

### **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 ACELERAR LA MADURACION DE QUESOS DE CABRA MEDIANTE ALTA PRESION HIDROSTATICA

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 proteólisis. También se comparó la efectividad del tratamiento en quesos con distintos períodos de pre-maduración. Los tratamientos ensayados muestran un incremento en la proteólisis 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 pressurised 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 nativos de la leche y del cuajo. Estos cambios bioquímicos incluyen glicólisis, lipólisis y proteólisis.

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 exógenos, 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 añadían 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 (Cappellas 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 Tecnologia d'Aliments, Centre de Recerca en Tecnologia d'Aliments (CeRTA), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.

\*\* Divisió de Tecnologia de Aliments, Escola Politècnica Superior de Oribucla, Universitat Miguel Hernández, 03312 Oribucla, España.

Los resultados de Yokohama contrastan con los obtenidos por otros investigadores (Raps et al., 1998) (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 hidroestática.

## MATERIAL Y METODOS

### 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 homofermentativo (*Lactococcus lactis* *spp. cremoris*, *Lactococcus lactis* *spp. lactis*, *Lactococcus lactis* *spp. biovar diacetylactis*), suero bovino (500 ml/l, conteniendo 780 mg de quimosina por litro) y cloruro cálcico (0.025 g/l). La coagulación tuvo lugar a 30 °C  $\pm$  1 °C en aproximadamente 45 minutos, y la cuajada se cortó suavemente en cubos de 8-10 mm, dejándose reposar durante 5 minutos antes de ser agitada y calentada. Cuando alcanzó los 34 °C se dejó reposar durante 15 minutos para permitir la sinéresis de los granos de cuajada y se procedió al desecado.

La cuajada desecada se moldeó en forma de cilindros bajos. Los moldes usados tienen 5 cm de profundidad y 9 cm de diámetro, moldeando queso de unos 250 g. La cuajada escurrida se presó 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  $\pm$  1 °C y 82  $\pm$  2% humedad relativa.

### Grupos experimentales

#### Experiencia I

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

**Control.** 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 reposo fueron envasados y mantenidos a 0,1 MPa y 25 °C durante 72 horas.

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

#### 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 nitrogenadas. A partir de quesos con 4 días de premaduración convencional se establecieron los siguientes grupos:

**Control.** Quesos para ser analizados tras 4 días 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 mantenidos 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.

### Envasado de los quesos

Los quesos destinados al tratamiento de preservación y al control de temperatura se envasaron al vacío en una prensa flexible BB+L de Cryovac<sup>®</sup> de baja permeabilidad al oxígeno y al agua.

### Parámetros evaluados

En el presente estudio se estudiaron: extracto seco (IDF, 1982), grasa

(BGL, 1955), cenizas (AOAC, 1990), pH (Marth, 1978), contenido en nitrógeno total (IDF, 1964), protocolo nitrógeno soluble a pH 4,6 y nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 12% (McSwiney y Fox, 1997), recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (CMSF, 1993).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición promedio de los quesos fue: cenizas 4,87  $\pm$  0,11%, grasa 56,5  $\pm$  2,9% y nitrógeno total 5,13  $\pm$  0,18% sobre extracto seco. No se observaron diferencias en cenizas, contenido en grasa y nitrógeno total sobre extracto seco entre los diferentes grupos. Estos datos son similares a los descritos por Carballo et al. (1994) para el queso de Valdeleja.

En la primera experiencia los quesos HP y T conservaron mayor humedad que Control a causa del ensayo en que se mantuvieron durante la experiencia (tabla 1). La exposición a alta presión confirió al queso HP una estructura mucho más compacta, que hacía 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 ritmo 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 nitrogenadas se presentan en la figura 1. Se observa un ligero aumento de la proteína debido tanto a la temperatura de incubación como al efecto de la preservación, 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

	Control	T	HP
Extracto seco	47,99 $\pm$ 0,32	49,06 $\pm$ 0,67	48,70 $\pm$ 1,18
pH	5,11	5,13	5,07

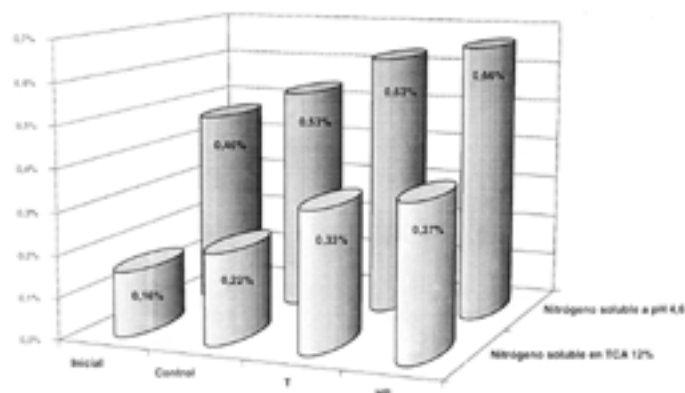


Fig. 1. Variación de las fracciones nitrogenadas en función de los tratamientos ensayados. Todos los valores están expresados sobre extracto seco. Los códigos corresponden a los grupos experimentales de la experiencia I.

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 oligopéptidos al citoplasma, donde actúan diversas aminopeptidasas.

El tratamiento de alta presión favorece las reacciones que van acompañadas de una reducción de volumen, de acuerdo con el principio de Le Châtelier. 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 supervivientes pueden proliferar para alcanzar densidades de población de hasta 10 log/ufc. La velocidad de mul-

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

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 micrococcos, 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 proteólisis, solo la presurización; indujo un aumento de proteólisis. 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

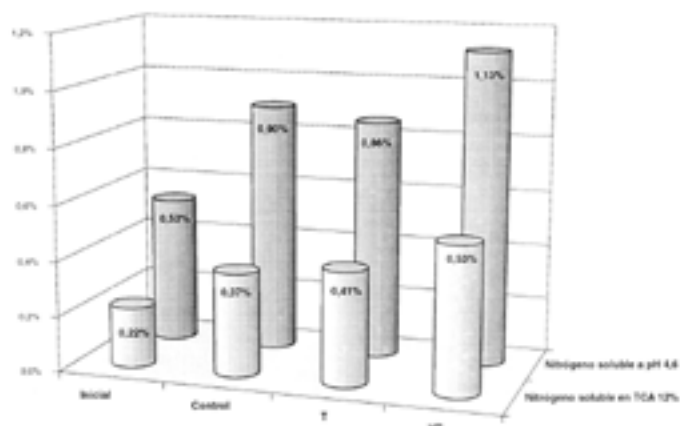


Fig. 2. Variación de las fracciones nitrogenadas de quesos en función de los tratamientos ensayados. Todos los valores están expresados sobre extracto seco. Los códigos corresponden a los grupos experimentales de la experiencia II.

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 muestran valores de proteólisis 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 microbianos, junto con un presumible aumento de la interacción sustrato-enzima a causa de la aplicación de la presión, podrían explicar el incremento en la proteólisis 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 proteólisis.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado con el apoyo del Comisionado Europeo, proyecto FAIR-CT96-1113. J. Saldo recibió una beca del Comissionat 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): «Gerber method for the determination of fat in milk and milk products», *British Standard*, 696, BSI, London, UK.
- Capellas, M.; Mor-Mur, M.; Sendra, E.; Pla, R., y Guamis, B. (1996): «Populations of aerobic mesophiles and inoculated *Escherichia coli* during storage of fresh goat's milk cheese treated with high pressure», *J. Food Protect.*, 59, 582-587.
- Carballo, J.; Fresno, J. M.; Tzoro, J. R.; Prieto, J. G.; Bernardo, A., y Martín-Sarmiento, R. (1994): «Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish hard goat cheese», *Food Chem.*, 49, 77-82.
- Fernández-García, E.; Olano, A.; Cabrerizo, 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 milk», *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, 271-274.
- Gaya, P.; Medina, M.; Rodríguez-Marín, M. A., y Nítez, 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 milk», *Bull. West Virginia Univ. Agric. Exp. Sta.*, 58, 15-35.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1983): *Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos*, vol. 1, Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- International Dairy Federation (IDF) (1982): «Fromages et fromages fondus. Détermination de l'extrait sec total», *IDF norme 44. Int. Dairy Fed.*, Brussels, Bélgica.
- International Dairy Federation (IDF) (1993): «Milk-Nitrogen in milk», *IDF Standard No. 2208. Int. Dairy Fed.*, Brussels, Bélgica.
- Law, B. A. (1984): «The accelerated ripening of cheese», 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.; Dewettink, K., y Huyghebaert, A. (1998a): *Proteolysis and viscoelastic 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.; Dewettink, K.; Van Camp, J., y Huyghebaert, A. (1998b): «High pressure brining of Gouda cheese and its effect on the cheese serum», *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 31, 552-558.
- McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Lucey, J. A.; Jordan, K. N., y Cogan, T. M. (1993): «Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese», *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.
- Picon, A.; Gaya, P.; Medina, M., y Nítez, M. (1995): «The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening», *Journal of Dairy Science*, 78, 1236-1247.
- Reps, A.; Kolakowski, P., y Dajnowiec, F. (1998): «The effect of high pressure on microorganisms and enzymes of ripening cheeses», en *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, Neil S. Isaacs (ed.), págs. 265-270, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Smid, J. E.; Poolman, B., y Konings, W. N. (1991): «Casein utilization by lactococci», *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2447-2452.
- Trujillo, A. J.; Ferragut, V.; Gervilla, R.; Capellas, M., y Guamis, 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 Motobayashi, N. (1992): «Method for accelerating cheese ripening», *European Patent Application EP 0 469 851 A1*.