tragarla.

manual:

untabilidad: facilidad de extender el queso con un cuchillo sobre una superficie plana.

nada ————— muchas

grasosa:

nada ————— muy

uniformidad:

nada ————— mucha

Una planilla similar se utilizó para: apariencia interna, aroma, sabor, textura bucal y textura manual, confeccionando las planillas para el análisis sensorial en base a los descriptores detallados anteriormente.

3) Aceptabilidad Sensorial:

Para el ensayo de aceptabilidad sensorial se empleó la planilla que se presenta a continuación:

Aceptabilidad de queso cuartirolo

Evaluador N°

Fecha / /

Usted recibirá una serie de cinco muestras de queso cuartirolo (cada una codificada con un número de tres dígitos), que deberá probar y evaluar preferencia global, color, sabor y textura (consistencia) según la siguiente escala:

Puntaje	Frase
1	Me disgusta extremadamente
2	Me disgusta mucho
3	Me disgusta moderadamente
4	Me disgusta un poco
5	Ni me gusta ni me disgusta
6	Me gusta un poco
7	Me gusta moderadamente
8	Me gusta mucho
9	Me gusta extremadamente

	561	827	443	379	184	635
Preferencia						
global						
color						
sabor						
textura						

Luego se sacó un promedio de los puntajes otorgados por los consumidores, para cada una de las muestras y para cada uno de los parámetros evaluados; que se muestran luego, en la tabla 3-8.

Del CIDCA se enviaron al ISETA cinco quesos cuartirolo, correspondientes a cinco elaboraciones distintas, por duplicado. Las muestras fueron almacenadas a 4-5°C hasta su evaluación de aceptabilidad sensorial (los quesos tenían 25 días de elaborado, al momento de realizarse el ensayo) por un panel de consumidores (no entrenado).

El ISETA convocó a 36 consumidores de ambos sexos de la Escuela Nocturna Mixta N°1. Se les presentaron las cinco muestras de quesos, más una sexta muestra de una marca comercial reconocida en el mercado. A las muestras se las evaluó en los siguientes atributos: preferencia global, color, sabor y textura.

Se cortó el queso en cubos de 1.5 cm de lado y se colocaron en platos codificados con números de tres dígitos.

RESULTADOS

Cepas utilizadas: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB, LBP, LBR) y *S. thermophilus* (CP2, CP3 y CP4).

La elaboración de quesos se dividió en dos etapas:

* En una **primera etapa** se elaboraron quesos a escala de laboratorio, utilizando fermentos monomicrobianos y mixtos, obtenidos a partir de diferentes cepas de lactobacilos y estreptococos.

Los quesos de 500 gramos se elaboraron a partir de 6 litros de leche entera.

* En una **segunda etapa** se elaboraron quesos a escala de planta piloto utilizando fermentos monomicrobianos y mixtos obtenidos a partir de diferentes cepas de lactobacilos y estreptococos y también fermento monomicrobiano preparado con una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBB) con agregado de 40 ppm de formiato de sodio.

Los quesos de 2.5 a 3.0 kg se elaboraron a partir de aproximadamente 600 litros de leche entera pasteurizada en la serie A, (realizada en octubre de 1997) y en la serie B, (realizada en junio de 1998), se emplearon entre 200 y 350 litros de leche para las distintas elaboraciones.

Primera Etapa:

Elaboración de quesos a escala de laboratorio:

Se seleccionaron las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, para la elaboración de quesos a escala de laboratorio, en base a los resultados obtenidos del relevamiento de cepas realizado en leche. Se utilizaron las siguientes cepas de lactobacilos (LBB, LBP y LBR) ya que fueron las más estimuladas y a su vez las más estimulantes, durante el crecimiento conjunto con *S. thermophilus*. Por otro lado, se seleccionó la cepa de estreptococo (CP4) ya que mostró comportamiento intermedio, en cuanto a su interacción sinérgica con las distintas cepas de lactobacilos. Los resultados presentados en la Primera Parte, muestran un efecto sinérgico del lactobacilo (LBB, LBP y LBR) sobre el recuento diferencial de CP4 en los correspondientes cultivos

Elaboración de queso cuartirolo

mixtos (figura 1-1). Además, la actividad acidificante de los cultivos mixtos (LBB+CP4, LBP+CP4 y LBR+CP4) fue mayor respecto a los correspondientes cultivos monomicrobianos (tabla 1-7). Por éstos motivos, se decidió utilizar los fermentos anteriormente enumerados para la elaboración de quesos y comparar luego las características organolépticas y microbiológicas obtenidas en las distintas elaboraciones.

En la Tabla 3-1-A, se observan los datos obtenidos luego de la elaboración de quesos a escala de laboratorio. Comparando los fermentos monomicrobianos entre sí, se puede decir que las cepas LBB y LBP acidificaron la leche más rápidamente. La cepa LBB presentó mayor actividad proteolítica que las demás cepas empleadas. Por otro lado, las propiedades organolépticas de los quesos elaborados con ésta cepa fueron más satisfactorias que con LBP, LBR ó CP4. También se utilizaron fermentos mixtos en relación 1:1 y se vió que al agregar CP4 las características organolépticas de los quesos elaborados mejoraron (tabla 3-1-B).

Queso (cepa)	pH		Nitrogeno Soluble (mg tyr./100ml)		Rto. total (10 ⁶) UFC/g		**R Total	Rto. H y Lev. (10 ⁷) UFC/g		**R H y L
	0d	20d	0d	20d	0días	20días		0días	20días	
LBB*	6.5±0.05	5.9±0.10	3.1±0.5	14.6±0.9	9.0±7.5	4.5±3.5	0.5	0.09±0.05	1.4±0.6	15.0
LBP*	6.7±0.06	5.8±0.18	2.8±0.6	12.0±1.0	4.0±0.0	5.0±4.6	1.25	0.55±0.4	2.0±1.0	3.63
LBR*	6.5±0.09	6.0±0.21	3.4±0.9	11.2±1.0	7.0±3.8	3.5±3.0	0.5	0.12±0.07	3.0±4.2	25.0
CP4*	6.7±0.10	6.3±0.18	ND	ND	2.0±1.8	7.0±3.5	3.5	0.36±0.2	2.9±1.7	8.0
LBB+CP4*	6.8±0.06	6.1±0.16	3.2±0.8	15.0±0.5	0.8±0.6	4.5±3.5	5.6	0.17±0.1	1.1±0.6	6.40
LBP+CP4*	6.6±0.06	6.1±0.14	2.7±0.7	10.3±0.8	2.9±2.0	5.0±4.3	1.7	1.0±0.85	2.8±2.0	2.80
LBR+CP4*	6.6±0.10	5.8±0.13	3.8±0.9	9.8±0.2	0.7±0.6	8.0±2.0	11.4	2.5±1.5	6.0±4.0	2.40

Tabla 3-1-A: Quesos elaborados con fermentos monomicrobianos y mixtos de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*

ND: no determinado

*promedio de triplicados de datos obtenidos a partir de la elaboración de 3 quesos con cada cepa.

**R= n° microorganismos_{20d} / n° microorganismos_{0d}

Para las combinaciones de cepas LBB+CP4 y LBP+CP4 se obtuvo también una ligera superioridad en la acidificación (Δ pH= 0.66 y 0.81

respectivamente), al término de los 20 días de maduración, respecto a LBR+CP4 ($\Delta\text{pH}= 0.54$).

En cuanto al recuento de bacterias totales se vió que para la combinación de cepas LBP+CP4 y LBP en cultivos monomicrobianos los recuentos se mantuvieron aproximadamente constantes a los 20 días, en éstos casos las bacterias lácticas frenarían el desarrollo de la flora acompañante presente en el queso. Con las demás cepas, ya sea en fermentos monomicrobianos y mixtos los recuentos aumentaron a los 20 días, excepto en los casos de las cepas LBR y LBB en que los recuentos, luego de la maduración, fueron menores que a tiempo cero.

En los recuentos de hongos y levaduras se observaron incrementos de distinta importancia en todos los quesos, tanto en los elaborados con fermentos monomicrobianos y mixtos (tabla 3-1-A).

Cepa	Masa	Sabor	Propiedades Filantes	Textura
LBB	medianamente tierna y elastica	agradable	buenas	regular
LBP	carece de elasticidad	desagradable	malas	mala
LBR	carece de elasticidad	aceptable	malas	regular
CP4	poco elastica	aceptable	regulares	arenosa
LBB+CP4	tierna y elastica	agradable	buenas	buenas
LBP+CP4	poco elastica	carece de sabor	regulares	regular
LBR+CP4	carece de elasticidad y se disgrega con facilidad	carece de sabor	malas	mala

Tabla 3-1-B: Características Organolépticas de los quesos elaborados

Se determinó que la cepa LBB era la mejor opción ya que otorgaba características organolépticas óptimas; mientras que la cepa LBR no otorgaba buenas características. En la utilización de fermentos mixtos las características obtenidas para las combinaciones LBP+CP4 y LBR+CP4 fueron regulares, mientras que la combinación LBB+CP4 resultó la mejor opción en cuanto a características organolépticas (tabla 3-1-B).

Segunda Etapa:**Elaboración de quesos a escala de Planta Piloto:****a) Con fermento obtenido a partir de *L. bulgaricus* (LBB) con agregado de formiato de sodio (en una pequeña planta de la zona):**

Teniendo en cuenta que en ninguna de las combinaciones analizadas se observó estímulo en el crecimiento de los lactobacilos por parte de los estreptococos (figuras 1-1 A y B), se probó si el formiato tenía algún efecto positivo sobre el crecimiento y la actividad metabólica de los lactobacilos (ver segunda parte), que se pudiera aplicar, posteriormente a la elaboración de queso. Dado que se comprobó un efecto estimulante del formiato sobre el desarrollo de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y que la cantidad de formiato que produjo mayor estímulo fué 40ppm, se elaboraron quesos con la cepa LBB con y sin agregado de formiato a la leche para queso, según la metodología descrita en materiales y métodos. Se utilizaron fermentos desarrollados en leche con y sin agregado de 40 ppm de formiato.

La cepa seleccionada para comenzar la elaboración de quesos a escala de planta piloto fué LBB ya que otorgaba mejores características a los quesos (tabla 3-1-B) y además fue la cepa más estimulada en su actividad metabólica y en su crecimiento por el agregado de formiato (tabla 2-1 y 2-2 y figura 2-1 y 2-3- A y D).

Las elaboraciones a escala de planta piloto se realizaron en dos plantas distintas. Primeramente, se elaboraron quesos de acuerdo al convenio firmado entre el CIDCA y el Dr. Castro, propietario de una pequeña planta elaboradora de quesos de la zona, donde se realizaron los mínimos controles durante el proceso de elaboración. Luego, se fabricaron quesos en la planta que posee el CITIL (Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea, Rafaela , Santa Fe), donde las distintas elaboraciones se realizaron con un cuidadoso control de proceso.

En la tabla 3-2-A, se observan los datos obtenidos de las elaboraciones en la pequeña planta de quesos de la zona. Se encontraron importantes diferencias entre los quesos elaborados con y sin formiato a nivel de

degradación proteica durante la maduración. Los valores de Nitrógeno TCA soluble (expresados como mg de tirosina/100 ml), fueron notablemente mayores en los quesos con formiato. Se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre los quesos elaborados con y sin formiato, tanto a los 7 como a los 30 días de maduración.

No se observaron diferencias en el nivel de acidificación entre los quesos elaborados con y sin formiato, al término de la maduración.

Queso	Nitrógeno Soluble (tyr. mg/100ml)		pH		Rto. total (10^6) UFC/g		Rto. H. y Lev. (10^4) UFC/g	
	7días	30días	7 días	30 días	7días	30días	7días	30días
LBB*	2.4±0.2	5.0±0.15	6.23±0.05	5.69±0.08	1.6±1.0	6.0±1.0	3.0±1.0	10±5.0
LBB+form.*	4.6±0.5	7.0±0.45	6.18±0.10	5.59±0.09	0.12±0.03	4.0±3.0	9.0±1.0	8.0±2.0

Tabla 3-2-A: Quesos elaborados con *L. bulgaricus*, LBB con y sin agregado de formiato (en una pequeña planta de la zona).

*promedio de triplicados de datos obtenidos a partir de la elaboración de dos quesos de cada tipo.

En cuanto a los recuentos, se observó que el número de bacterias totales aumentó, al término de la maduración, para ambos tipos de quesos. En cuanto a hongos y levaduras los recuentos no varían demasiado entre los 7 y los 30 días de maduración en ambos quesos.

En la tabla 3-2-B, se aprecian diferencias a nivel organoléptico, se logran mejorar las características de sabor y textura mediante el agregado de formiato, respecto al queso sin formiato. De ésta forma el formiato posibilitaría obtener características organolépticas similares a la de los quesos elaborados con LBB+CP4 (fermento mixto).

Queso	Masa	Sabor	Prop. Filantes	Textura
LBB	se disgrega con facilidad, masa rugosa	deja sabor amargo	buenas	regular
LBB+formiato	masa mas lisa, mejor apariencia	menos amargo, mas agradable	buenas	bueno

Tabla 3 2-B: Características organolépticas de los quesos elaborados con y sin formiato (en una pequeña planta de la zona).

b) Elaboración de quesos con fermentos monomicrobianos y mixtos

(en CITIL).

En el CITIL se elaboraron quesos en dos series (serie A, en octubre de 1997 y serie B, en junio de 1998).

En la serie A, se elaboraron quesos utilizando los siguientes fermentos:

LBB (fermento monomicrobiano de *L. bulgaricus*)

LBB+formiato (fermento monomicrobiano de *L. bulgaricus*)

LBB+CP2 (fermento mixto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, relación 1:1, coco: bacilo)

LBB+CP3 (fermento mixto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, relación 1:1, coco: bacilo)

LBR (fermento monomicrobiano *L. bulgaricus*)

LBR+CP2 (fermento mixto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, relación 1:1, coco: bacilo)

En la serie B, se elaboraron quesos empleando los siguientes fermentos:

LBB (fermento monomicrobiano de *L. bulgaricus*)

LBB+formiato (fermento monomicrobiano de *L. bulgaricus*)

LBB+CP2 (fermento mixto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, relación 1:1, coco: bacilo)

LBB+CP2 (fermento mixto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, relación 2:1, coco: bacilo)

LBP (fermento monomicrobiano de *L. bulgaricus*)

LBP+CP2 (fermento mixto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, relación 1:1, coco: bacilo).

Los fermentos utilizados fueron seleccionados en base a los resultados obtenidos del relevamiento de cepas realizado en leche (ver Primera Parte,). Habíamos visto que las cepas de lactobacilos LBB, LBP y LBR y las cepas de estreptococos CP2 y CP4 eran las más estimulantes y a su vez las más estimuladas en el relevamiento de cepas realizado a 30°C, en medio de cultivo (tabla 1-1). Asimismo, en leche (tabla 1-5) también habíamos observado un importante efecto sinérgico entre dichas cepas. Posteriormente, se realizó un estudio más detallado de efecto

protocooperativo entre cepas (Primera Parte, punto c-); las cepas utilizadas fueron LBB, LBP, LBR, CP2, CP3 y CP4, en el que se compararon las características de crecimiento, acidificación, proteólisis, producción de suero y viscosidad de los cultivos monomicrobianos y mixtos. Se encontró un importante efecto sinérgico entre cepas al utilizar LBB+CP2, LBP+CP2 y LBR+CP2, en cuanto a las características reológicas de los coágulos, buenas características de sinéresis y un estímulo en el crecimiento de los estreptococos producido por los aminoácidos y péptidos aportados por los lactobacilos (figura 1-1-B, tablas 1-7-A y 1-8). Por éstos motivos resultaba interesante probar estas cepas en la preparación de fermentos para la elaboración de quesos y comparar luego las características de los quesos elaborados con los fermentos mixtos y los correspondientes fermentos monomicrobianos. Además, se probaron dos relaciones coco: bacilo; ya que al utilizar una relación 1:1 habíamos visto que las características de textura eran buenas, pero el queso era excesivamente cremoso, lo que podría indicar una proteólisis excesiva; por lo que queríamos evaluar si al cambiar la relación coco: bacilo (2:1), se evidenciaba un cambio en la textura del queso y se obtenía una proteólisis más controlada. Por otro lado, se decidió probar una combinación de cepas en la que no se había visto efecto sinérgico entre cepas (LBB+CP3, figura 1-1-B, tablas 1-7-A y 1-8), para comparar luego las características que otorgaba el fermento al queso, respecto a un fermento en el que sí se había visto efecto sinérgico entre cepas (LBB+CP2). Por otro lado, se repitió la elaboración ya realizada en una pequeña planta de la zona (tabla 3-2-A y B), utilizando un fermento monomicrobiano preparado a partir de una cepa de lactobacilo (LBB) con agregado de 40 ppm de formiato de sodio. El agregado de formiato había permitido mejorar las características de sabor, textura y proteólisis, respecto al queso elaborado sin formiato. Por lo que queríamos determinar si los resultados coincidían al variar la dimensión de la planta, de una pequeña a una planta piloto.

Las tablas 3-3 y 3-4, muestran los datos obtenidos durante el proceso de elaboración de queso cuartirolo. En la serie A, elaboraciones realizadas en

octubre de 1997 (tabla 3-3), se partió de aproximadamente 600 litros de leche, con una acidez de 16°D y un pH que osciló entre 6.60 y 6.67, el contenido de materia grasa de la leche se estandarizó entre 2.75 y 2.96 %.

	Fermentos monomicrobianos y mixtos					
	LBB	LBB+formiato	LBB+CP2 (1:1)	LBB+CP3 (1:1)	LBR	LBR+CP2 (1:1)
Leche:						
Volumen (l)	600	600	600	530	575	600
Acidez °D	16	16	16	16	16	16
pH	6.63	6.60	6.67	6.66	6.60	6.67
Materia grasa	2.80	2.88	2.93	2.75	2.85	2.96
Fermento:*						
acidez °D	56	81	LBB: 58 CP2: 105	LBB: 64 CP2: 98	68	LBR: 71 CP2: 98
pH	5.45	4.45	LBB: 5.45 CP2: 4.19	LBB: 5.30 CP2: 4.18	5.16	LBR: 5.28 CP2: 4.19
L.mezcla:						
acidez °D	16	17	17	18	16.5	16.5
pH	6.63	6.60	6.60	6.61	6.56	6.58
Coagulante bovino, cm³	270	270	280	250	260	270
Temp.coag	33	33	33	33	34	33
Tiempo al corte (min).	30	35	35	35	35	30
Suero de corte, pH	6.49	6.49	6.54	6.52	6.52	6.47
Acidez °D	10	10	11	10	10	10
Rendimiento práctico (%)	11.32	11.32	13.03	12.64	11.06	12.54

Tabla 3-3: Control de parámetros de proceso (elaboración de octubre de 1997).

*En todas las elaboraciones se emplearon 6 litros de fermento monomicrobiano y en el caso de fermentos mixtos (relación 1:1, coco: bacilo), se utilizaron 3 litros de cada uno.

** En todas las elaboraciones se utilizaron cada 600 litros de leche, 120 gramos de Cl₂Ca, 60 gramos de NO₃K y 30 cm³ de colorante.

Los fermentos empleados presentaron una acidez variable, dependiente de la cepa utilizada para prepararlos. El fermento obtenido a partir de LBB con agregado de formiato durante el crecimiento, presentó una acidez mayor que el fermento preparado partiendo de LBB, ya que el formiato aumenta la velocidad de acidificación (Khalid and Marth, 1990; Beal, Spinnler and Corrieu, 1994). Por otro lado, los fermentos de *S. thermophilus* al momento

de ser utilizados presentaban valores de acidez (°D) mayores a los alcanzados por los fermentos obtenidos a partir de distintas cepas de lactobacilos.

El fermento se agregó al 1%, respecto a la cantidad inicial de leche dispuesta en la tina para cada elaboración.

En todas las elaboraciones se utilizó la misma cantidad de cloruro de calcio, nitrato de potasio y colorante; se dejó que la leche aumentara su acidez en 1°D y posteriormente se agregó cuajo bovino para proceder a la coagulación enzimática. La temperatura de la leche durante la coagulación fue de aproximadamente 33°C y el tiempo al corte fue de 30 a 35 minutos. El suero de corte presentaba una acidez de aproximadamente 10°D. El *rendimiento práctico* (es decir los kilogramos de queso obtenido respecto a la cantidad de leche utilizada para cada elaboración) en todas las elaboraciones osciló entre el 11 y el 13% (tabla 3-3).

En la serie B, elaboraciones realizadas en junio de 1998 (tabla 3-4) se utilizó menor cantidad de leche, variable entre 200 y 300 litros, con una acidez de 15 a 16°D y un contenido de materia grasa un poco mayor que el que presentara la leche en la serie A (tabla 3-3).

La acidez de los fermentos estuvo entre los 70 y los 90°D. En la planta piloto se partió del mismo fermento original (LBP) para hacer el repique para las dos elaboraciones: (LBP, fermento monomicrobiano, para la elaboración 2) y (LBP+CP2, fermento mixto, para la elaboración 6). En el primer caso, dado que el fermento preparado con la cepa LBP en general acidifica muy lentamente, se lo dejó más tiempo que el habitual para que acidificara (más de 12 horas de incubación a 42°C). En la preparación del fermento para la elaboración 6, con fermento mixto se lo dejó el tiempo normalmente utilizado (6-8 horas) para que acidificara incubando a 42°C. Comparando la acidez de los fermentos LBP, se observa que el correspondiente a la elaboración 6 (LBP+CP2) presentó una acidez final muy baja (30°D), mientras que el fermento LBP correspondiente a la elaboración 2 alcanzó una acidez mayor (70°D), pero posiblemente la bacteria que acidificó en mayor grado no fue LBP sino una bacteria contaminante. Dado que el fermento LBP de partida

fue el mismo para las elaboraciones 6 y 2, pero éste se comportó de distinta manera durante el repique realizado en la planta piloto del CITIL, y también durante las respectivas elaboraciones como veremos posteriormente (tabla 3-6), suponemos que el problema de contaminación se originó en la planta piloto.

	Fermentos monomicrobianos y mixtos					
	LBB	LBP	LBB+formiato	LBB+CP2 (1:1)	LBB+CP2 (1:2)	LBP+CP2 (1:1)
Leche:						
Volumen (l)	300	350	310	310	220	200
Acidez °D	15	15	16	15	15	16.5
PH	6.67	6.66	6.68	6.68	6.67	6.67
Materia grasa	3.33	3.53	3.60	3.54	3.20	3.12
Fermento:*						
acidez °D	76	70	78	LBB: 90 CP2: 73	LBB: 95 CP2: 70	LBP: 30 CP2: 75
PH	4.10	4.00	4.30	LBB: 3.74 CP2: 3.98	LBB: 3.70 CP2: 4.00	LBP: 5.58 CP2: 3.56
L.mezcla:						
acidez °D	17.5	18	18	17	17	17.5
PH	6.61	6.60	6.60	6.61	6.59	6.58
Coagulante bovino, cm³	130	130	130	130	90	80
Temp.coag	34	34	34	34	34	34
Tiempo al corte (min).	35	35	35	50	35	30
Suero de corte, pH	6.56	6.53	6.54	6.54	6.52	6.47
Acidez °D	12	11	12	11	12	11
Rendimiento práctico	12.99	16.74	16.32	15.92	14.78	16.37

Tabla 3-4: Control de parámetros de proceso (elaboración de junio de 1998).

*En todas las elaboraciones se emplearon 3 litros de fermento monomicrobiano y en el caso de fermentos mixtos (relación 1:1, coco: bacilo), se utilizaron 1.5 litros de cada uno y relación 2:1, coco: bacilo, se utilizaron 1.4 y 0.7 litros, respectivamente.

** En todas las elaboraciones se utilizaron cada 600 litros de leche, 120 gramos de Cl₂Ca, 60 gramos de NO₃K y 30 cm³ de colorante.

El cloruro de calcio, nitrato y colorante fue agregado en la misma proporción a la empleada en las elaboraciones anteriores (tabla 3-3). Se dejó que la acidez de la leche aumentara 1°D, posteriormente se agregó el cuajo bovino, para proceder a la coagulación enzimática, en las condiciones ya utilizadas

en la serie A (tabla 3-3); exceptuando la elaboración 4, en la que el tiempo al corte fue de 50 minutos. El suero de corte presentó una acidez variable entre 11 y 12°D. El rendimiento práctico quesero fue un poco mayor respecto al obtenido en la serie A (tabla 3-3) y osciló entre el 13 y el 17%.

En cuanto al contenido bacteriano de la leche cruda utilizada en la serie A (octubre de 1997), presentó un recuento de microorganismos aerobios mesófilos entre 1.60 y 3.20×10^6 ufc/ ml, un contenido de células somáticas que osciló entre 440.000 y 500.000 y detección de inhibidores negativo. La leche luego de la pasteurización presentó un contenido de coliformes menor a 1 ufc/ml.

La leche cruda utilizada para las distintas elaboraciones de la serie B (junio de 1998), presentó un recuento de microorganismos aerobios mesófilos entre 0.90 y 5.0×10^6 ufc/ ml, un contenido de células somáticas que osciló entre 370.000 y 630.000 y detección de inhibidores negativo. La leche luego de la pasteurización presentó un contenido de coliformes que osciló entre 1 y 64 ufc/ml.

En la tabla 3-5-A, B y C: se detallan los datos obtenidos en la serie A (octubre de 1997).

No se observaron diferencias significativas en el *contenido de nitrógeno TCA-soluble* que presentaron suero y masa correspondientes a cada una de las elaboraciones. Tampoco hubo diferencias en el contenido de nitrógeno de los distintos fermentos utilizados, a excepción de la elaboración 3 (LBB+CP2). De igual manera, no se observaron diferencias significativas en la producción de nitrógeno soluble obtenida en los quesos elaborados con LBB (fermento monomicrobiano), LBB+CP2, LBB+CP3 (fermentos mixtos) y LBB+formiato (fermento monomicrobiano).

Respecto al queso elaborado con LBB con y sin agregado de formiato, previamente, (tabla 3-2-A) se habían visto diferencias significativas a nivel de proteólisis entre el queso elaborado con y sin formiato, por lo que la presencia de formiato aumentaría la actividad proteolítica de LBB. Sin embargo, en la primera elaboración efectuada en el CITIL (tabla 3-5-A), no

Elaboración de queso cuartirolo

se vieron éstas diferencias. Según Juárez, Alonso y Ramos (1983) los altos recuentos de hongos y levaduras pueden elevar los valores de tirosina, de manera de detectar un contenido de nitrógeno soluble mayor al esperado.

		Elaboración 1 (LBB)	Elaboración 2 (LBB+Form)	Elaboración 3 (LBB+CP2)	Elaboración 4 (LBB+CP3)	Elaboración 5 (LBR)	Elaboración 6 (LBR+CP2)
Nitróg. soluble	masa	3.50± 0.15	4.40± 0.33	4.00± 0.41	3.70± 0.28	2.50± 0.50	2.20± 0.70
	suero	1.50± 0.11	1.40± 0.20	1.10± 0.13	1.10± 0.09	0.90± 0.10	1.80± 0.38
	Fermento	5.00± 0.50	6.50± 0.50	9.40± 0.20	6.30± 0.37	5.30± 0.30	7.10± 0.66
	Leche+Fer	3.90± 0.43	4.60± 0.25	3.60± 0.15	2.00± 0.12	3.00± 0.15	2.00± 0.14
	queso 10d	2.80± 0.34	3.40 ± 0.57	3.80± 0.39	2.95 ± 0.42	3.22± 0.22	3.80 ± 1.21
	queso 20d	5.60 ± 0.77	6.30 ± 1.29	6.85 ± 1.51	4.50 ± 0.94	4.35± 0.81	7.20 ± 1.08
dureza	10dias	0.82± 0.056	0.77 ± 0.014	0.28± 0.10	0.32 ± 0.056	1.01 ± 0.10	0.30± 0.56
	20dias	1.07 ± 0.007	0.45 ± 0.042	0.54 ± 0.014	0.49 ± 0.13	0.82 ± 0.020	0.38 ± 0.014
pH	masa	7.13± 0.09	7.05± 0.05	6.84± 0.10	6.85± 0.10	7.08± 0.08	6.67 0.10
	suero	6.59± 0.05	6.53± 0.03	6.52± 0.02	6.51± 0.01	6.57± 0.03	6.57 0.09
	fermento	5.43± 0.08	4.56± 0.01	4.67± 0.03	4.54± 0.04	5.14± 0.04	4.85 0.05
	L+F	6.80± 0.10	6.80± 0.09	6.77± 0.07	6.73± 0.13	6.75± 0.11	6.83 0.06
	queso 10d	5.91± 0.01	5.72± 0.12	5.62± 0.01	5.72± 0.02	6.03± 0.03	5.75± 0.05
	queso 20d	5.85± 0.02	5.36± 0.02	5.46± 0.04	5.52± 0.12	5.75± 0.15	5.66± 0.03
Fundi- bilidad	10dias	46.6 ± 9.19	46.6 ± 9.19	73.3 ± 18.80	29.95 ± 4.33	27.0 ± 1.41	40.9 ± 1.41
	20dias	59.5 ± 0.70	79.5 ± 9.19	84.5 ± 16.20	79.5 ± 9.19	61.0 ± 1.41	76.5 ± 4.94

Tabla 3-5-A: Determinación de distintos parámetros para evaluar la maduración de queso cuartirolo.

Los valores de nitrógeno TCA-soluble corresponden al promedio de cuatro datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de dureza corresponden al promedio de ocho datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de pH corresponden al promedio de duplicados obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de fundibilidad corresponden al promedio de seis datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Esto explicaría que no se hallan visto diferencias entre los quesos elaborados con LBB con y sin formiato, ya que el queso elaborado con LBB sin formiato presentó recuento de hongos y levaduras muy alto (tabla 3-5-C), lo que daría un valor erróneo en el contenido de nitrógeno TCA-soluble (evaluado como mg tirosina/100ml).

Al comparar las características de proteólisis obtenidas por los quesos

elaborados con los fermentos mixtos LBB+CP2 y LBB+CP3 tampoco se observaron diferencias en el contenido de nitrógeno soluble. Las características sinérgicas observadas previamente entre cepas en la combinación LBB+CP2 (figura 1-1B y tabla 1-7-A) nos llevaban a esperar un estímulo del estreptococo sobre la proteólisis producida por el lactobacilo, no así en la combinación de cepas LBB+CP3, en la que no se había visto efecto sinérgico entre cepas.

Entre el queso elaborado con la cepa LBR y LBR+CP2 hubo diferencias significativas en el contenido de nitrógeno soluble (según el Test LSD de mínima diferencia significativa, se obtuvo un $\alpha < 0.05$). El queso elaborado con el fermento mixto alcanzó un valor de tirosina de prácticamente el doble respecto al obtenido por LBR (fermento monomicrobiano).

En cuanto a las *características de textura*, se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre los valores de dureza del queso elaborado con la cepa LBB respecto al queso elaborado con LBB+CP2, LBB+CP3 (la diferencia en la textura respecto a LBB ya se notó a los 10 días) y LBB+formiato (la diferencia en textura entre LBB y LBB+formiato recién se notó a los 20 días). Para el primer queso (LBB), el valor de dureza al final de la maduración fué del doble respecto al obtenido para los otros quesos. También se observaron diferencias significativas al comparar los valores de dureza obtenidos para los quesos elaborados con la cepa LBR y LBR+CP2 (la diferencia en la textura ya se notó a los 10 días); en el queso elaborado con el fermento mixto hubo mayor proteólisis y mejoraron las características de textura.

Los valores de textura para el queso LBB+CP2 y LBB+formiato fueron equivalentes; lo que significaría que el formiato podría utilizarse para reemplazar al estreptococo utilizado en la formulación de fermentos mixtos.

En cuanto a la *acidificación*, se obtuvo una pequeña diferencia en la velocidad de acidificación de los fermentos utilizados para los quesos elaborados con la cepa LBB y LBB+formiato, que ya se había visto previamente (tabla 3-2-A). Esto constituye una ventaja importante en la elaboración de quesos y yogurt ya que acorta los tiempos de fermentación.

El pH de los quesos al término de la maduración, en todos los casos llegó al

valor deseado $\text{pH}=5.0\pm 0.50$ (Bertola y col. 1992), a pesar de que durante algunas elaboraciones (LBB y LBR), el pH no bajó adecuadamente.

Se observaron diferencias significativas entre las características de *fundibilidad* obtenidas a los 20 días de maduración para los quesos elaborados con LBB y LBB+formiato. Similares diferencias se observaron al comparar los quesos elaborados con LBB y LBB+CP2 y también entre los quesos elaborados con LBR respecto al queso elaborado con LBR+CP2 (Tabla 3-5-A).

Las características externas de los quesos se evaluaron en el momento en que se tomaron las muestras para las determinaciones de textura.

Características externas:

10 días de maduración:

Todos los quesos liberaron mucho suero a los 10 días, pero en el caso de los quesos elaborados con LBB y LBR (fermento monomicrobiano), el desuerdo continuó hasta los 20 días, probablemente por escasa acidificación del fermento, debido a que las bacterias se hallaban en fase de declinación o muerte. Además, todos los quesos estaban muy salados.

*Queso elaborado con **LBB y LBR**: resultaron los dos más desagradables a la vista; textura: poco uniforme, granulosa, se degrana con facilidad; masa: dura y poco elástica. El queso elaborado con la cepa LBB presentó muchos ojos, posiblemente debidos a la presencia de coliformes; sabor: no muy agradable, muy amargo y salado. Estas características son importantes desde el punto de vista higiénico-sanitario, ya que al acidificar lentamente los fermentos, dá lugar a que predomine la flora contaminante.

*Queso elaborado con **LBB+formiato**: masa: tierna, bastante elástica y cremosa, sin ojos; textura: más uniforme y compacta que la obtenida con LBB; sabor: bastante agradable, suave.

*Queso elaborado con **LBB+CP2**: textura: muy cremoso, se escapa de la bolsa, uniforme y compacto. Masa: tierna, tipo crema, sin ojos; sabor: agradable.

*Queso elaborado con **LBB+CP3**: textura: no muy uniforme, poco compacta; masa: bastante dura, se degrana, sin ojos; sabor: muy salado.

*Queso **LBR+CP2**: textura: bastante cremosa y compacta; masa: blanda y elástica, sin ojos; sabor: agradable.

20 días de maduración:

*Queso elaborado con LBB y LBR: ídem 10 días.

*Queso elaborado con LBB+formiato: ídem 10 días.

*Queso elaborado con LBB+CP2 y LBR+CP2: ídem 10 días.

*Queso elaborado con LBB+CP3: textura: bastante buena, un poco más uniforme que la obtenida a los 10 días; masa: bastante dura, sin ojos; sabor: bastante fuerte, no muy agradable.

En la tabla 3-5-B, se observan los recuentos de bacterias lácticas obtenidos para las distintas elaboraciones.

Muestra	queso 1 LBB		queso 2 LBB+form.		queso 3 LBB+CP2		queso 4 LBB+CP3		queso 5 LBR		queso 6 LBR+CP2	
	coco	bacilo	coco	bacilo	coco	bacilo	coco	bacilo	coco	bacilo	coco	bacilo
fermento	—	15.0± 1.0	—	90.0± 50.0	320.0± 250	30.0± 2.0	25± 0.5	2.5± 0.5	—	15± 0.3	12± 0.8	2.0± 0.05
suero de corte	—	0.02± 0.01	—	0.07± 0.01	0.45± 0.35	0.03± 0.01	1.0± 0.3	0.25± 0.05	—	0.1± 0.03	0.12± 0.2	0.05± 0.01
pre-prensa (masa)	—	0.25± 0.05	—	2.5± 1.5	4.0± 0.5	0.45± 0.35	10± 0.1	0.3± 0.1	—	1.4± 0.4	3.8± 0.8	0.3± 0.15
queso 10 días	—	3.0± 0.2	—	9.0± 0.5	40.0± 5.0	3.0± 0.2	15± 0.08	1.0± 0.2	—	6.0± 0.7	20± 0.4	1.5± 0.05
queso 20 días	—	5.0± 1.0	—	8.0± 0.7	60.0± 8.0	4.5± 1.5	20± 0.5	2.2± 0.4	—	5.0± 0.4	13± 0.3	2.0± 0.5

Tabla 3-5-B: Recuentos de bacterias lácticas (medio 1.1.1) en queso cuartirolo (10⁶ UFC/g).

Los valores de recuentos corresponden al promedio de duplicados obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los recuentos correspondientes a los fermentos preparados a partir de distintas cepas de lactobacilos fueron del orden de 10⁶- 10⁷ufc/ ml, mientras que para los fermentos obtenidos a partir de diferentes cepas de estreptococos fueron un orden mayor. De igual forma, los recuentos diferenciales de estreptococos en suero fueron un orden mayor que los recuentos de lactobacilos. Los recuentos obtenidos para los quesos a los 10

y a los 20 días fueron del orden de 10^6 ufc/g para los lactobacilos y un orden mayor para los estreptococos. Los recuentos de bacterias lácticas no mostraron grandes variaciones entre los 10 y los 20 días.

En la tabla 3-5-C se observan los recuentos de bacterias totales y hongos y levaduras, determinados en los quesos a los 10 y a los 20 días de maduración.

Muestra	queso 1 LBB		queso 2 LBB+form.		queso 3 LBB+CP2		queso 4 LBB+CP3		queso 5 LBR		queso 6 LBR+CP2	
	Totales 10^6	H y L 10^4	totales 10^6	H y L 10^4	totales 10^6	H y L 10^4	totales 10^6	H y L 10^4	totales 10^6	H y L 10^4	totales 10^6	H y L 10^4
queso 10días	10.0±3.6	100.0± 10.0	4.0±0.5	4.0±0.3	2.0±0.6	0.9±0.1	4.0±0.7	1.0±0.2	15.0±1.2	4.0±0.2	2.0±0.1	0.5±0.1
queso 20 días	4.0±2.0	400.0± 35.0	8.0±0.9	3.0±0.2	5.0±1.0	4.0±0.4	7.0±1.0	2.0±0.3	6.0±0.4	9.0±0.3	5.0±0.5	5.0±0.6

Tabla 3-5-C: Recuentos de bacterias totales (medio PCA) y hongos y levaduras (YGC) en queso cuartirolo (UFC/g).

Los valores de recuentos corresponden al promedio de duplicados obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los recuentos de bacterias totales tampoco presentaron grandes variaciones entre los 10 y los 20 días de maduración para cada una de las elaboraciones, y fueron del orden de 10^6 ufc/g. El contenido de hongos y levaduras fue similar para todos los quesos, y del orden de 10^4 ufc/g, a excepción del queso elaborado con LBB, en que el recuento de hongos y levaduras fue un orden mayor (tabla 3-5-C).

En la Tabla 3-6, se observan los datos obtenidos en la serie B (elaboraciones efectuadas en la planta del CITIL en junio de 1998). No se observaron diferencias significativas en la *acidificación* alcanzada por los quesos a los 10 y a los 20 días de maduración, a excepción del queso elaborado con el fermento preparado partiendo de la cepa LBP. En la preparación de éste fermento, hubo un problema de competencia con una bacteria contaminante, ya que la cepa de *L. bulgaricus*, LBP acidificó muy lentamente, durante el repique realizado en la planta piloto. Por éste problema, el pH del queso a los 10 y a los 20 días fue superior al pH

Elaboración de queso cuartirolo

QUESO	tiempo maduración	LBB (1)	LBP * (2)	LBB+formiato (3)	LBB+CP2 1:1 (4)	LBB+CP2 1:2 (5)	LBP+CP2 1:1 (6)
pH	10d	5.90±0.070	6.33±0.091	5.69±0.14	5.57±0.014	5.90±0.063	5.51±0.18
	20d	5.88±0.014	6.19±0.12	5.35±0.084	5.50±0.035	5.68±0.084	5.50±0.035
fundibilidad	10d	25.0±1.41%	13.95±3.80%	44.5±2.12%	48.5±2.12%	26.5±9.19%	18.30±2.40%
	20d	26.5±9.19%	13.00±2.82%	46.5±9.19%	60.0±14.14%	68.5±12.02%	50.0±14.14%
humedad (g. agua/g. queso)	10d	46.95±1.06%	52.30±0.42%	50.35±1.06%	52.60±0.42%	53.10±0.42%	56.25±0.77%
	20d	51.10±0.28%	51.30±1.27%	52.0±0.84%	56.40±0.56%	51.80±0.28%	53.70±0.70%
dureza (kg)	10d	1.94±0.39	2.91±0.063	1.47±0.098	1.04±0.22	1.63±0.035	1.02±0.32
	20d	1.74±0.36	2.79±0.077	0.89±0.19	0.65±0.04	0.80±0.20	0.58±0.014
sinéresis	10d	(b)	(c)	(b)	(b)	(a)	(c)
	20d	(b)	(c)	(b)	(a)	(a)	(b)
Nitrógeno soluble	10d	2.90±0.21	2.86±0.25	2.58±0.12	2.77±0.28	2.65±0.16	3.97±0.33
	20d	6.89±0.61	3.67±0.67	10.90±0.36	9.87±0.24	9.64±0.13	8.40±1.18
Rec. tot. (10 ⁶)	10d	0.45±0.070	40.0±2.82	1.27±1.10	22.0±11.31	14.75±7.42	1.95±1.48
	20d	0.90±0.14	65.0±6.36	0.65±0.49	12.0±1.41	38.0±30.0	8.0±4.75
Rec. bact. lact. (10 ⁶)	10d	7.25±0.35	nd	5.50±0.35	3.0b- 30.0c**	0.5b- 13.0c	1.5b- 20.0c
	20d	3.75±2.47	nd	18.0±8.48	0.2b- 12.0c	0.3b- 12.0c	0.3b- 8.0c
Rec. h y lev. (10 ³)	10d	20.50±15.50	240.0±226.2	9.89±8.0	6.25± 5.30	4.24±4.04	16.50±4.95
	20d	4.24±4.04	123.0±112.0	1.50± 0.70	13.50±9.19	3.00±1.41	2.00±0.05

Tabla 3-6: Determinación de distintos parámetros para evaluar la maduración de queso cuartirolo (elaboración de junio de 1998).

Determinación de sinéresis: tamaño original de la muestra de queso= 1.5 cm de diámetro.

(a) desueró poco: diámetro del halo de suero = mitad de su tamaño original

(b) desueró medianamente: diámetro del halo de suero = doble de su tamaño original

(c) desueró mucho: diámetro del halo de suero = más del doble de su tamaño original

** "b y c" significa recuento diferencial de lactobacilos y estreptococos, respectivamente, en cultivos mixtos.

nd: no determinado.

Los valores de nitrógeno TCA-soluble corresponden al promedio de cuatro datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de dureza corresponden al promedio de ocho datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de pH corresponden al promedio de duplicados obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de fundibilidad corresponden al promedio de seis datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de recuentos corresponden al promedio de duplicados obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de humedad corresponden al promedio de ocho datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Los valores de sinéresis corresponden al promedio de ocho datos obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

obtenido para los demás quesos.

A los 20 días, se observó una pequeña diferencia en la acidificación alcanzada ($\Delta\text{pH} = 0.53$) por el queso elaborado con LBB+formiato, respecto al queso control (LBB), diferencia que ya se había observado en las elaboraciones anteriores (tabla 3-2-A y 3-5-A). El pH de los quesos al término de la maduración en todas las elaboraciones llegó al valor deseado, $\text{pH}=5.0\pm 0.50$ (Bertola y col. 1992); a excepción del queso elaborado con LBP, en que el pH fue superior a 6.00.

Se observa que las características de *fundibilidad* mejoraron tanto a los 10 como a los 20 días, en el queso elaborado con LBB+formiato, respecto al queso control (elaborado con LBB). También mejoró la fundibilidad de los quesos elaborados con fermentos mixtos (LBB+CP2 en las dos relaciones coco: bacilo ensayadas) respecto al queso control, a los 20 días de maduración. Sin embargo, a los 10 días de maduración, las características de fundibilidad del queso elaborado con LBB+CP2, en relación 1:2 eran similares a las obtenidas con el fermento LBB. Similares diferencias se observaron al comparar la fundibilidad de los quesos elaborados con LBP y LBP+CP2.

Se observaron pequeñas diferencias en el *contenido de humedad* obtenido en los quesos elaborados con fermentos mixtos (LBB+CP2 y LBP+CP2), respecto a los quesos controles (LBB y LBP), tanto a los 10 como a los 20 días de maduración. No se observaron diferencias entre el contenido de agua que presentó el queso elaborado con LBB y el que presentó el queso elaborado con el fermento LBB con agregado de formiato.

Los quesos que presentaron mayor *sinéresis* fueron los elaborados con fermento monomicrobiano (LBB y LBP). También presentaron sinéresis apreciable, aunque en menor grado que los anteriormente enumerados, los quesos elaborados con LBB+formiato y LBB+CP2.

En cuanto a las características de proteólisis, no se observaron diferencias significativas en el contenido de nitrógeno TCA-soluble alcanzado por los

quesos elaborados con LBB, LBB+CP2 y LBB+formiato, a los 10 días de maduración. Pero sí se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) en el contenido de nitrógeno TCA-soluble que presentaron los quesos elaborados con LBB, LBB+formiato (ésto concuerda con lo observado en las elaboraciones realizadas en la planta del Dr. Castro, tabla 3-2-A), y entre LBB y LBB+CP2 (en las dos relaciones coco: bacilo), a los 20 días de maduración. Similares diferencias se observaron entre los quesos elaborados con LBP y LBP+CP2 a los 20 días de maduración. El queso elaborado con LBB+formiato alcanzó niveles de nitrógeno soluble al término de la maduración, similares a los alcanzados por los quesos elaborados con fermentos mixtos.

En cuanto a las *características de textura*, se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre los valores de dureza que presentaron los quesos elaborados con la cepa LBB respecto al queso elaborado con LBB+CP2 y LBB+formiato (la diferencia en la textura respecto a LBB ya se notó a los 10 días). Para el primer queso (LBB), el valor de dureza al final de la maduración fué mayor (aproximadamente el doble) respecto al valor que presentaron los otros quesos. Por otro lado, no hubo mayor variación en la textura del queso elaborado con LBB entre los 10 y los 20 días de maduración, lo que indicaría que hubo menor grado de proteólisis. También se observaron diferencias significativas al comparar los valores de dureza obtenidos para los quesos elaborados con la cepa LBP y LBP+CP2 (la diferencia en la textura ya se notó a los 10 días); en el queso elaborado con el fermento mixto hubo mayor grado de proteólisis, lo que permitió que mejoraron las características de textura.

Los valores de dureza para el queso LBB+CP2 y LBB+formiato fueron equivalentes; lo que significaría que el formiato podría utilizarse para reemplazar al estreptococo utilizado en la formulación de fermentos mixtos, y además indicaría que el grado de proteólisis alcanzado fue similar, tanto en el queso elaborado con fermento mixto como con el fermento LBB con agregado de formiato.

Por otro lado, se vió que resultaron equivalentes las características de textura y de proteólisis (evaluada como producción de nitrógeno TCA-

soluble) de los quesos elaborados con LBB+CP2 en las dos relaciones coco: bacilo.

El aumento en el contenido de nitrógeno TCA-soluble, al avanzar la maduración, se corresponde con una disminución en la dureza. Sin embargo, ésta disminución sólo puede ser detectada cuando el contenido de humedad no varía significativamente. La disminución en el contenido acuoso, durante la maduración, genera un aumento en los parámetros de textura y éste aumento compensa la disminución producida por la proteólisis (Bevilacqua, 1997). Dado que el contenido acuoso de los quesos no varió significativamente entre los 10 y los 20 días de maduración, pudo observarse el aumento en el contenido de nitrógeno soluble y la correspondiente disminución en los valores de dureza obtenidos para los diferentes quesos al término de la maduración (Tabla 3-6).

En cuanto a los *recuentos de bacterias totales*, los quesos que presentaron mayores valores de recuentos fueron los elaborados con fermento mixto (LBB+CP2, en las dos relaciones coco: bacilos) y el queso elaborado con LBP. Los *recuentos de bacterias lácticas* a los 20 días de maduración, en el queso elaborado con LBB fueron del orden de 10^6 ufc/g, mientras que en el queso elaborado con LBB+formiato fueron un orden mayor. En los quesos elaborados con fermentos mixtos, los recuentos de estreptococos fueron un orden mayor a los obtenidos para los lactobacilos, a los 10 y 20 días de maduración.

Al analizar los recuentos obtenidos para hongos y levaduras se observa que no hubo mayores diferencias entre los quesos, a excepción del queso elaborado con LBP en que los recuentos fueron notablemente mayores.

Análisis descriptivo y aceptabilidad sensorial de queso cuartirolo:

Se realizó un análisis descriptivo y de aceptabilidad sensorial de los quesos elaborados en la serie B (de junio de 1998). Con los resultados obtenidos del *análisis descriptivo* de queso cuartirolo se realizó un Análisis de Varianza, los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas (3-7-A, B, C y D).

Si las muestras presentan el mismo parámetro a, b ó c (en las tablas 3-7-A, B C ó D), significa que los evaluadores las encontraron similares entre sí en cada uno de los descriptores analizados.

SABOR						
Descriptor	NS muestra*	muestras				
		M 1 (LBB)	M 2 (LBB+Form)	M 3 (LBB+CP2) 1:1	M 4 (LBB+CP2) 1:2	M 5 (LBP+CP2) 1:1
intensidad total	0.297	52.8 a	65.6 a	63.6 a	63.5 a	60.9 a
salado	0.049	41.9 c	59.7 bc	48.8 ab	52.8 ab	64.2 a
dulce	0.564	15.3 a	11.0 a	11.9 a	9.8 a	10.2 a
acido	0.336	34.4 a	45.8 a	39.9 a	43.6 a	46.5 a
amargo	0.498	14.0 a	19.7 a	21.6 a	16.1 a	20.4 a
crema/leche	0.026	31.5 ab	34.6 b	36 b	22 a	22 a
yogur	0.023	3.66 a	11.4 b	12.7 b	10.1 b	8.5 ab
cocido	0.668	14.4 a	13.1 a	11.7 a	9.8 a	13.6 a
suero	0.221	8.1 a	16.5 a	11.3 a	15.2 a	15.1 a
picante	0.209	15.6 a	26.1 a	17.2 a	19.0 a	16.5 a
intensidad residual	0.165	40.8 a	53.2 a	53.0 a	54.2 a	44.9 a

Tabla 3-7-A : Promedio de las muestras para el atributo sabor.

* NS: nivel de significación para las muestras, se tomó $\alpha < 0.05$

Los valores corresponden al promedio de nueve datos (panel entrenado formado por nueve personas) obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

Se observaron diferencias significativas entre las muestras en el descriptor salado, las muestras 2 (LBB) y 5 (LBP+CP2) fueron las que presentaron mayores puntajes, es decir la característica de salado con mayor intensidad. Por otro lado, las muestras 3 (LBB+CP2), 4 (LBB+CP2) y 5 (LBP+CP2) presentaron características en común, al igual que las muestras 1 (LBB) y 2 (LBB+formiato).

También se observaron diferencias significativas entre las muestras en el descriptor crema/ leche, las muestras 2 y 3 se diferenciaron de las muestras 4 y 5, mientras que la muestra 1 presentó características en común con todas las otras muestras.

En el descriptor yogur, se diferenciaron las muestras 2, 3 y 4 de la muestra 1 (queso elaborado con fermento monomicrobiano); mientras que la muestra 5 presentó características en común con todas las muestras.

En el resto de los descriptores (intensidad total, dulce, ácido, amargo, cocido, suero, picante e intensidad residual) no se observaron diferencias significativas entre las muestras, correspondientes a las distintas elaboraciones.

AROMA						
Descriptor	NS muestra*	muestras				
		M1	M2	M3	M4	M5
intensidad total	0.009	57.6 b	45.8 a	46.7 a	41.3 a	39.5 a
dulce	0.286	13.1 a	18.1 a	16.4 a	13.3 a	13.6 a
acido/agrio	0.424	39.2 a	33.6 a	39.1 a	32.1 a	34.5 a
crema/leche	0.537	37.3 a	30.1 a	30.9 a	30.1 a	28.2 a
fermentado	0.009	35.4 c	26.3 abc	27.4 bc	22 ab	16.6 a

Tabla 3-7-B: Promedio de las muestras para el atributo aroma.

* NS: nivel de significación para las muestras, se tomó $\alpha < 0.05$

Los valores corresponden al promedio de nueve datos (panel entrenado formado por nueve personas) obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

En la tabla 3-7-B se observa que hubo diferencias significativas entre las muestras en el descriptor *intensidad total*, la muestra 1 (LBB) se diferenció

del resto y fue la que presentó mayor puntaje (en la escala de 0 a 100). Lo que significa que el queso elaborado con el fermento LBB presentó el descriptor intensidad total más acentuado. También se observaron diferencias significativas en el descriptor *fermentado*; las cinco muestras, cada una en particular, presentaron características en común con alguna de las otras muestras. La que obtuvo mayor puntaje, es decir más aroma a fermentado fue la muestra 1 (queso elaborado con la cepa LBB, en fermento monomicrobiano).

En el resto de los descriptores; dulce, ácido/ agrio y crema /leche no se observaron diferencias significativas entre las muestras.

TEXTURA MANUAL						
Descriptor	NS muestra*	muestras				
		M1	M2	M3	M4	M5
untabilidad	0.005	26.7 a	29.4 a	62.0 b	27.9 a	40.4 a
pegajoso	0.001	17.5 a	26.1 a	64.7 c	43.8 b	60.3 c

Tabla 3-7-C: Promedio de las muestras para el atributo textura manual.

* NS: nivel de significación para las muestras, se tomó $\alpha < 0.05$

Los valores corresponden al promedio de nueve datos (panel entrenado formado por nueve personas) obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

En cuanto al trabajo manual (tabla 3-7-C), se obtuvieron diferencias significativas en los dos descriptores analizados (untabilidad y pegajosidad). La muestra 3 (LBB+CP2) fue la que presentó mayores características de untabilidad y pegajosidad, es decir mayor puntaje. Por otro lado, la muestra 1 (LBB) fue la que presentó menor puntaje para éstos dos descriptores (concuenda la determinación sensorial con la determinación instrumental de la dureza del queso, tabla 3-6).

En cuanto a la textura bucal, se observa (en la tabla 3-7-D) que en el descriptor *dureza* se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras. La muestra 1 (LBB) fue la que obtuvo mayor puntaje, lo que significa que resultó la más dura, diferenciándose del resto de las muestras. En el descriptor cremoso, las muestras 2, 4 y 5 presentaron características

similares, diferenciándose de las muestras 1 y 3. Las muestras que obtuvieron mayores puntajes fueron la 3 y la 5.

También se observaron diferencias significativas entre las muestras en los descriptores elasticidad, dúctil, fundente y trabajo bucal. La muestra 3 (LBB+CP2) fue la que presentó mayores características fundentes, similares a la muestra 5.(LBP+CP2) Además, la muestra 1 (LBB) fue la que requirió mayor trabajo bucal, diferenciándose del resto de las muestras.

TEXTURA BUCAL						
Descriptor	NS muestra*	muestras				
		M1	M2	M3	M4	M5
dureza	0.019	47.3 b	31.9 a	26.2 a	35.8 a	24.2 a
adhesividad	0.186	35.3 a	35.8 a	40.3 a	37.1 a	50.4 a
cremoso	0.002	26.7 b	30.5 a	53.7 b	35.8 a	51.8 a
cohesividad de masa	0.53	36.5 a	35.7 a	45.3 a	38.2 a	39.5 a
elasticidad	0.024	49.7 c	44.9 bc	31.5 ab	43.1 abc	28.7 a
dúctil	0.053	43.4 a	35.8 a	50.6 a	44.4 a	49.6 a
fundente	0.001	27.2 a	32.3 a	54.7 b	37.8 a	54.3 b
trabajo bucal	0.001	52.7 b	32.9 a	30.3 a	41.3 a	30.3 a

Tabla 3-7-D: Promedio de las muestras para el atributo textura bucal.

* NS: nivel de significación para las muestras, se tomó $\alpha < 0.05$

Los valores corresponden al promedio de nueve datos (panel entrenado formado por nueve personas) obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

A modo de resumen, podemos decir que el análisis de varianza para los diferentes atributos de apariencia, aroma, sabor y textura, indica que los evaluadores encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre las muestras en los 12 descriptores que se enumeran a continuación:

*aroma: intensidad total y fermentado (tabla 3-7-B).

*sabor: salado, crema/leche y yogur (tabla 3-7-A).

*textura, bucal: fundente, trabajo bucal, elasticidad, dureza y cremoso (tabla 3-7-C); y en textura manual: pegajoso y untabilidad (tabla 3-7-D).

Si bien los evaluadores presentaron juicios muy dispersos, (ésto podría deberse a falta de entrenamiento, heterogeneidad en una misma muestra, modificación de las características sensoriales del queso durante el almacenamiento, por encontrarse en el límite del período de maduración), no se descartó a ningún evaluador porque los promedios se encontraban dentro de un rango muy pequeño.

Además, se realizó un ANDEVA para cada evaluador en los descriptores que dieron diferencias significativas. Las cinco muestras de queso cuartirolo se diferenciaron entre sí en los doce descriptores anteriormente enumerados, pero la mayoría de los evaluadores no encontraron diferencias significativas entre las muestras.

Se hallaron dos grupos de descriptores en *aroma*: el primero integrado por: crema/leche y dulce. El segundo grupo integrado por: intensidad total, ácido y fermentado. La muestra 1 (LBB), estuvo caracterizada por los descriptores de *aroma*, intensidad total y fermentado y en menor medida por los descriptores dulce y crema/leche. Las muestras 4 y 5 (LBB+CP2 y LBP+CP2, respectivamente), presentaron menor intensidad en éstos descriptores. Las muestras 2 y 3 presentaron características intermedias, entre la 1 y las muestras 4 y 5, y similares entre sí, lo que indica que el queso elaborado con LBB+formiato resultó similar en aroma al queso elaborado con fermento mixto (LBB+CP2). Los duplicados de la muestra 2 (LBB+ formiato) fueron los que mayor variación presentaron entre sí, pero en general, hubo variación entre todos los duplicados de las muestras.

En cuanto al atributo *sabor*, la muestra 1 (LBB) estuvo caracterizada por los descriptores dulce y cocido y en menor grado por los descriptores crema/leche. Por otro lado, en la muestra 1 se percibieron con baja intensidad los descriptores de sabor: ácido, salado, suero, intensidad total, intensidad residual, yogur, picante y amargo. Sin embargo, las muestras 2, 4 y 5 (LBB+ formiato, LBB+CP2 en relación 1:1 y 1:2 coco:bacilo, respectivamente) presentaron mayor intensidad en las cinco primeras de las características anteriormente enumeradas. La muestra 3 presentó características de sabor intermedias entre los dos extremos, anteriormente detallados. La muestra 2 (LBB+ formiato) fue la que presentó mayor

intensidad en la característica de picante, mientras que las muestras 3 y 5 (LBB+CP2 y LBP+CP2), presentaron mayores características de amargor, además las muestras 2 y 3 (LBB+formiato y LBB+CP2) presentaron mayores características de sabor a yogur y crema/ leche.

En cuanto al atributo *textura*, se encontraron dos grupos bien definidos de descriptores que se correlacionaron entre sí. El primero de ellos integrado por: elasticidad, dureza y trabajo bucal; y el segundo grupo, compuesto por: fundente, cremoso, pegajoso, untabilidad, adhesividad, dúctil y cohesividad de masa. La muestra 1 (LBB) fue la que presentó mayores características de dureza, elasticidad y trabajo bucal. Por otro lado, la muestra 3 (LBB+CP2, 1:1, coco: bacilo), evidenció marcadas características de cremoso, dúctil, fundente, pegajoso y untabilidad. La muestra 5 (LBP+CP2, 1:1) presentó marcadas características de: pegajoso, cohesividad de masa, cremoso, dúctil y fundente. Las muestras 2 y 4 presentaron características intermedias entre la muestra 1 y las muestras 3 y 5.

En resumen, se observaron marcadas diferencias en el análisis descriptivo (textura, aroma y sabor), de los quesos elaborados con fermento monomicrobiano (LBB) y fermento mixto (LBB+CP2, en las dos relaciones coco: bacilo). Las características de los quesos elaborados con fermentos mixtos (LBB+CP2 y LBP+CP2) resultaron similares. De igual forma sucedió al comparar los quesos elaborados con LBB+CP2 y LBB+formiato; de ésta forma el formiato podría utilizarse en reemplazo del estreptococo, para la formulación de fermentos.

Los resultados obtenidos en el ***ensayo de aceptabilidad sensorial*** se muestran en la tabla 3-8.

Analizando los resultados presentados en la tabla que se muestra a continuación, se observa que: en cuanto a *preferencia global*, el queso 3 obtuvo el mismo puntaje que el queso testigo (marca comercial), dicho puntaje fue 7 lo que significa que los consumidores opinaron que el queso 3 y el queso testigo "les gustaron moderadamente". Además el hecho que posean el mismo parámetro *c* indica que hubo similitudes entre las muestras. El queso 1 y 2 obtuvieron los menores puntajes, los consumidores opinaron

que los quesos "ni les gustaron ni les disgustaron". Por otro lado, el queso 1 presentó características en común con el queso 2 y el queso 4.

En cuanto a *color* podemos decir que no hubo diferencias en los puntajes obtenidos por nuestros quesos, los consumidores opinaron que el color de los quesos "les gustó un poco". Dichos puntajes fueron un poco menor al obtenido por el queso testigo, que "les gustó moderadamente". Por otro lado, los quesos 3, 4 y 5 presentaron características en común, por tener los parámetros a y b y los queso 1 y 2 eran diferentes al queso testigo.

Muestras	1	2	3	4	5	marca comercial
Atributo	LBB	LBB+formiato	LBB+CP2 (1:1)	LBB+CP2 (1:2)	LBP+CP2 (1:1)	
Preferencia global	4.71 a	4.82 ab	6.65 c	5.35 ab	5.65 b	6.56 c
color	5.91 a	5.91 a	6.29 ab	6.06 ab	6.29 ab	6.76 b
sabor	4.88 a	6.74 b	6.91 b	5.26 a	6.29 b	7.06 b
textura	4.68 a	4.82 a	6.68 b	5.50 a	5.50 a	7.15 b

Tabla 3-8: Promedios de aceptabilidad Sensorial

Los valores corresponden al promedio de treinta y seis datos (panel no entrenado formado por 36 personas) obtenidos a partir de dos quesos, correspondientes a una misma elaboración.

En cuanto a características de *sabor*, los consumidores les dieron mayor puntaje a los quesos 2, 3 y 5, opinando que "les gustaban moderadamente", al igual que el queso testigo. Estos cuatro quesos tenían características en común, que eran diferentes a los quesos 1 y 4.

En cuanto a *textura*, el queso 3 resultó similar al queso testigo, los consumidores opinaron que "les gustaron moderadamente". Mientras que los quesos 1, 2, 4 y 5 presentaron características en común y los consumidores opinaron que "los quesos ni les gustaron ni les disgustaron".

En resumen, éstos resultados indican que en cuanto a *preferencia global*, a los consumidores les resultó igual el queso testigo y el queso elaborado con el fermento mixto LBB+CP2. Por otro lado, el queso 2, elaborado con LBB+formiato les gustó tanto como el queso 4, elaborado con LBB+CP2, diferenciándose del queso elaborado con fermento monomicrobiano. Se observaron diferencias entre el *color* que presentaron los quesos elaborados con fermento monomicrobiano y el color de los quesos elaborados con

fermentos mixtos y también con el queso de marca comercial. En cuanto al *sabor*, los consumidores no encontraron diferencias entre la marca comercial y los quesos 2, 3 y 5, lo que significa que las características obtenidas en el queso elaborado con LBB+formiato fueron similares a las características obtenidas en los quesos elaborados con fermentos mixtos (LBB+CP2 y LBP+CP2), diferenciándose del queso elaborado con LBB. En cuanto a *textura* el queso 3, elaborado con fermento mixto (LBB+CP2), resultó similar al queso marca comercial, diferenciándose del queso elaborado con fermento monomicrobiano (LBB). Por otro lado, el queso elaborado con LBB+formiato, presentó características de textura intermedias, respecto a los quesos anteriormente enumerados.

Los ensayos de *aceptabilidad sensorial*, indican que el formiato podría utilizarse adicionado a un fermento monomicrobiano, reemplazando al estreptococo, ya que las características organolépticas obtenidas fueron similares. Además, el queso elaborado con fermento mixto (LBB+CP2) presentó características similares en cuanto a textura, sabor y preferencia que el queso de marca comercial, diferenciándose sus características respecto al queso elaborado con fermento monomicrobiano.



Figura 3-1: Quesos elaborados con fermento monomicrobiano (LBB) y fermento mixto (LBB+CP2, 1:1 coco: bacilo).

La figura 3-1, muestra que el queso elaborado con el fermento mixto

LBB+CP2 presentó mejor textura y características proteolíticas que el queso control (elaborado con fermento monomicrobiano LBB). Además el queso elaborado con fermento mixto resultó más agradable a la vista respecto al queso control, y fue el mejor posicionado por los consumidores en el ensayo de aceptabilidad sensorial.

La figura 3-2, muestra que al variar la relación coco: bacilo se produce una ligera variación en la textura de los quesos elaborados con el fermento mixto LBB+CP2, en las dos relaciones (1:1 y 1:2, respectivamente), aunque el grado de proteólisis alcanzado en los dos quesos fue similar.

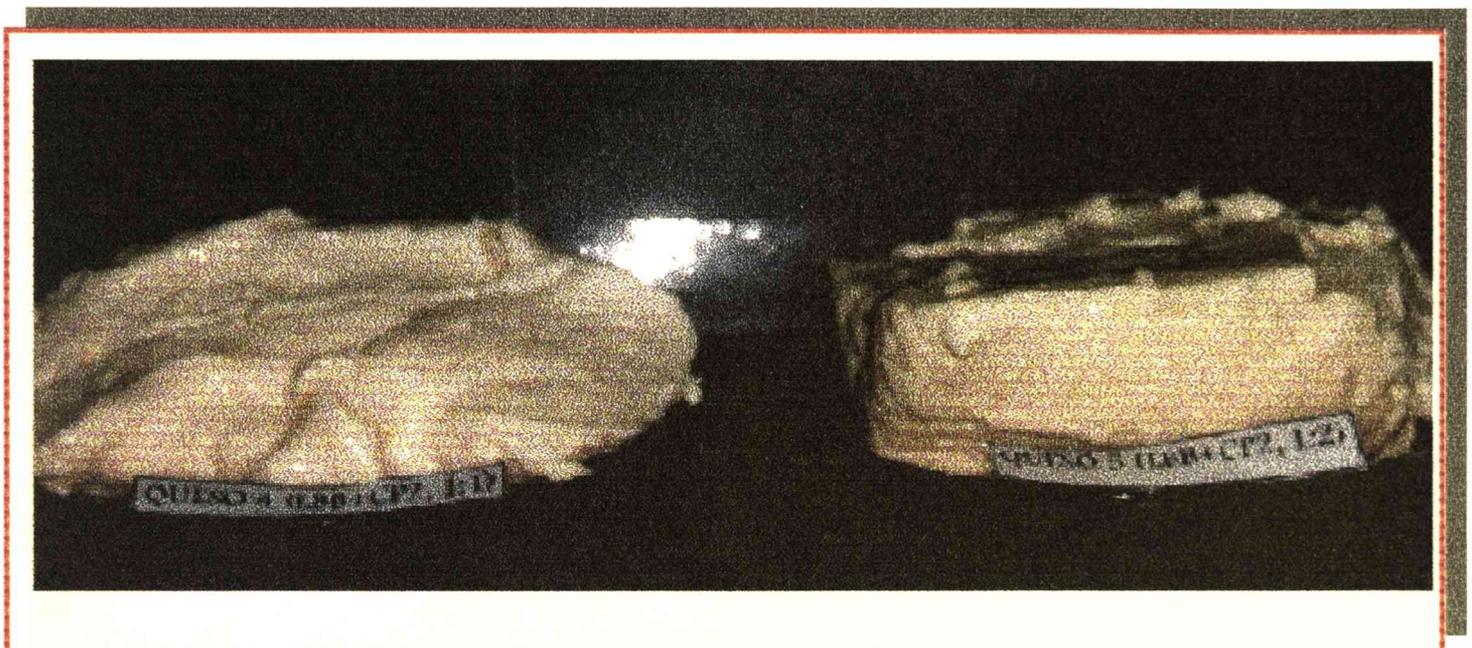


Figura 3-2: Quesos elaborados con fermento mixto (LBB+CP2), en dos relaciones coco: bacilo, 1:1 y 1:2 respectivamente.

La figura 3-3, muestra que el agregado de 40 ppm de formiato de sodio durante la preparación del fermento LBB y como así también a la leche que se va a utilizar para la elaboración correspondiente, permite mejorar la textura y la proteólisis del queso elaborado con formiato, respecto al queso elaborado sin formiato.

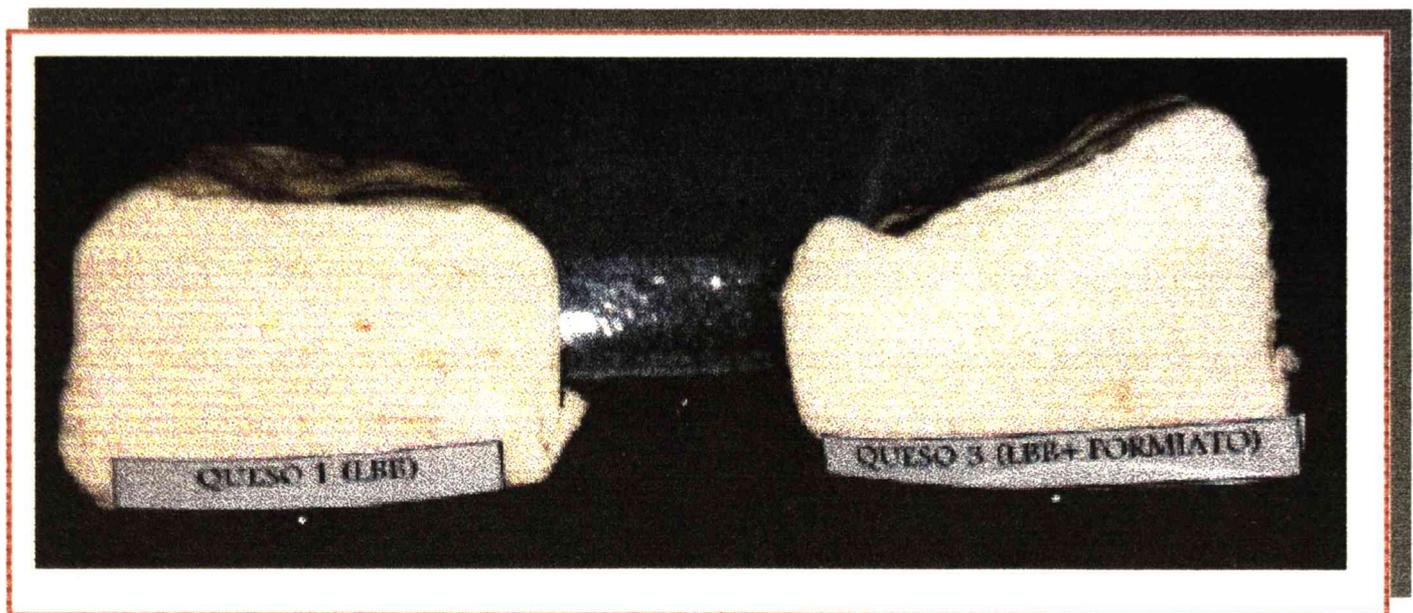


Figura 3-3: Quesos elaborados con fermento monomicrobiano LBB con y sin agregado de formiato de sodio.

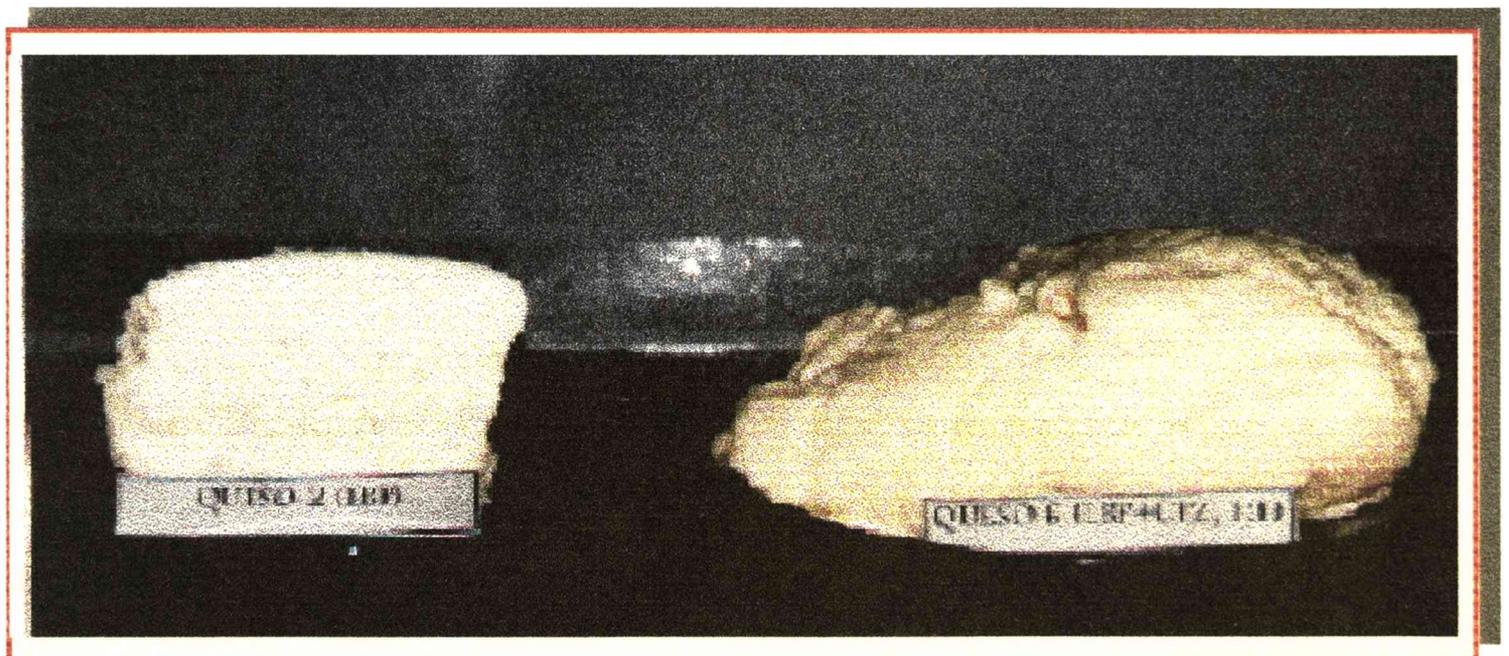


Figura 3-4: Quesos elaborados con fermento monomicrobiano (LBP) y fermento mixto (LBP+CP2, 1:1, coco: bacilo).

La figura 3-4, muestra que el queso elaborado con el fermento mixto LBP+CP2 presentó mejor textura y características proteolíticas que el queso control (elaborado con fermento monomicrobiano LBP). Además el queso elaborado con fermento mixto resultó más agradable a la vista del consumidor respecto al queso control.

CONCLUSIONES

✿ LBB+CP4 es una buena combinación de cepas para formular fermentos mixtos. Los quesos elaborados con esta combinación presentaron buenas características organolépticas y buena textura (tablas 3-1-A y B).

✿ Tanto LBR como LBP en fermento monomicrobiano o mixto, no resultaron fermentos apropiados ya que los quesos no presentaron buenas características organolépticas (tablas 3-1-A y B).

✿ En los quesos elaborados con la cepa LBB+formiato (40ppm) y LBB sin formiato, se obtuvieron diferencias en las características organolépticas y a nivel de proteolisis (tablas 3-2-A y B, 3-6 y 3-8).

✿ La cantidad de Nitrógeno TCA- soluble producida en quesos por la cepa LBB, luego de 1 y 4 semanas de maduración, fué notablemente mayor cuando se agregó 40 ppm de formiato. La presencia del formiato induciría la actividad proteolítica de LBB.

La adición de 40 ppm de formiato de sodio a la leche mejora las características de sabor y textura de queso cuartirolo elaborado con LBB (tablas 3-2-A y B, 3-6 y 3-8).

✿ El agregado de una cepa de estreptococo (CP2) produce similar efecto, mejorando la textura de los quesos elaborados con fermentos mixtos, formulados a partir de CP2 y LBB, LBP y LBR. De la misma forma, CP2 mejora las características de proteólisis en los quesos elaborados con fermentos mixtos (tablas 3-5-A y 3-6).

✿ Las características organolépticas de los quesos elaborados con

fermentos mixtos (LBB+CP2 y LBP+CP2) resultaron similares a las obtenidas para el queso elaborado con LBB+formiato; diferenciándose del queso elaborado con LBB (fermento monomicrobiano). El formiato podría ser utilizado en reemplazo del estreptococo para la formulación de fermentos (tablas 3-6; 3-7-A, B, C, D; 3-8).

✿ El queso elaborado con LBB+CP2 fue el mejor posicionado por los consumidores en el ensayo de aceptabilidad sensorial y resultó similar a la marca comercial (tabla 3-8).

"Discusión y

Conclusiones Generales"

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES:

Los quesos de pasta blanda, entre los cuales se ubica el cuartirolo, son los más conocidos y consumidos del país. Además, dicho consumo presenta una tendencia creciente. Es ampliamente conocido por todos que en los últimos años han surgido tambos que han instalado pequeñas plantas productoras de quesos, que enfrentan la dificultad para acceder a la utilización de fermentos importados por su alto costo. Por otra parte, éstos pequeños productores no siempre cuentan con la información necesaria sobre el manejo de dichos fermentos y además deben enfrentar el problema de la acidificación lenta de algunos fermentos. Está informado en la bibliografía y lo hemos comprobado en nuestro laboratorio, que fermentos con dificultad para acidificar la leche permiten el crecimiento de contaminantes como enterobacterias, que aparecerían durante el proceso de elaboración (tal como se observó con el fermento LBP, correspondiente a la elaboración 2, tabla 3-6). Experimentos realizados en el CIDCA han demostrado que quesos de pasta blanda, procedentes de distintas bocas de expendio, presentaron altos recuentos de coliformes y *E. coli* (Gianuzzi, comunicación personal). Esto está indicando la no utilización de buenas prácticas de manufactura y/o una falla en los fermentos utilizados que conduce a una producción insuficiente de ácido láctico en las primeras etapas de la fermentación. Como una solución posible a todos éstos inconvenientes, surge la utilización de fermentos seleccionados de laboratorio como una alternativa válida para los pequeños productores de quesos.

En el equilibrio que a diario se debe mantener en la industria entre la obtención de productos de buena calidad con un buen rendimiento y costo accesible para el mercado, surge como una ayuda conveniente y de difusión cada vez más amplia el empleo de starters seleccionados de laboratorio. Estos se hallan constituidos por varias cepas de bacterias lácticas con propiedades suficientemente estudiadas y probadas, de tal manera que una vez aisladas las cepas y constituido un cepario permiten obtener cultivos de características constantes y conocidas, de tal manera que resulten óptimos para caracterizar una definida y particular tecnología quesera para la obtención de un

determinado tipo de queso (Zamboni, 1994). Si a esto se suma el hecho que las cepas que constituyen dichos starters han sido aisladas de productos naturales de la región en la cual se van a utilizar y además que se han estudiado sus características tecnológicas y de crecimiento en las leches de dicha región, se puede anticipar el éxito de éstos fermentos en la elaboración de distintos productos fermentados.

En el CIDCA disponíamos de un cepario de dos especies termófilas, aisladas a partir de productos naturales (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), pero hasta el momento de iniciado éste trabajo de tesis, no se había estudiado como se comportaban dichas bacterias termófilas a temperatura subóptima (de elaboración de quesos de pasta blanda). Todos éstos factores nos condujeron a considerar importante realizar una selección de cepas de bacterias lácticas termófilas, para formular fermentos mixtos para la elaboración de quesos de pasta blanda.

Trabajamos tratando de simular las condiciones a las que se somete el fermento durante el proceso de elaboración de quesos. Los experimentos se realizaron a 30°C, ya que es importante estudiar las combinaciones de cepas a la temperatura del proceso tecnológico, y también a 44°C (que es la temperatura óptima para bacterias termófilas). El control a 44°C se realizó para poder comparar el funcionamiento óptimo de las bacterias con su comportamiento a bajas temperaturas. Asimismo, ésta temperatura nos permitía seleccionar combinaciones de cepas para la elaboración de productos, en los cuales durante el proceso se alcanzan altas temperaturas. Posteriormente, las muestras se almacenaron a 10°C durante 20 días, para analizar qué cambios se producían en los fermentos, durante lo que sería la maduración de un queso.

En el relevamiento de cepas realizado en medio de cultivo, se encontró que había algunas cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que a 30°C resultaron más estimulantes, tales como LBB, LBP, LBR, CP2, CP3 y CP4, las cuales a su vez también resultaron las más estimuladas (tabla 1-1).

Para comparar resultados del relevamiento de cepas en medio de cultivo se realizaron también los experimentos a 44°C, y se encontró que LBB, LBA, CP4

y CRL fueron las más estimulantes y que LBB, LBP, CP3, CP4 y CRL resultaron las cepas más estimuladas (tablas 1-2). Dado que los resultados obtenidos a las dos temperaturas son diferentes, nos llevó a la conclusión que es importante estudiar el comportamiento sinérgico de las cepas a las temperaturas utilizadas durante la fabricación del producto fermentado correspondiente.

Otra conclusión importante es que no se detectó efecto inhibitorio entre cepas en las 72 combinaciones de probadas, lo que significa que no hubo producción de halos ni zonas de lisis.

Dado que la leche es el medio de crecimiento natural para las bacterias lácticas termófilas resultaba más apropiado estudiar su comportamiento sinérgico y antagónico en leche. Se realizaron determinaciones de pH y densidad óptica, tanto a 30 como a 44°C. Se encontró que algunas de las combinaciones de cepas analizadas, presentaron efecto sinérgico, evidenciándose dicho efecto sobre los dos parámetros analizados (las combinaciones de cepas que presentaron sinergismo fueron: LBB, LBP y LBR en combinación con CP2, CP3, CP4 y CP5, tablas 1-5 y 1-6). Se encontró que algunas combinaciones de cepas presentaron efecto sinérgico a las dos temperaturas analizadas, sin embargo hubo ciertas combinaciones que presentaron efecto más acentuado a una de las temperaturas ensayadas. Por esto concluimos que para elaborar quesos de pasta blanda, la selección de cepas debe realizarse en leche y a 30°C, mientras que para la elaboración de yogur y quesos de pasta dura, debe realizarse a 44°C.

De los pares de cepas que presentaron sinergismo a 30°C, se estudió cómo podía influir la temperatura sobre ciertos parámetros tecnológicos de importancia, tales como: viscosidad, sinéresis, proteólisis, velocidad de acidificación e incremento del número de microorganismos en los cultivos mixtos (tablas 1-7-A y B, 1-8 y 1-9, Figura 1-1). El único parámetro que se vio significativamente afectado durante el comportamiento sinérgico fue la viscosidad y esto se evidenciaba siempre y cuando la cepa de estreptococo (CP2) estuviera presente en cultivos mixtos con LBB, LBP y LBR. En éstos casos los coágulos aumentaban significativamente su viscosidad, y además, mejoraban las características de sinéresis, respecto a la de los cultivos

monomicrobianos correspondientes. Dado el comportamiento sinérgico óptimo en éstos tres pares de cepas (LBB+CP2, LBP+CP2 y LBR+CP2) se eligieron para fabricar quesos de pasta blanda (en la última etapa experimental), a fin de determinar si coincidían los resultados obtenidos en el laboratorio y en la elaboración de quesos.

Por otro lado, en este estudio se vió que en todas las combinaciones de cepas en las que se detectó sinergismo en el crecimiento bacteriano y en la viscosidad aparente, el estímulo fue de los lactobacilos sobre los estreptococos (figura 1-1 y tabla 1-7-A). Ninguno de los experimentos realizados demostraron estímulo de los cocos sobre los bacilos, a pesar que los estreptococos son productores de formiato, y que dicho metabolito había sido señalado por varios autores como responsable de la estimulación de algunas cepas de lactobacilos (Galesloot y col., 1968; Driessen y col. 1982; Suzuki y col. 1986). Por resultados de Pérez y col, (1991), se sabía que los estreptococos en estudio comenzaban a producir cantidades apreciables de ácido fórmico a partir de las 16 horas de incubación a 37°C. A pesar de ello, tanto a 30 como a 44°C dicho estímulo no fue observado. Es importante comparar éstos datos con aquellos obtenidos cuando se introduce artificialmente el formiato de sodio a cultivos de lactobacilos. Cuando se agregaron de 40 a 60 ppm de formiato, se obtuvo un estímulo sobre el crecimiento, y sobre la actividad acidificante y proteolítica (tabla 2-2). La pregunta que quedaba por responder era si éste mismo estímulo del formiato sobre cultivos de lactobacilos se producía a temperatura subóptima (tablas 2-1). Para ello se realizaron ensayos en tubos y se vió que: la estimulación se producía también a 30°C sobre los tres parámetros analizados, que dicho efecto era cepa dependiente, ya que se observaba en dos de las seis cepas de lactobacilos analizadas (LBB y LBP), pero el estímulo sobre la actividad proteolítica se daba solamente al utilizar LBB. Teniendo en cuenta éstos datos y los resultados de Abraham, (1992), se puede decir que la cepa LBB posee un sistema proteolítico inducible-represible, donde se ha visto que la actividad proteolítica específica aumenta cuando la cepa se desarrolla en leche:

- a) a baja temperatura (30°C),
- b) con baja cantidad de nitrógeno TCA-soluble y

c) en presencia de 40 ppm de formiato (Moreira y col., 1997).

Por otra parte, LBB desarrollada a 30°C, en leche con formiato posee la capacidad de degradar β - lactoglobulina y α_{s1} -caseína.

Dado que el formiato agregado artificialmente a cultivos de lactobacilos producía un importante efecto estimulante sobre algunas cepas y que dicho efecto no se observaba durante el crecimiento conjunto de estreptococos y lactobacilos, se podría pensar que las altas concentraciones de formiato producidas por el coco, a las 6 y 24 horas de incubación a 44 y a 30°C (tablas 1-9-A y B), resultarían inhibitorias para el lactobacilo. Un indicio de un comportamiento inhibitorio del formiato cuando se halla presente en altas cantidades lo tuvimos al utilizar 100 ppm (figura 2-1 y 2-2). Otra hipótesis posible, sería que algunos metabolitos producidos por el coco en las condiciones experimentales utilizadas, contrarrestaran el efecto estimulante del formiato.

Como conclusión podemos decir que las cepas de estreptococos no tuvieron influencia sobre los lactobacilos en estudio, y la forma de estimular a éstos últimos es agregando formiato (40 ppm) exógenamente a los cultivos. Pero los lactobacilos sí estimularon a los estreptococos (figura 1-1). Con el objeto de probar si un factor producido por los lactobacilos estimulaba a los estreptococos, se realizaron experimentos utilizando cultivos de estreptococos con agregado de sobrenadantes de lactobacilos. Se vió que los coágulos obtenidos partiendo de la cepa CP2 tanto en el experimento con cocultivos (con LBB, LBP y LBR), como en el experimento con sobrenadantes de lactobacilos (tabla 1-12, 1-13; figura 1-6), presentaban un aumento en la viscosidad, respecto a los cultivos controles. Como consecuencia probable de ese aumento en la viscosidad, mejoraba también la sinéresis de los coágulos.

El efecto sinérgico observado sobre la viscosidad y la sinéresis, en el experimento realizado con cocultivos y con sobrenadantes de lactobacilos, no se debe a diferencias de pH, entonces para explicar éste hecho habría que tener en cuenta la posibilidad que la cepa CP2 fuera productora de polisacáridos (hecho comprobado por resultados preliminares, no detallados en éste trabajo). Lo que podría indicar que los lactobacilos a través de sus metabolitos, inducen un aumento en la producción de polisacáridos de la cepa

CP2 (hipótesis que se está investigando).

Con el objeto de corroborar si todos éstos resultados obtenidos en el laboratorio, tenían alguna incidencia en la fabricación de quesos de pasta blanda, se elaboraron quesos tipo cuartirolo, con diferentes fermentos (LBB+CP2, LBP+CP2, LBR+CP2, LBB+formiato, LBB en fermento monomicrobiano, entre otros quesos; tablas 3-1-A y B, 3-2-A y B, 3-5 y 3-6). Se compararon las características de acidificación, fundibilidad, desuerado, textura, proteólisis, contenido de humedad; además de las características organolépticas y microbiológicas de los quesos elaborados.

Se encontró que los resultados obtenidos con los distintos fermentos mixtos, en los experimentos en laboratorio y en la elaboración de quesos coincidían. Entre las cepas LBB, LBP y LBR en fermentos mixtos se había observado efecto sinérgico sobre el crecimiento y por otro lado, en los quesos elaborados con éstos pares de cepas se encontró que el agregado de la cepa CP4 mejoraba las características organolépticas de los quesos elaborados con LBB, LBP y LBR.

El efecto estimulante del formiato sobre el crecimiento y la actividad metabólica de LBB se observó también en la elaboración de quesos. La adición de 40 ppm de formiato de sodio a la leche mejora las características de sabor y textura de queso cuartirolo elaborado con LBB (tablas 3-2-A y B, 3-6 y 3-8).

Por último, el efecto sinérgico observado entre los pares de cepas LBB, LBP y LBR en combinación con CP2, se observó también durante la elaboración de quesos. El agregado de una cepa de estreptococo (CP2) mejora la textura y el sabor de los quesos elaborados con fermentos mixtos, formulados a partir de CP2 con LBB, LBP y LBR. De la misma forma, CP2 mejora las características de proteólisis en los quesos elaborados con fermentos mixtos (tablas 3-5-A y 3-6). Además, las características organolépticas de los quesos elaborados con fermentos mixtos (LBB+CP2 y LBP+CP2) resultaron similares a las obtenidas para el queso elaborado con LBB+formiato; diferenciándose del queso elaborado con LBB (fermento monomicrobiano). El formiato podría ser utilizado en reemplazo del estreptococo para la formulación de fermentos (tablas 3-6; 3-7-A, B, C, D; 3-8).

"Bibliografía"

BIBLIOGRAFIA

- ✓ **ABRAHAM A., DE ANTONI G., AÑÓN C.:** Proteolytic Activity of *L. bulgaricus* Grown in Milk- *J. Dairy Sci.*; (76) pp 1498. (1993).
- ✓ **ABRAHAM A.:** *L. bulgaricus* en fermentos para yogur, Tesis Doctoral (1992).
- ✓ **ACCOLAS J. P., AUCLAIR J.:** Estudio de interacciones entre diversas bacterias lácticas termófilas y mesófilas en relación a la fabricación de quesos- *Le Lait*, N°505 pp 253, (1971).
- ✓ **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS:** *Official Methods of Analysis*, 14th ed. (AOAC 16.023), Arlington, VA. Washington DC, USA (1984).
- ✓ **ASTON J. W. and DULLEY J. R.:** Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* (21), 2, pp 55 (1983).
- ✓ **AUCLAIR J., ACCOLAS J. P.:** Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek* (49), pp. 313 (1983).
- ✓ **AUCLAIR J.E. and PORTMANN A.:** Formic Acid as a growth stimulant for *L. lactis* in autoclaved milk- *Nature*; (179) pp 782 (1957).
- ✓ **BEAL C., CORRIEU G.:** Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398. *Biotechnology and Bioengineering*, (38), pp. 90 (1991).

- ✓ **BEAL C., CORRIEU G.:** Viability and acidification activity of Pure and Mixed Starters of *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398 at the different Steps of their Production. *Lebensm. Wiss. Technol.* (27) pp 86 (1994).
- ✓ **BEAL C., SPINLER H., CORRIEU G.:** Comparison of the growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398- *Appl. Microbiol. Biotechnol* (41) pp 95 (1994).
- ✓ **BELFIORE M. P.:** Elaboración de queso cuartirolo. I Bienal Marschall International *Cheese Conference*, Wincosin (Septiembre 1979).
- ✓ **BERTOLA N., BEVILACQUA A. and ZARITZKY N. E.:** Proteolytic and rheological evaluation of maturation of tybo Argentino Cheese. *J. Dairy Sci.* (75), pp 3273 (1992).
- ✓ **BERTOLA N.:** Vinculación entre modificaciones texturales y microestructura durante la maduración de quesos en películas plásticas, Tesis Doctoral (1992).
- ✓ **BEVILACQUA A. and CALIFANO A.:** Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* (54), pp 1076 (1989).
- ✓ **BEVILACQUA A.:** Propiedades fisico-químicas y comportamiento reológico en la maduración de quesos, Tesis Doctoral (1997)
- ✓ **BOUZAS J., KANTT C. A., BODYFELT F. AND TORRES A.:** Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by High- Performance Liquid Chromatography. *J. of Food Sci.* (56), N°1 (1991)

- ✓ **BOVILLANE C. , DESMAZEAUD M. J.:** Etude de quelques caracteres de souches de *S. thermophilus* utilisees en fabrication de yoghourt et proposition d'une methode de classement- *Le Lait* (60) pp 459 (1980).
- ✓ **CARMINATTI D., GIRAFFA C., GATTI M.,NEVIANI E.:** Characterization of *S. thermophilus* to be used in Dairy Technology- pp 116, *Instituto Sperimentale Lattiero Caseario*- Lodi; Roma, Italia (1994).
- ✓ **CHAMPAGNE C. P., BROUILLETTE M. and GIRARD F.:** Efecto de la edad de cultivos de *L. bulgaricus* sobre el desarrollo de *S. thermophilus*- *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* (23) N°4, pp 203 (1990).
- ✓ **CHANDAN, ARGYLE AND MATHISON:** Action of *L. bulgaricus* proteinase preparation on milk proteins. *J. Dairy Sci.* (65) pp. 1408 (1982).
- ✓ **CHEFTEL J. C.:** Proteínas de leche. En: Proteínas Alimentarias (Bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones químicas). Ed. Acribia S. A., (50080) Zaragoza, España; apartado 466 (1989).
- ✓ **CERNING J.:** Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* 75, pp. 463 (1995).
- ✓ **CITTI J., SANDINE W. and ELLIKER P.:** Some observations on the Hull method for measurement of proteolysis in milk- *J. Dairy Sci.* (46) pp. 337 (1963).
- ✓ **CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO ACTUALIZADO:** de la Canal y asociados S. R. L. Actualizado, Buenos Aires, Argentina (1993).
- ✓ **CREAMER L. K. y OLSON N. F.:** Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese- *Journal of Food Science* 47 (2) pp 631 (1982).

- ✓ **CREAMER L. K.:** β casein degradation in Gouda and Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 58 (3) pp 287 (1975)
- ✓ **DAVIS J. G.:** *Cheese*. London, J. and Churchill. (1) pp. 463 (1965).
- ✓ **DE JONG L.:** Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency.(I) *Neth Milk Dairy J.* (30), pp 242 (1976).
- ✓ **DE JONG L.:** Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency.(II) *Neth Milk Dairy J.* (32), pp 15 (1978).
- ✓ **DE JONG L.:** The influence of the moisture content on the consistency an protein breakdown of cheese- *Netherland Milk Dairy Journal* (32): 1 (1978).
- ✓ **DE URRAZA P.:** Obtención de bacterias lácticas para cultivos starters, Tesis Doctoral (1997).
- ✓ **DILANJAN S. Ch.:** Fundamentos de la elaboración de quesos, Ed. Acribia S. A., (50080) Zaragoza, España; apartado 466 (1984).
- ✓ **DRIESSEN F.M., KINGMA F. and STADHOUDERS J.:** Evidence that *L. bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *S. thermophilus*- *Neth Milk Dairy J.* (36) pp 135 (1982).
- ✓ **ELABORACION DE LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS:** Lechería.- Dirección Nacional de Alimentación- Subsecretaría de Alimentación y Mercados. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación* (1997)

- ✓ **FOX P. F.:** Cheese: an overview. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1, General Aspects. (Editor P. F. Fox). Elsevier Applied Sci. New York, USA (1987).
- ✓ **FOX P. F.:** Proteolysis during cheese manufacture and ripening- *J. Dairy Sci.* (72) pp 1379 (1989).
- ✓ **GALESLOOT T.H., HASSING F. and VERINGA A.:** Symbiosis in yogurt (I)- Stimulation of *L. bulgaricus* by a factor produced by *S. thermophilus*. *Neth Milk Dairy J.* (22) pp 51 (1968).
- ✓ **GIRAFFA C.:** Fermenti lattici- Starter per formaggi freschi e molli: I Batteri Lattici Termofili- *il Latte* pp. 436 (abril de 1993).
- ✓ **GRAPPIN R., RANK T. C. y OLSON N. F.:** Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. *J. of Dairy Sci.*, (68), número 3 (1985).
- ✓ **HEMME D. H., SCHMAL V., AUCLAIR J. E.:** Effect of the addition of extracts of thermophilic lactobacilli on acid production by *S. thermophilus* in milk. *J. of Dairy Research* (48) pp 139 (1981).
- ✓ **HIGASHINO K., YOSHIOKA Y., KIKUCHI T.:** Isolation and Identification of growth factor of *L. bulgaricus* produced by *S. thermophilus*- *J. of the Agricultural Chemical Society of Japan*-(51) 4-pp 209 (1977).
- ✓ **HULL M.:** Studies on milk proteins- Colorimetric Determination of the partial hidrolisis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci* (46) pp 881 (1947).
- ✓ **JACQUET J. and LENOIR M :** Mécanisme intime de l'affinage des fromages. *Econ. Méd.Anim.* 10 (1) pp 38 (1969)

- ✓ **JUAREZ M., ALONSO L. y RAMOS M.:** Lipólisis y proteólisis del queso de Cabrales durante la maduración. *Revista Agroq. Technol. Alim.*, (23) pp. 4 (1983).
- ✓ **KANASAKI M., BREHENY S., HILLIER A., JAGO G.:** Effects of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. A rapid method for the estimation of bacterial populations in milk. *Aust. J. Dairy Technol.* (30) pp 142 (1975).
- ✓ **KHALID N. and MARTH G.:** Lactobacilli: their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese- *J. Dairy Sci.* (73), N°10 (1990).
- ✓ **KINDSTEDT P. S.:** Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, (33) 2 pp 167 (1993).
- ✓ **KOCIUBINSKI G., PEREZ P. AÑON C. and DE ANTONI G.:** A Method of screening for highly inhibitory lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 59 N°7: pp. 739 (1996).
- ✓ **KOSIKOWSKI F. V.:** *Cheese and Fermented Milk Foods*, 2nd edn. Edwards Brothers Inc., Arbor, Michigan, USA (1982).
- ✓ **KUCHROO C. N.:** Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures- *Milchwissenschaft* (37) pp. 6 (1982).
- ✓ **LAEMMLI U. K.:** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: pp. 680 (1970)
- ✓ **LAULUND E.:** Cultures for dairy products. Hansen's Laboratorium Danmark: Starter. *IFI* N°4 pp. 37, (1993).

✓ **LAW B. A. and WIGMORE A.:** Accelerated cheese ripening with food grade proteinases. *J. of Dairy Research*, (49), pp 137 (1982).

✓ **LAW B. A.:** Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol.1. General Aspects. (editores P. F. Fox), Elsevier Applied Sci., New York, USA (1987)

✓ **LAW B. A.:** The formation of aroma and flavour compounds in fermented dairy products. *Dairy Sci. and Technology* 43 (3) pp 143 (1981).

✓ **LAWRENCE R. C., CREAMER L. K. and GILLES J.:** Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, (70), pp 1748 (1987).

✓ **LAWRENCE R. C., HEAP H. A. and GILLES J.:** A controlled approach to cheese technology. *J. Dairy Sci.* (67), pp 1632 (1984).

✓ **LEDFORD R. A., O' SULLIVAN A. C. and NATH K. R.:** Residual casein fraction in ripened cheese determined by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *National Dairy Research Centre*, pp. 1098 (1966).

✓ **LEE S., VEDAMUTHU E., WASHAM C. and REINHOLD G.:** An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. *J. Milk Food Technology* (37) pp 272 (1974).

✓ **MARCOS A., FERNANDEZ- SALGUERO J. y ESTEBAN M. A.:** Hidrólisis relativa de las caseínas del queso Manchego maduro y primeros productos de su degradación proteolítica. *Archivos de Zootecnia*, (27). núm. 108, pp. 341 (1978).

✓ **MARSHALL B. and LAW B. A.:** *Advances in Microbiology, Biochemistry of Cheese fermented-* Capítulo III; editado por Davies y Law, Londres (1984).

- ✓ **MARSILI, R.T., OSTAPENKO, H., SIMONS, R. and GREEN, D.E.:** High Performance Liquid Chromatographic determination of organic acids in dairy products. *Journal of Food Science* (46) pp. 52 (1981)
- ✓ **MARTI de CASTRO M. A., MARTIN-HERNANDEZ M. C.:** Determination of aminopeptidase activity in cheese, *Z. Lebensm Unters Fosch* (198) pp 20, (1994).
- ✓ **MATALON M. E. and SANDINE W. E.:** Improved media for differentiation of rods and cocci in yogurt. *J. Dairy Sci.* (69), pp. 2569 (1986).
- ✓ **MEINARDI C. A.:** La leche como materia prima en la elaboración de quesos. En: *Ciencia y Tecnología de los productos lácteos*. Diagrama S. A. Santa Fe, Argentina (1994).
- ✓ **MITCHELL L.R. and SANDINE W.E.:** Associative Growth and Differential Enumeration of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*: A Review- *J. of Food Protection-* (47) N°3, pp 245 (1984).
- ✓ **NAVARRO A.:** Efecto de las bajas temperaturas y de la adición de lípidos sobre la estabilidad de pastas de almidón, Tesis Doctoral (1996)
- ✓ **PEREZ P., DE ANTONI G., AÑÓN C.:** Formate Production by *S. thermophilus* Cultures- *J. of Dairy Sci.* (74)-N°9 (1991).
- ✓ **PEREZ P.:** *S. thermophilus*: metabolismo y conservación, Tesis Doctoral (1991).
- ✓ **RADKE-MITCHELL L. C. and SANDINE W. E.:** Influence of temperature on associative growth of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*- *J. Dairy Sci.* (69) pp 2558 (1986).

- ✓ **RAJAGOPAL S.N. and SANDINE W.E.:** Associative growth and proteolysis of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in skim milk- *J. Dairy Sci.* (73) N°4 pp 894 (1990).
- ✓ **RANK T. C., GRAPPIN R. and OLSON N. F.:** Secondary proteolysis of cheese during ripening: A Review, *J. Dairy Sci.* (68), pp 801, (1985).
- ✓ **REINHEIMER J. A.:** Las bacterias lácticas. En: *Ciencia y Tecnología de los productos lácteos*. Diagrama S. A. Santa Fe, Argentina (1994).
- ✓ **SALVADORI B.:** Nuevos tipos de fermentos y su empleo en la preparación de productos lactocasearios- *Simposio Internacional de Industrialización de la leche*; Santa Fe, Argentina- (agosto de 1994).
- ✓ **SCARDOVI V.:** Genus Bifidobacterium. En "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" vol.2 (Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G., eds.), Williams and Wilkins Co., (Baltimore), pp. 1418 (1986).
- ✓ **SCOTT R.:** *Cheesmaking Practice*- Elsevier Applied Science Publishers New York, USA (1985).
- ✓ **SUZUKI I., KATO S., KITADA T., YANO N., MORICHI T.:** Growth of *L. bulgaricus* in Milk- 2) Characteristics of Purine Nucleotides, Pyrimidine Nucleotides and Nucleic Acid Synthesis- *J. Dairy Sci.* (69) pp 971 (1986).
- ✓ **SUZUKI I., KATO S., KITADA T., YANO N., MORICHI T.:** Growth of *L. bulgaricus* in Milk- 1)Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk- *J. Dairy Sci.* (69) pp 311 (1985).
- ✓ **TAMINE A. Y. and DEETH P.:** Yogurt: technology and Biochemistry. *J. Food Prot.* (43) pp 939 (1980).

- ✓ **TAMINE A.Y. and ROBINSON R.K.:** *Yoghurt Science and Technology*, Pergamonn Press Oxford (Engl.) pp 276 (1985).
- ✓ **VAKALERIS D. G and PRICE W. V.:** A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *J. Dairy Sci.*: **(42)** pp. 264 (1959).
- ✓ **VEISSEYRE R.:** *Lactología Técnica*, Ed. Acribia S. A., (50080) Zaragoza, España; apartado 466 (1980).
- ✓ **VERINGA H., GALESLOOT Th. and DAVELAAR H.:** Symbiosis in yogurt (II)- Isolation and Identification of a growth factor for *L. bulgaricus* produced by *S. thermophilus*- *Neth Milk Dairy J.* **(22)**, pp 115 (1968).
- ✓ **VINFELDT K. HANSEN'S LABORATORIUM DANMARK:** DVS cultures for cheese- *Scandinavian Dairy Information* N°1 (1994).
- ✓ **VISSER R.:** Proteolytic Enzymes and their relation to Cheese ripening and flavor: An Overview- *J. Dairy Sci.* **(76)**, pp 329, (1993).
- ✓ **WOHLRAB Y. and BOCKELMANN W.:** Purification and characterization of a new aminopeptidase from *L. bulgaricus* B14. *Int. Dairy Journal* **(3)**: pp. 685 (1994).
- ✓ **ZALAZAR C. A.:** Bioquímica de la Maduración de quesos. En: *Ciencia y Tecnología de los productos lácteos*. Diagrama S. A. Santa Fe, Argentina (1994).
- ✓ **ZALAZAR C. A.:** Coagulación de la leche y enzimas coagulantes. En: *Ciencia y Tecnología de los productos lácteos*. Diagrama S. A. Santa Fe, Argentina (1994).

✓ **ZALAZAR C., MEINARDI C., BERNAL S. y CANDIOTI M.:** Características de los quesos Argentinos tipo Pategrás. Departamento de Tecnología Industrial Fac. de Ing. Qca., Univ. Nacional del Litoral (1980)

✓ **ZAMBONI E. F.:** Fermentos lácticos seleccionados: su empleo en la producción. En: *Ciencia y Tecnología de los productos lácteos*. Diagrama S. A. Santa Fe, Argentina (1994).

