

### **3 PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS**

**3.1 EVALUACIÓN DE UN MÉTODO PARA ACELERAR LA MADURACIÓN DE QUESO DE CABRA MEDIANTE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA (1999) J. Saldo, E. Sendra, B. Guamis. *Alimentaria* 99 (308) 75-78**

# EVALUACION DE UN METODO PARA ACCELERAR LA MADURACION DE QUESOS DE CABRA MEDIANTE ALTA PRESION HIDROSTATICAS

J. Saldo\*, E. Sendra\*\* y B. Guamis\*

## RESUMEN

Se ha ensayado la efectividad de un método para acelerar la maduración de quesos mediante el uso de alta presión hidrostática. Como indicador de maduración se han estudiado las variaciones de los productos de proteolisis. También se comparó la efectividad del tratamiento en quesos con distintos períodos de pre-maduración. Los tratamientos ensayados muestran un incremento en la proteolisis de quesos tratados.

## SUMMARY

A method to accelerate cheese ripening by means of high hydrostatic pressure has been tested. Proteolysis products have been used as ripening indexes. Efficiency of treatment in cheese from different pre-aging periods have been compared. Tested treatments showed increased proteolysis in presurised cheese.

## INTRODUCCION

El queso es un alimento que en su origen se desarrolló para conservar los principales nutrientes de la leche (proteínas y lípidos). En él se consigue evitar el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes mediante una combinación de acidificación, deshidratación, bajo potencial redox y salado. Pero en la mayoría de las variedades, la actividad de agua que se mantiene durante su evolución permite una serie de cambios microbiológicos y enzimáticos que constituyen la maduración. Las características de cada tipo de queso se deben al proceso y al tipo de leche utilizada en su elaboración (vaca, oveja o cabra) y se desarrollan durante la maduración a través de cambios bioquímicos que se encuentran determinados por la composición de la cuajada, microbiota existente y actividad residual de enzimas nativas de la leche y del cuajo. Estos cambios bioquímicos incluyen glicólisis, lipólisis y proteolisis.

Todos estos cambios deben realizarse de forma acompañada para obtener un queso de la calidad requerida. La maduración acelerada, a pesar de ser un objetivo muy deseado por la industria quesera, todavía no ha conseguido unos resultados satisfactorios para los quesos de mesa. Unas veces por una pérdida en la armonía de estos procesos y otras por el elevado coste de los procesos descritos.

Los métodos para acelerar la maduración de los quesos han sido revisados de forma extensiva por Law (1984) y Fox et al. (1996). La elevación de la temperatura de maduración, la inclusión de enzimas exógenas, el uso de fermentos con modificaciones químicas, físicas o genéticas y el uso de cultivos añadidos o de homogeneizados de queso han sido tradicionalmente los métodos estudiados. La mayor parte del trabajo se ha realizado sobre quesos tipo Cheddar. Sobre queso semiduro de leche de oveja podemos destacar los trabajos de Gaya et al. (1990) aumentando la temperatura de maduración, o los de Fernández-García et al. (1993, 1994) y Picón et al. (1995) en que añadian proteasas fúngicas y bacterianas respectivamente. Podemos generalizar diciendo que la elevación de las temperaturas es únicamente aplicable a producciones a partir de leche de alta calidad micro-

biológica bajo pena de aparición de sabores extraños. Otros procedimientos pueden ser muy costosos o presentar problemas tecnológicos o legales.

Desde hace pocos años existe una patente (Yokohama et al., 1992) sobre un sistema para acelerar la maduración del queso mediante el uso de alta presión hidrostática en conjunción con adición de un elevado número de lactobacilos y proteasas exógenas.

En estudios previos, el enfoque de los tratamientos de alta presión a quesos y productos lácteos iba destinado preferentemente a la destrucción de microorganismos patógenos y alterantes y a la inactivación de enzimas (Capellas et al., 1996) (Trujillo et al., 1997), con un estudio pionero de Hite (1899). Las presiones habituales para estas aplicaciones se encuentran entre 100-700 MPa (1 MPa ≈ 10 atm). La principal ventaja de esta técnica es la inmediata transmisión de la presión aplicada a toda la masa del alimento y la homogeneidad del tratamiento en toda la pieza procesada, independientemente de su forma o tamaño. Las aplicaciones de los tratamientos de alta presión están teniendo mayor éxito en la conservación de productos frescos, preferentemente vegetales, ya que al no necesitar aumentar la temperatura mantienen características muy cercanas a las del producto no tratado.

\* Unitat de Tecnología d'Aliments, Centre de Referència en Tecnología d'Aliment (CeRATA), Facultat de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.

\*\* División de Tecnología de Alimentos, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, 03312 Orihuela, España.

Los resultados de Yokohama contrastan con los obtenidos por otros investigadores (Rapo et al., 1990; Messens et al., 1998a). El presente estudio pretende evaluar sobre queso de leche de cabra las condiciones de alta presión propuestas por Yokohama y en qué forma se modifica la maduración del queso previamente sometido a alta presión hidrostática.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Elaboración del queso

El queso se elaboró con leche de cabra pasteurizada a 72 °C durante 15 segundos. Posteriormente se añadió un 2% de un fermento homófermentativo (*Lactococcus lactis* esp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* esp. *lactis*, *Lactococcus lactis* esp. *hansenii* *diacetylactis*), cuajo bovino (0,007 ml/l), contenido 780 mg de quinomicina por litro) y cloruro cítrico (0,006 g/l). La coagulación tuvo lugar a 30 °C a 1 °C en aproximadamente 45 minutos, y la coagulada se cortó suavemente en cubos de 8-10 mm, dejándose reposar durante 5 minutos antes de ser agitada y colmatada. Cuando alcanzó los 34 °C se dejó reposar durante 15 minutos para permitir la síntesis de los gramos de coagulada y se procedió al desmoldado.

La coagulada desmoldada se moldeó en forma de cilindros bajos. Los moldes tenían base 3 cm de profundidad y 8 cm de diámetro, siendo quesos de unos 250 g. La coagulada escurrida se presió en una prensa neumática a 0,27 MPa durante 30 minutos y a continuación a 0,35 MPa durante 4 horas. Los quesos se salaron por inmersión en salmuera (20 g/l NaCl, 2 g/l CaCl<sub>2</sub>, pH 5,2) durante 45 minutos.

Las condiciones de maduración se mantuvieron a 14 ± 1 °C y 82 ± 2% humedad relativa.

### Grupos experimentales

#### Experiencia I

Después del salado en salmuera, y tras un día de orzo, se establecieron 4 grupos:

Initial: Quesos para ser analizados tras 1 día de maduración.

Control: Quesos de 4 días de maduración convencional.

T: Quesos para el grupo de control de temperatura. Tras un día de orzo fueron envasados y mantenedos a 0,1 MPa y 25 °C durante 72 horas.

HP: Quesos tratados a alta presión. Envasados tras un día de orzo y tratados a 50 MPa y 25 °C durante 72 horas.

(BSI, 1995), ceniza (ADAC, 1990), pH (Marth, 1970), contenido en nitrógeno total (DIF, 1982), proteínas nitrógeno soluble a pH 4,6 y nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 12% (McSweeney y Fox, 1997), recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (ICMSF, 1983).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Experiencia II

Para poder evaluar si existe una influencia del tiempo de maduración transcurrido antes del tratamiento se planificó una segunda experiencia en la cual únicamente se evaluaron pH y fracciones nitrógenadas. A partir de quesos con 4 días de maduración convencional se establecieron los siguientes grupos:

Initial: Quesos para ser analizados tras 4 día de maduración.

Control: Quesos de 7 días de maduración convencional.

T: Quesos para el grupo de control de temperatura. Tras 4 días de maduración fueron envasados y mantenedos a 0,1 MPa y 25 °C durante 72 horas.

HP: Quesos tratados a alta presión. Envasados tras 4 días de maduración y tratados a 50 MPa y 25 °C durante 72 horas.

La composición promedio de los quesos fue: ceniza 4,87 ± 0,11%, grasa 36,5 ± 2,9% y nitrógeno total 5,13 ± 0,18% sobre extracto seco. No se observaron diferencias en ceniza, contenido en grasa y nitrógeno total sobre extracto seco entre los diferentes grupos. Estos datos son similares a los descritos por Carballe et al. (1994) para el queso de Valdepeña.

En la primera experiencia los quesos HP y T presentaron mayor humedad que Control a causa del envasado en que se mantuvieron durante la experiencia (tabla 1). La exposición a alta presión modificó al queso HP una estructura mucho más compacta, que hacia evidente la diferencia.

Los valores de pH se mantuvieron en un estrecho margen, dentro del cual los valores en los quesos tratados por alta presión tendieron a ser menores, tal vez a causa de un rincón de utilización de la lactosa mayor bajo las condiciones del tratamiento (tabla 1). Messens et al. (1998b) a presiones de 100 MPa y menores no observaron cambios en el pH, respecto a los controles. En cambio, por encima de 100 MPa observaron un aumento del pH del queso.

Los valores de las fracciones nitrógenadas se presentan en la figura 1. Se observa un ligero aumento de la proteína soluble tanto a la temperatura de incubación como al efecto de la presurización, pero el efecto del tratamiento de alta presión en combinación con la temperatura fue mayor que

TABLA 1  
Extracto seco y valores de pH. Experiencia I

	Initial	Control	T	HP
Extracto seco	47,99 ± 0,32	49,06 ± 0,67	48,70 ± 1,18	48,09 ± 0,36
pH	5,11	5,13	5,07	4,98

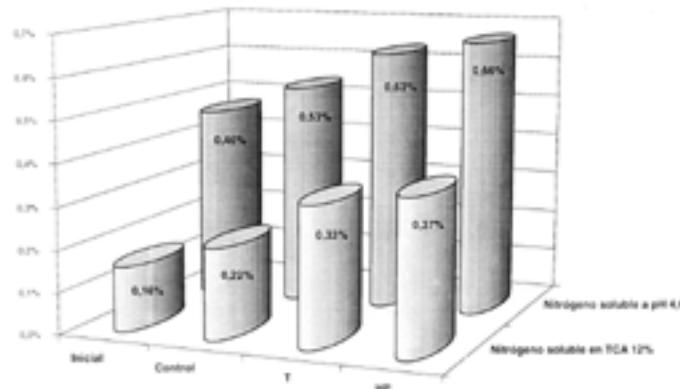


Fig. 1. Variación de las fracciones nitrogenadas en función de los tratamientos ensayados. Todos los valores están expresados sobre extracto seco. Los códigos corresponden a los grupos experimentales de la experiencia I.

el causado por la temperatura. Este efecto podría explicarse a que, según Smid et al. (1991), a 25 °C se aprecia un aumento del metabolismo de los lactococos utilizados como fermento iniciador en el queso. Como consecuencia de la actividad bacteriana se hidrolizan las caseínas mediante las proteasas ligadas a la pared, y se incorporan oligopeptídos al citoplasma, donde actúan diversas aminopeptidá-sas.

El tratamiento de alta presión favorece las reacciones que van acompañadas de una reducción de volumen, de acuerdo con el principio de Le Chatelier. La hidrólisis de las caseínas favorece una hidratación de los productos de la reacción, acompañado de un  $\Delta V$  negativo y por tanto favorecido mientras se mantienen las condiciones de alta presión.

Inmediatamente después del tratamiento los recuentos de microorganismos viables disminuyeron notablemente, y, por tanto, se decidió evaluar las poblaciones microbianas en ambas muestras (Control y HP) 6 días más tarde (tabla 2). La inactivación microbiana en queso sometido a alta presión ha sido evidenciada por Capellas et al. (1996). Se observó una recuperación parcial de la población bacteriana en unos pocos días. Después de la exposición a alta presión las bacterias lácticas supervivientes pueden proliferar para alcanzar densidades de población de hasta 10 log/ufc. La velocidad de mul-

tiplicación se ve ralentizada por la menor actividad de agua y el bajo pH que ha alcanzado el queso. Pero estas condiciones favorecen a las bacterias lácticas no-starter (NSLAB), principalmente lactobacilos, pediococos y micrococos, que encuentran en el queso los nutrientes necesarios y un ambiente no excesivamente hostil. La importancia de NSLAB en el desarrollo de aromas en queso ha sido descrito por diversos autores (McSweeney et al. 1993 y Vassal, 1996), aunque su papel exacto en la maduración del queso y el desarrollo de aromas es todavía objeto de discusión.

Los resultados de las fracciones nitrogenadas en la segunda experiencia se presentan en la figura 2. En los quesos que habían tenido un período de 4 días de premaduración, la incubación a 25 °C no causó por sí misma aumento en los índices de proteolisis, solo la presurización indujo un aumento de proteolisis. En cambio en los quesos tratados tras un solo día de premaduración el efecto de la temperatura de tratamiento fue muy semejante al obtenido en conjunción con alta presión. Parece que este aumento en el tiempo de premaduración haya convertido al queso en más sensible a la aceleración de la maduración mediante la aplicación de alta presión.

El pH no sufrió cambios con las condiciones estudiadas y se mantuvo

TABLA 2

Variación de los recuentos microbianos a causa del tratamiento de alta presión. Recuperación de la microbiota después de 10 días de maduración del queso. Experiencia I

	Control	HP
Día 3	9.0 log/ufc	7.6 log/ufc
Día 10	10.0 log/ufc	9.3 log/ufc

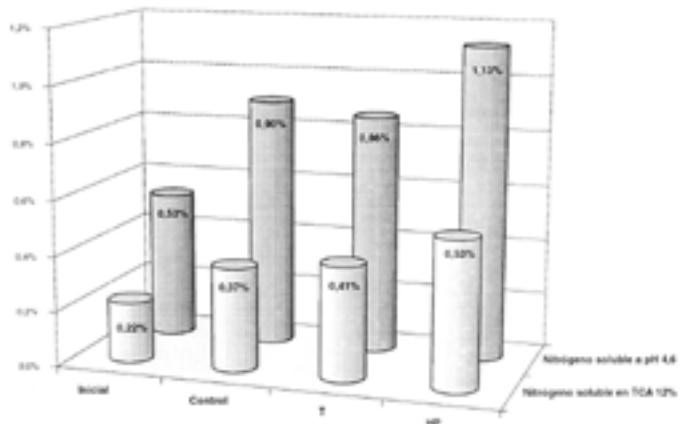


Fig. 2. Variación de las fracciones nitrogenadas de quesos en función de los tratamientos ensayados. Todos los valores están expresados sobre extracto seco. Los códigos corresponden a los grupos experimentales de la experiencia II.

en el intervalo de 5,16-5,20 para todos los grupos.

## CONCLUSIONES

Los grupos tratados a alta presión presentan un ligero incremento en el nitrógeno soluble a pH 4,6 y un mayor aumento en nitrógeno soluble en TCA que los otros grupos. Los quesos control del efecto temperatura mostraron valores de proteolisis ligeramente mayores a los del control, pero el efecto de la presión fue más marcado que el propio de la temperatura.

Los recuentos microbianos se redujeron en 1,5 unidades logarítmicas después del tratamiento. La liberación de enzimas microbianas, junto con un presumible aumento de la interacción substrato-enzima a causa de la aplicación de la presión, podrían explicar el incremento en la proteolisis en los quesos presurizados. Este aumento fue mucho mayor que el observado en el grupo control de temperatura, causado únicamente por unas condiciones más favorables para el crecimiento microbiano. La premaduración de 4 días aumenta la eficacia del tratamiento de alta presión para aumentar la proteolisis.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado con el apoyo del Comisionado Europeo, proyecto FAIR-CT96-1113. J. Saldo recibió una beca del Comisional per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya.

Parte de este trabajo fue presentado como póster en el congreso EHPRG'98 celebrado en Heidelberg (D) del 31 de agosto al 3 de septiembre de 1998.

## BIBLIOGRAFIA

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC) (1990): *Official Methods of Analysis*, 15th ed., AOAC, Washington, DC, USA.
- British Standard Institution (BSI) (1955): «Gherber method for the determination of fat in milk and milk products». British Standard, 696, BSI, London, UK.
- Capellas, M.; Mor-Mar, M.; Sendra, E.; Pla, R., y Guanis, B. (1996): «Populations of aerobic mesophiles and inoculated *Escherichia coli* during storage of fresh goat's milk cheese treated with high pressures». *J. Food Protect.*, 59, 582-587.
- Carballo, J.; Fresno, J. M.; Tuero, J. R.; Prieto, J. G.; Bernardo, A., y Martínez-Sarmiento, R. (1994): «Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish hard goat cheeses». *Food Chem.*, 49, 77-82.
- Fernández-García, E.; Olano, A.; Cabeza, D.; Martín-Alvarez, P. J., y Ramos, M. (1993): «Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*». *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 519-524.
- Fernández-García, E.; López-Fandilo, R.; Alonso, L., y Ramos, M. (1994): «The use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of Manchego type cheese from ovine and bovine milks». *J. Dairy Sci.*, 77, 2139-2149.
- Fox, P. F.; Wallace, J. M.; Morgan, S.; Lynch, C. M.; Niland, E. J., y Tobin, J. (1996): «Acceleration of cheese ripening». *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 271-224.
- Gaya, P.; Medina, M.; Rodríguez-Martín, M. A., y Núñez, M. (1990): «Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures». *J. Dairy Sci.*, 73, 26-32.
- Hite, B. H. (1899): «The effect of pressure in the preservation of milks». *Bull. West Virginia Univ. Agric. Expt. Sta.*, 58, 15-35.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1983): *Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico*, vol. I, Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- International Dairy Federation (IDF) (1982): «Fromages et fromages fondues. Détermination de l'extrait sec total». *IDF norme 4A*. Int. Dairy Fed., Bruselas, Bélgica.
- International Dairy Federation (IDF) (1993): «Milk-Nitrogen in milks». *IDF Standard No. 220B*. Int. Dairy Fed., Bruselas, Bélgica.
- Law, B. A. (1984): «The accelerated ripening of cheeses», en *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, editado por F. L. Davies y B. A. Law, Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, págs. 209-228.
- Math, E. H. (1978): *Standard methods for the examination of dairy products*, 14th ed., American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Messens, W.; Arevalo, J.; Dewettinck, K., y Huyghebaert, A. (1998a): *Proteolysis and rheological properties of high pressure treated Gouda cheese*, presentado en International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Heidelberg (D), 31 agosto-3 septiembre.
- Messens, W.; Dewettinck, K.; Van Camp, J., y Huyghebaert, A. (1998b): «High pressure brining of Gouda cheese and its effect on the cheese serum». *Lebensm. U-Technol.*, 31, 552-558.
- McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Lucy, J. A.; Jordan, K. N., y Cogan, T. M. (1993): «Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheeses». *Int. Dairy Journal*, 3, 613-634.
- McSweeney, P. L. H., y Fox, P. F. (1997): «Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening». *Lait*, 77, 41-76.
- Picos, A.; Gaya, P.; Medina, M., y Núñez, M. (1995): «The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening». *Journal of Dairy Science*, 78, 1238-1247.
- Reps, A.; Kollakowski, P., y Dajnowiec, F. (1998): «The effect of high pressure on microorganisms and enzymes of ripening cheeses», en *High Pressure Food Science, Biotechnology and Chemistry*, Neil S. Isaacs (ed.), págs. 265-270. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Snid, J. E.; Poolman, B., y Konings, W. N. (1991): «Casein utilization by lacticocci». *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2447-2452.
- Trujillo, A. J.; Ferragut, V.; Gervilla, R.; Capellas, M., y Guanis, B. (1997): «High hydrostatic pressure effects on milk and milk products». *Recent Res. Dev. in Agricultural & Food Chem.*, 1, 137-159.
- Vassal, L. (1996): «La influencia de factores tecnológicos y zootécnicos en la maduración de quesos. I. Factores ligados a la microflora». *Revista Argentina de Lactología*, 13 (VIII), 51-74.
- Yokoyama, H.; Sawamura, N., y Motoyoshi, N. (1992): «Method for accelerating cheese ripening». *European-Patent-Application EP 0 469 851 A1*.