

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

Estudio microbiológico del proceso madurativo del queso de Mahón : elaboración de un "Starter" para su fabricación a partir de la leche pasteurizada

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Antonio Suárez Lepe

Madrid, 2015

TP
1984
218

José Antonio Suárez Lape



* 5 3 0 9 8 6 7 3 8 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-013469-0

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL PROCESO MADURATIVO DEL QUESO DE MAHON.
ELABORACION DE UN "STARTER" PARA SU FABRICACION
A PARTIR DE LECHE PASTERIZADA



ARCHIVO

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1984

Colección Tesis Doctorales. Nº 218/84

© José Antonio Suárez Lepe
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-20420-1984



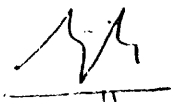
BIBLIOTECA

JOSE ANTONIO SUAREZ LEPE



*ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL PROCESO MADURATIVO DEL
QUESO DE MAHON. ELABORACION DE UN "STARTER" PARA
SU FABRICACION A PARTIR DE LECHE PASTERIZADA*

*Director: D. Baldomero Iñigo Leal
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.
Vicedirector del Instituto de Fermentaciones
Industriales*



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Biología

Departamento de Microbiología

Año 1982

Este trabajo de investigación que constituye el contenido de la Tesis que presento para aspirar al Grado de Doctor, se inserta en un Programa de Microbiología de Quesos, dentro de un amplio Proyecto de Investigación titulado: "Tipificación de Quesos Nacionales y Optimización de su Tecnología", que desarrolla la Unidad Estructural de Microbiología del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. en colaboración con el Instituto del Frio.

Mi profundo agradecimiento a:

- D. Dimas Fernández Galiano, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, Ponente de esta Tesis.*
- D. Baldomero Iñigo Leal, que acometió personalmente la dirección de la misma ordenando sus vías de estudio, por su estímulo y orientación.*
- D. Rafael Barneto Hidalgo, por su valiosa ayuda en el planteamiento del trabajo experimental.*
- D^a Mercedes Ramos González, por el asesoramiento recibido en algunas de las experiencias que se describen.*
- D. José Garrido Márquez, Director del Instituto donde se llevó a cabo el trabajo.*

Igualmente quiero agradecer la aportación prestada por las señoritas Dolores Gómez, Felisa Jorganes y Marisa Rubio, por el Jurado de Catadores del Centro Experimental de Arganda del Rey (Madrid), y a todos mis compañeros de la Unidad Estructural de Microbiología, que de una forma u otra, han sido colaboradores circunstanciales de este trabajo.

Quiero resaltar también la ayuda encontrada en los propietarios de las Fincas Ganaderas Son-March, Son-Cam, y Beni-Aixa de la Isla de Menorca, quienes suministraron periódicamente las muestras necesarias para este estudio microbiológico, así como el apoyo prestado por la Cooperativa Insular Ganadera de Alayor - COINGA - en cuyo laboratorio se realizaron los primeros trabajos experimentales.

I N D I C EPáginaCAPITULO I. INTRODUCCION

I.1. Generalidades	1
I.2. Microorganismos que intervienen en la maduración del queso	4
I.2.1. Bacterias lácticas	6
I.2.1.1. Cocos lácticos	7
I.2.1.2. Lactobacilos	9
I.2.2. Micrococos y Estafilococos	10
I.2.3. Enterococos	12
I.2.4. Levaduras y Mohos	13
I.3. El Queso de Mahón	17
I.3.1. Antecedentes históricos y evolución de la producción	18
I.3.2. Elaboración artesanal	20
I.3.3. Características generales de la fabricación	22

CAPITULO II. - EVOLUCION DE LA MICROFLORA A LO LARGO DE LA MADURACION

II.1. Introducción	25
II.2. Materiales, Métodos y Técnicas	26
II.2.1. Toma de muestras	26
II.2.2. Sistemática operativa de las siembras, recuentos y aislamientos	28
II.2.2.1. Siembras en placa	28
II.2.2.2. Recuento de microorganismos viables	30

	<u>Página</u>
II.2.2.3. Aislamiento de las colonias	31
II.3. Resultados	32
II.4. Discusión	40
II.5. Conclusiones	44
<u>CAPITULO III. IDENTIFICACION DE ESPECIES BACTERIANAS</u>	
III.1. Introducción	48
III.2. Materiales, Métodos y Técnicas	50
III.2.1. Género <u>Streptococcus</u>	50
III.2.1.1. Diferenciación de los grupos Fisiológicos Láctico (N de Lancefield) y <u>Enterococcus</u> (D de Lancefield)	51
III.2.1.2. Identificación de especies del Grupo Láctico..	53
III.2.1.3. Identificación de especies del Grupo <u>Enterococcus</u>	54
III.2.2. Género <u>Leuconostoc</u>	55
III.2.3. Género <u>Lactobacillus</u>	56
III.2.3.1. Identificación de especies del Grupo <u>Streptobacterium</u>	57
III.3. Resultados	59
III.3.1. Microflora láctica	78
III.3.2. Enterococos	82
III.4. Discusión	84
III.4.1. Microflora láctica	84
III.4.2. Enterococos	88
III.5. Conclusiones	90

CAPITULO IV. IDENTIFICACION DE ESPECIES DE LEVADURAS

IV.1. Introducción	93
IV.2. Materiales, Métodos y Técnicas	94
IV.2.1. Identificación de especies	94
IV.2.1.1. Exámen microscópico	95
IV.2.1.2. Exámen de las formaciones seudomiceliales	95
IV.2.1.3. Formación de esporas	96
IV.2.1.4. Asimilación de nitratos	98
IV.2.1.5. Fermentación de azúcares ...	99
IV.2.1.6. Escisión de arbutina	101
IV.2.1.7. Asimilación de azúcares	102
IV.2.1.8. Poder fermentativo	104
IV.2.1.9. Formación de velo	106
IV.2.1.10. Reacción de litmus-milk ...	107
IV.3. Resultados	108
IV.4. Discusión	121
IV.5. Conclusiones	124

CAPITULO V. SELECCION DE CEPAS BACTERIANAS EN BASE A
SUS CARACTERISTICAS DE INTERES TECNOLOGICO

V.1. Introducción.....	127
V.2. Materiales, Métodos y Técnicas	130
V.2.1. Actividad acidificante de estreptococos lácticos	130
V.2.2. Actividad caseolítica de lactobacilos y enterococos	131
V.2.3. Análisis de actividades enzimáticas de lactobacilos y enterococos	132
V.3. Resultados	136

	<u>Página</u>
V.3.1. Selección de estreptococos lácticos	136
V.3.2. Selección de lactobacilos	143
V.3.3. Selección de enterococos	147
V.4. Discusión	151
V.5. Conclusiones	155
<u>CAPITULO VI. ELABORACION DE UN "STARTER" PARA QUESO DE MAHON. FABRICACION DEL MISMO A ESCALA SEMI-INDUSTRIAL PARTIENDO DE LECHE PASTERIZADA</u>	
VI.1. Introducción	158
VI.2. Materiales, Métodos y Técnicas	165
VI.2.1. Elaboración de starters	165
VI.2.2. Fabricación de quesos a escala semi-industrial	168
VI.2.2.1. Control de las cargas microbianas	170
VI.2.2.2. Determinaciones químicas	171
VI.2.2.3. Valoración de la calidad organoléptica	173
VI.3. Resultados	174
VI.3.1. Análisis microbiológico	174
VI.3.2. Análisis químicos	177
VI.3.3. Análisis sensorial	177
VI.4. Discusión	183
VI.5. Conclusiones	189
RESUMEN	193
BIBLIOGRAFIA	197

CAPITULO I

INTRODUCCION

I.i. GENERALIDADES

Desde el punto de vista físico la leche constituye un sistema complejo, o suspensión coloidal de partículas en una fase acuosa dispersante. Las partículas están constituidas por globulos de materia grasa y micelas proteicas; estas últimas, a su vez, están formadas por la interacción de caseinas y de otras proteínas, entre ellas y con las sales minerales presentes en la fase acuosa.

Cuando las caseinas coagulan, las otras proteínas quedan en solución, así como la lactosa y las sales minerales, constituyendo el suero.

El Código Alimentario Español, aprobado por Orden de 14 de Febrero de 1961 (B.O. del Estado del 21-II) en su artículo 3.15.26, define el queso como el producto fresco o madurado obtenido por separación del suero, después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, nata, suero de mantequilla o de sus mezclas.

La producción quesera se caracteriza sobre todo por su variedad, calculándose que existen más de mil variedades de queso en el mundo; teniendo en cuenta que la materia prima es siempre leche de vaca, oveja o cabra, con aparentemente ligeras variaciones en su composición, la razón esencial de la gran diversidad de quesos estriba en la multiplicidad de sus técnicas de elaboración. Cual-

quiera que sea ésta, la fabricación de un queso comprende esencialmente tres fases (VEISSEYRE, 1980):

La formación de gel de caseína. Es el cuajado o coagulación de la leche.

La deshidratación parcial de este gel por contracción de las micelas que lo forman. Es el desuerado de la cuajada.

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.

Y si bien las características físicas, químicas y organolépticas del queso, van a depender de la conjunción de diversos factores sobre los constituyentes de la leche, tales como:

Factores mecánicos: Agitación y corte de cuajada, prensado, etc.

Factores físicos: Temperatura, pH, etc.

Factores químicos y bioquímicos: Concentración de Ca, agua y sal en la cuajada, enzimas de la propia leche, etc.

es indudable que los factores de naturaleza microbiana son los principales responsables del proceso de maduración, revistiendo por tanto estos factores una importancia capital para la puesta a punto de una tecnología adecuada de fabricación.

Los quesos españoles tienen todavía un mercado reducido, y si bien existen empresas que elaboran importantes volúmenes en instalaciones adecuadas, de acuerdo con una metodología basada en la investigación aplicada, no son, en muchos casos, representantes de esta ortodoxia las elaboraciones artesanales. La mayoría de estos quesos fabricados con leche cruda, de buena calidad bacteriológica, resultan con caracteres organolépticos satisfactorios; sin embargo, es preciso constatar que la pasteurización previa de la leche es cada vez más frecuente, evitando los riesgos potenciales ocasionados por los gérmenes patógenos presentes en la leche cruda, y permitiendo una mayor higienización, y mejor marcha en la maduración posterior bacteriana del queso, mediante la siembra en el medio de cepas seleccionadas.

Para la obtención de un queso fabricado industrialmente, cuyos caracteres se asemejen lo más posible al queso artesanal, resulta imprescindible el estudio de la evolución y composición de su microflora autóctona, tanto de la responsable de la maduración, como de la indeseable, y la adopción de técnicas o procesos que favorezcan la primera y eviten la segunda.

El estudio microbiológico ordenado, consistente en los recuentos, aislamientos y caracterización taxonómica de los microorganismos que intervienen a lo largo de la maduración del queso, - así como las fisiologías que determinan su funcionalidad en el proceso, constituye la investigación primaria necesaria para reproducir los caracteres de sabor y aroma típicos del queso artesanal, - para después elaborar los mismos a partir de leche pasteurizada.

El resultado final conducirá a la selección de las cepas más idóneas para ser aplicadas en condiciones industriales, mediante la preparación de un "starter", "fermento", o "cultivo iniciador", que permita conseguir una tipificación de la calidad y lograr una meta de interés económico.

I.2. MICROORGANISMOS QUE INTERVIENEN EN LA MADURACION DEL QUESO

La leche, dados su composición y pH, es un excelente medio de cultivo para microorganismos, reuniendo muchas condiciones favorables para la vida microbiana.

Existen en ella algunos gérmenes patógenos, otros que simplemente dificultan la tecnología de los productos lácteos, y, - otros cuya dinámica biológica influye marcadamente en las características organolépticas de cada tipo de producto.

Sólo en casos muy raros, la leche, incluso la contenida en la ubre sana del animal, está libre de gérmenes. Sufre además contaminaciones, más o menos intensas, en el conducto galactóforo, en el orificio externo del pezón, durante el ordeño y después del mismo, por contacto con el aire, aparatos y utensilios en general.

La leche cruda con un contenido en gérmenes de 250.000 a 500.000 por ml., se considera en general de buena calidad (DEMETER y col., 1971). Por tanto, la cuajada es el asiento de poblaciones microbianas de varias especies, que están en constante evolución. Estos gérmenes se multiplican y mueren degradando y consumiendo algunos componentes de la cuajada, a la vez que vierten al medio secreciones celulares; es decir, que actúan modificando el sustrato durante la maduración de dos formas esenciales:

- excretando al medio enzimas extracelulares, y
- liberando por autólisis enzimas intracelulares.

Los sistemas enzimáticos evidenciados en el afinado de los quesos están formados por: proteasas, lipasas, descarboxilasas, deshidrogenasas y fosfatasas, siendo los dos primeros los que presentan un mayor interés tecnológico durante la maduración. En esta etapa se van acumulando numerosos contribuyentes del buqué del queso (aminoácidos libres, péptidos, aminas, metilcetonas, ácidos grasos libres, B-cetoácidos, etc.) que no estaban presentes en la leche, o lo estaban en cantidades muy pequeñas, y aparecen

como resultado de transformaciones metabólicas sufridas por la lactosa, los lípidos y las proteínas, gracias, principalmente, a la acción de estos exoenzimas y endoenzimas microbianos.

I.2.1. BACTERIAS LACTICAS

Las bacterias lácticas desempeñan un importante papel en la fabricación del queso, degradando la lactosa de la leche y transformandola, principalmente, en ácido láctico. La importancia de este ácido se pone de manifiesto, no sólo por su capacidad de coagular la leche e incrementar la acción del cuajo, sino que también actúa sobre los caracteres físicos de la cuajada, y por tanto en la textura del queso, al favorecer la retracción del coagulo y la expulsión del suero.

La formación de la cuajada, en la mayoría de las fabricaciones de queso, se logra de una forma mixta, es decir, mediante la acción del cuajo sobre la caseína, y gracias a la acidificación producida por las bacterias lácticas sobre la lactosa de la leche. De esta forma, se rompe el equilibrio coloidal de las partículas de fosfocaseinato cálcico, precipitando éstas y formándose un gel tridimensional que es la cuajada.

Pero las bacterias no sólo producen ácido láctico a partir de la lactosa, sino que según su caracter homo o heterofermen-

tativo, originan de un 85 a un 95% de este ácido en el primer caso, o alrededor de un 50% en el segundo más cantidades importantes de CO₂, acetaldehído, etanol, acetoina, diacetilo, etc. Esta distinción fué primeramente establecida por KLUYVER y DONKER en 1935, y está basada en el catabolismo de la lactosa.

Las bacterias lácticas homofermentativas utilizan la vía glicolítica de Embden-Meyerhof, mientras que las heterofermentativas, al carecer de la aldolasa y triosa-fosfato-deshidrogenasa, metabolizan la glucosa siguiendo la ruta de Warburg-Dickens.

Estas bacterias forman un grupo heterogéneo que presenta características generales, como ser: Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas, microaerófilas ó anaerobias facultativas, y fermentadoras de azúcares en condiciones diversas, respondiendo a dos tipos morfológicos principales: cocos y bacilos.

I.2.1.1. COCOS LACTICOS

La flora dominante al comienzo de la maduración de los quesos suele estar formada por estreptococos lácticos, pudiendo alcanzar, e incluso sobrepasar, la cifra de 10⁹ gér/g. (LENOIR, 1962).

Especies importantes de cocos lácticos homofermentativos encontrados son Streptococcus lactis y Streptococcus cremoris, -

responsables del proceso de acidificación inicial (COLLINS, 1962), con caracteres fisiológicos similares, y que intervienen en casi todas las variedades de queso de pasta no cocida (ORDOÑEZ, 1975).

Los leuconostocs y estreptococos lácticos heterofermentativos también están presentes en la mayoría de las cuajadas, pero en poblaciones sensiblemente inferiores. Streptococcus diacetylactis y Leuconostoc citrovorum pueden participar en el desarrollo de los aromas por su capacidad de producir ácidos volátiles, acetoina y diacetil. Este último producto, sustancia de alto poder aromático, participa en el buqué característico del queso Cottage, en tanto que resulta indeseable para otros tipos de quesos.

Las especies Leuconostoc lactis, Leuconostoc dextranicum, y Leuconostoc mesenteroides, intervienen originando la formación de "ojos" en el queso de Roquefort, permitiendo la instalación en ellos de Penicillium roqueforti, moho totalmente necesario para el buqué característico de este queso (DEVOYOD y col., 1972). No obstante, estas especies, pueden provocar el agrietamiento de los quesos cuando sus poblaciones alcanzan cotas muy altas (OVERCAST y ALBRECH, 1952).

En los quesos de pasta cocida, intervienen en la maduración estreptococos lácticos homofermentativos termófilos, adquiriendo gran interés Streptococcus thermophilus en la elaboración del queso Emmental.

En cuanto al género Pediococcus, sus especies constituyen el grupo de gérmenes lácticos menos estudiado en la mayoría de los quesos (NUÑEZ, 1976). La importancia relativa de este género en la maduración de los quesos Cheddar y Parmesano ha sido discutida por FRYER y SHARPE (1966), y BOTAZZI (1959, 1960), respectivamente, representando Pediococcus cerevisiae solamente el 1% de la flora "no starter" en el queso citado en primer lugar, y que fué elaborado con un "starter" en el que dicha especie no figuraba.

I.2.1.2. LACTOBACILOS

Parte integrante de la flora habitual de todos los quesos, con participación importante en la evolución durante la maduración, son las distintas especies del género Lactobacillus. Sus especies mesófilas -Lactobacillus casei y Lactobacillus plantarum- proceden de la contaminación de la leche y la cuajada (NAYLOR y SHARPE, 1958), y constituyen la flora principal en la última etapa de la maduración en los quesos de pasta no cocida, contribuyendo con sus proteasas y peptidasas a la proteólisis acaecida durante el afinado.

Las especies termófilas -Lactobacillus helveticus y Lactobacillus bulgáricus- se incluyen en los fermentos lácticos para los quesos de pasta cocida, incrementando la acidificación durante el prensado de la cuajada, e interviniendo a veces en asocia

ciones simbióticas con Streptococcus termophilus.

Otra misión a destacar en el género Lactobacillus es que la bajada de pH, inicialmente originada por la acción de los cocos lácticos, y continuada por la acidificación más tardía de este género, ejerce una acción inhibitoria sobre microorganismos indeseables que proliferan en torno a la neutralidad -Staphylococcus aureus y Clostridium butyricum.

I.2.2. MICROCOCCOS Y ESTAFILOCOCCOS

La presencia de micrococcos ha sido puesta de manifiesto en numerosos quesos desde que EVANS y col., (1914) los aislaron e identificaron en el queso Cheddar, llegando incluso a constituir Micrococcus caseolyticus y Micrococcus conglomeratus, la flora dominante de la corteza del queso Camembert (LENOIR, 1962).

En el queso Manchego, la epidermis de la ubre del animal y los establos, son fuentes de contaminación de micrococcos de la leche de oveja (NUÑEZ, 1976). Debido a su carácter halófilo también están presentes en la salmuera, pasando posteriormente a los quesos, e interviniendo en la maduración de los mismos con actividades proteolíticas y lipolíticas demostradas (ALFORD y FRAZIER, - 1950).

Otras veces, pueden alterar las rutas metabólicas de gérmenes asociados, como ocurre con los micrococcos caseolíticos del queso de Roquefort, que inhiben la producción de CO₂ a cargo de los leuconostocs (DEVOYOD y col., 1972). Sin embargo, a pesar de estar presentes en los quesos fabricados con leche cruda, no existen estudios en profundidad sobre estos gérmenes; y como las opiniones sobre sus efectos favorables o desfavorables en la maduración son contradictorias, no se ha contemplado la posibilidad de incluirlos en los "starters" empleados para las fabricaciones con leche pasteurizada.

Las bacterias del género Staphylococcus, aunque se encuentran en nichos ecológicos muy diversos, con frecuencia acompañan a los micrococcos en los productos lácteos (ABD-EL-MALEK y GIBSON, 1948).

En la leche de oveja cruda, y en la cuajada del queso Roquefort, se han encontrado poblaciones de estafilococos coagulasa positivos de hasta 10⁶ gér./ml., desapareciendo después de la práctica del salado (DEVOYOD, 1969).

Los estafilococos coagulasa negativos, debido a sus escasas actividades lipolíticas al pH del queso, y a su potencialidad de producir enterotoxinas (THATCHER y SIMON, 1956), se consideran gérmenes sin interés tecnológico para la fabricación de los quesos, e incluso peligrosos.

I.2.3. ENTEROCOCOS

Las especies de este grupo son colonizadoras habituales del tracto intestinal del hombre y los animales.

Debido a su carácter termoestable aparecen, no sólo en la leche cruda, sino también en la pasteurizada y en la leche templada de quesería. Presentes en todos los quesos se caracterizan por su halotolerancia, termoresistencia, y actividad proteolítica; debido a estas propiedades su contribución a la maduración de los quesos ha sido estudiada ampliamente.

Las especies encontradas con mayor frecuencia son Streptococcus faecalis y sus variedades, y Streptococcus durans (CLARK y REINBOLD, 1967).

La siembra de Streptococcus faecalis, asociado a estreptococos lácticos, en la leche de quesería, y el estudio de la maduración del queso Cheddar, fueron realizados por DAMLBER y KOSIKOWSKI (1948), comprobando el favorable desarrollo del aroma y el acortamiento en la maduración del queso.

También Streptococcus faecalis y Streptococcus durans se han usado en la fabricación acelerada del queso Cheddar (MABBIT, 1961), y solamente Streptococcus durans se incluyó en un "fermento" para acelerar la maduración del citado queso en Australia (VEISSEIRE, 1976).

ORDOÑEZ (1974), cita como germen principal y responsable de la proteólisis y caracteres organolépticos del queso tipo Ulloa, a Streptococcus faecalis var. liquefaciens, y postula la conveniencia de usar, para la fabricación de este tipo de queso con leche pasteurizada, un "fermento" constituido por Streptococcus lactis, Streptococcus cremoris, Lactobacillus plantarum, y Streptococcus faecalis var. liquefaciens.

La capacidad de Streptococcus faecalis para estimular el crecimiento de las bacterias lácticas también se ha puesto de manifiesto, como consecuencia de la liberación de aminoácidos, gracias a su actividad proteolítica sobre las caseínas de la leche (DEVOYOD y col., 1970).

I.2.4. LEVADURAS Y MOHOS

Dentro de la amplia gama de productos lácteos existente, solamente en los quesos intervienen a la vez levaduras y mohos. Las levaduras están presentes en gran número de variedades, constituyendo parte de la flora secundaria, a la vez que juegan un papel en los equilibrios microbianos, participando también en las modificaciones bioquímicas que tienen lugar en el curso del afinado.

De acuerdo con SCHMITD y LENOIR (1978), el estudio de la

flora de levaduras de los quesos fué iniciado por DUCLAUX (1883), y continuado a lo largo de los años por otros investigadores: MAZE (1910), HAMMER (1926), TRUPER (1928) etc. No obstante, no se determinaban las especies, ni se indicaba el papel de las mismas ni su contribución al afinado de los quesos.

IÑIGO y ROSSI (1957), estudian la flora microbiana espontánea que aparece durante la fabricación de la "Mozarella" italiana, a fin de poner de manifiesto qué especies predominan, y cuales son más activas en la transformación bioquímica del producto. Con anterioridad NELSON y BABEL (1947), considerando la importancia de las levaduras en el queso, ponían en práctica la adición de una especie, Mycotórula (Candida) lipolytica, a la preparación de los productos de pasta blanda.

En los últimos años, el estudio de la flora de levaduras en numerosos quesos-Saint Nectaire (DALE, 1962), Saint Paulin (DUCASTELLE y LENOIR, 1965), Robiola (BODINI y col., 1969), Roquefort (DEVOYOD y SPONEM, 1970), Cantal (MILLET y col., 1974) etc., están programados en base a la identidad, evolución, y fisiología de las especies en el curso de la maduración.

Las levaduras ejercen, por consumo de ácido láctico, una acción neutralizante que facilita la instalación en el queso de una flora menos acidófila. Además de este efecto sobre el pH, producen en el curso de su crecimiento, o durante su propia lisis,

sustancias estimulantes para otros grupos microbianos (DEVOYOD y DESMAZEAUD, 1971).

Debido a sus actividades enzimáticas, participan en la proteólisis, lipólisis, y producción de compuestos aromáticos o de sus precursores. Exopeptidasas de Kluyveromyces lactis han sido parcialmente purificadas y caracterizadas por DESMAZEAUD y DEVOYOD (1974).

CARINI y RESMINI (1968) observan que Torulopsis sphaerica degrada la caseína β , en tanto que Torulopsis candida ataca a las dos caseínas α y β .

Referente a sus actividades lipásicas, CARINI y col., (1975) demostraron que cepas de Candida, Torulopsis, Debaryomyces, y Criptomococcus, cultivadas en leche a 15°C, liberan ácidos grasos de cadena corta, en tanto que a 30°C los ácidos liberados son de cadena larga. Estas actividades han dado lugar a que se adicionen levaduras a la leche de partida para la fabricación de quesos, demostrándose por MAXA y JICINSKY (1956), PROOKS y col., (1959), y DEVOYOD y SPONEM (1970), la influencia favorable de las levaduras en el desarrollo del aroma de los quesos de cuajada prensada.

Los mohos, presentes y protagonistas en la maduración de algunos quesos, resultan, bien por la adición de fermentos fúngicos, como en los quesos tipo Camambert o Roquefort (Penicillium

caseicolum y Penicillium roqueforti respectivamente, o bien por la aparición natural de una flora superficial.

La especie más frecuentemente identificada en la corteza de los quesos es probablemente Geotrichum candidum, que aparece en el Camembert (JACQUET y LENOIR, 1969), Robiola (CARINI y col., 1970), Quargel, Tilsit, Bel Paese, Romadur (PETRICIC, 1959-1960). Asimismo, los géneros Penicillium, Mucor, y Cladosporium aparecen sistemáticamente en la superficie del Saint-Nectaire (DELESPAUL y col., 1973), y del Talegio (OTOGALLI y GALLI, 1972).

A pesar de que la participación de levaduras y mohos en los fenómenos proteolíticos y lipolíticos ha quedado demostrada (LENOIR, 1962; LAMBERET y LENOIR, 1972), su papel en la maduración queda en gran parte ligado al empirismo, resultando difícil su control. Es necesario, por tanto, un mejor conocimiento de esta flora secundaria, y una selección racional de las cepas, que permita orientar y controlar mejor los procesos microbiológicos y bioquímicos durante la maduración de los quesos.

1.3. EL QUESO DE MAHON

El queso de Mahón es un tipo de queso elaborado exclusivamente en Menorca, lo que le confiere particulares características debido a la determinación geográfica de la isla, que propician una agricultura y ganaderías peculiares y difíciles de reproducir fuera de este entorno.

Este queso se elabora a partir de leche de vaca, mezclada ocasionalmente con un 4-8% de leche de oveja. Se presenta en piezas cuadrangulares de cantos y aristas redondeados, forma que adquiere al prensar la cuajada con un lienzo, o "fogasser", atado por sus cuatro puntas. Su peso suele oscilar de 2 a 4 kilos por pieza, y sus dimensiones aproximadas de 20 a 25 cm., por 10 a 15 cm. las caras planas, y de 6 a 9 cm. de altura.

Cuando el queso es tierno, tanto la corteza como la pasta son blancas. A partir del mes de maduración la corteza amarillea, pero la pasta conserva su color blanquecino.

Los "ojos" se encuentran localizados en el centro de la masa, de aspecto mate, forma irregular, y tamaño que oscila entre el grano de arroz y el garbanzo.

El queso tierno, o "novell", es el recién salido de salmuera. Colocándole en lugares bien ventilados, se orea, si su destino va a ser para queso fundido. Si se destina a la maduración, se le unta con una capa de aceite de oliva para su mejor conservación.

Cuando ya tiene un mes, obtiene el gusto característico del queso mahonés, ligeramente ácido y cremoso. El queso más apre-ciado es el de tres o cuatro meses de maduración, cuando comienza a adquirir las características del queso fuerte pero sin llegar a serlo: algo salado, un poco picante y duro al diente, pero deshaciéndose en el paladar.

El queso viejo o añejo -el periodo de maduración puede llegar a un máximo de doce meses- es el queso español más idóneo para rallar; debido a su textura, el queso extranjero más parecido a éste es el parmesano.

En cuanto a su composición media, el contenido en grasa del extracto seco suele ser del 45%, siendo su microbiología totalmente desconocida.

Su Denominación de Origen ha sido aprobada recientemente por el Ministerio de Agricultura con carácter provisional (B.O. del Estado nº 1, Enero 1981, O.M. del 12 de Noviembre de 1980).

I.3.1. ANTECEDENTES HISTORICOS Y EVOLUCION DE LA PRODUCCION

Los primeros antecedentes de la elaboración del queso de Mahón se remontan al año 1360, durante los reinados de Jaime I y Pedro II, según lo atestiguan documentos catalanes conservados en

el Archivo de la Corona de Aragón.

Durante la dominación inglesa de la isla en 1783, tiene lugar una doble potenciación que caracterizará el futuro de la estructura productiva de la isla: un régimen de aparcería como solución a la propiedad y trabajo de la tierra, y una creación de trabajo familiar en talleres artesanos.

Avanzado el siglo XVIII, se logra un aumento espectacular en la producción lechera, debido a la introducción del cultivo de la zulla por parte de los ingleses, y a sus grandes producciones forrajeras (90.000 kg/ha. de forraje verde cada dos años, o lo que es lo mismo, 45.000 kg/ha. año de secano).

A finales del siglo XIX, el incremento de estas producciones dió origen a que la producción de queso llegara a ser una de las principales riquezas económicas de la isla, exportándose ya, en 1901, más de 150.000 kg. de queso de Mahón.

Durante 1962, se fabricaron 2.240.000 kg. de queso y 5.000 kg. de mantequilla, estando motivado este aumento por la racionalización de la ganadería y la agricultura en la isla y en toda España.

Aunque no disponemos de datos muy concretos, en 1979, según el Boletín Mensual de Estadística Agraria correspondiente a Febrero de 1981, se superaron las 3.500 T. de queso exclusivamen-

te de tipo Mahón, cifrándose la producción total de quesos españoles fabricados con leche de vaca en 80.671.000 T.

La cantidad media de queso de Mahón, elaborada anualmente, según la 2ª edición del Catálogo de Quesos Españoles del Ministerio de Agricultura, asciende a 3.000 T.

I.3.2. ELABORACION ARTESANAL

La producción de queso en Menorca tiene lugar en las propias fincas ganaderas, existiendo actualmente en la isla cerca de novecientos "llocs" que elaboran queso artesano.

La época de elaboración va de Septiembre a Junio, debido a que, por su clima y pluviosidad, la mejor época de pastos coincide con estos meses.

De la producción total, un 75% aproximadamente se destina a la elaboración de queso fundido; el resto se comercializa a través de la única quesería que existe en la isla, representando la alternativa industrial; esta firma compra el queso artesano y lo madura en sus cavas junto a la producción propia comercializando después toda ella. Por último, una pequeñísima parte, queda destinada al consumo de propietarios y colonos, existiendo también algunos mayoristas que suministran queso a toda la isla.

Esta elaboración la llevan a cabo los payeses, normalmente después del ordeño de la tarde, usando utensilios peculiares y específicos de la técnica quesera.

En una "alfabia" -recipiente de barro a modo de cuba- se deposita la leche, y a continuación el cuajo, que todavía en algunas explotaciones se prepara horas antes macerando en agua hojas de alcachofa silvestre. Transcurridos tres cuartos de hora aproximadamente, la leche ha cuajado, y con la mano, se desmenuza la cuajada hasta obtener granos del tamaño de un garbanzo. La masa cuajada se recoge en lienzos -"fogasser"- apretando con las manos para que escurra el suero a su través. Después de este escurrido manual, se ata el lienzo por sus cuatro puntas, y se somete a un prensado gradual de dos o tres horas, con tablas y pesas, hasta que el queso adquiere su forma definitiva.

Acabado el prensado se depositan las piezas en la "salera", cuyo densidad se considera correcta cuando depositando en ella un huevo, la circunferencia de la parte del mismo que flota, es aproximadamente igual a la de una moneda de diez duros.

A las 48 horas, los quesos se ponen a madurar en estantes con cañizos, dispuestos a tal fin en la misma habitación donde ha transcurrido la elaboración.

Periódicamente se observan las piezas de queso, tratando de evitar la aparición de mohos -"floridura"- en la corteza.

Cuando ha transcurrido un mes de maduración, se unta la corteza con aceite de oliva o mantequilla de vaca, para que no se reseque en exceso, y pueda discurrir normalmente el afinado.

1.3.3. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FABRICACION

Las características generales de la fabricación del queso de Mahón, según COMPAIRE (1969), son las siguientes:

Leche	De vaca, a veces 4 a 8% de oveja
Acidez	Normal
Grasa	Leche entera, rica en grasa
Calentamiento	A 30°C
Adiciones	Cuajo en polvo
Colorantes	No
Fermentos	No
Temperatura de Coagulación	30°C
Tiempo de Coagulación	45 minutos
Desuerado	Con lira a mano
Tamaño del corte	Garbanzo
Moldeado	Tomando la cantidad necesaria para un queso, se introduce en un lienzo sostenido por las puntas, y colocándole sobre una mesa se aprie

ta con una mano; atándose de forma peculiar se procede al prensado.

Salazón

En salmuera durante 48 horas.

Maduración

En cava a 18°C y 80% de humedad relativa, durante tiempos distintos según tipos.

C A P I T U L O I I

EVOLUCION DE LA MICROFLORA A LO LARGO DE LA MADURACION

II.1. INTRODUCCION

La importancia del estudio evolutivo de los diferentes microorganismos presentes en los quesos, y de su participación activa durante los procesos de degradación de la materia nitrogenada, quedó establecida a primeros de siglo a raíz de los trabajos de FREUDENREICH (1901-1902), ORLA JENSEN (1905-1906) y MAZE (1910), si bien no era todavía bien conocida la acción ejercida por cada grupo microbiano.

Evidentemente el papel primordial en la elaboración del queso lo ejerce la flora láctica, habiéndose demostrado que en numerosas variedades de quesos franceses, elaborados artesanalmente, las cualidades organolépticas provienen de leches con una importante carga microbiana de gérmenes lácticos (CHAZAUD, 1977); y aunque el ritmo de crecimiento inicial de los mismos es más rápido que el del resto de los otros grupos microbianos, también estos alcanzan importantes poblaciones numéricas en la cuajada, persistiendo algunos hasta los últimos estadios de la maduración, lo que pone en evidencia su participación en este proceso.

El presente capítulo está orientado hacia el conocimiento de la evolución en las poblaciones numéricas de bacterias lácticas (estreptococos y lactobacilos), enterococos, coliformes, micrococos y estafilococos, y, levaduras y mohos, a lo largo de cuatro meses, período en el que se ha estudiado la maduración espontánea del queso de Mahón artesanal.

II.2. MATERIALES, METODOS Y TECNICAS

II.2.1. TOMA DE MUESTRAS

Se han estudiado tres lotes de queso de Mahón artesanales, de distintos fabricantes y elaborados con leche cruda, procedentes de tres fincas ganaderas de la isla de Menorca, situadas en los términos municipales de Alayor, Ciudadela y Mahón.

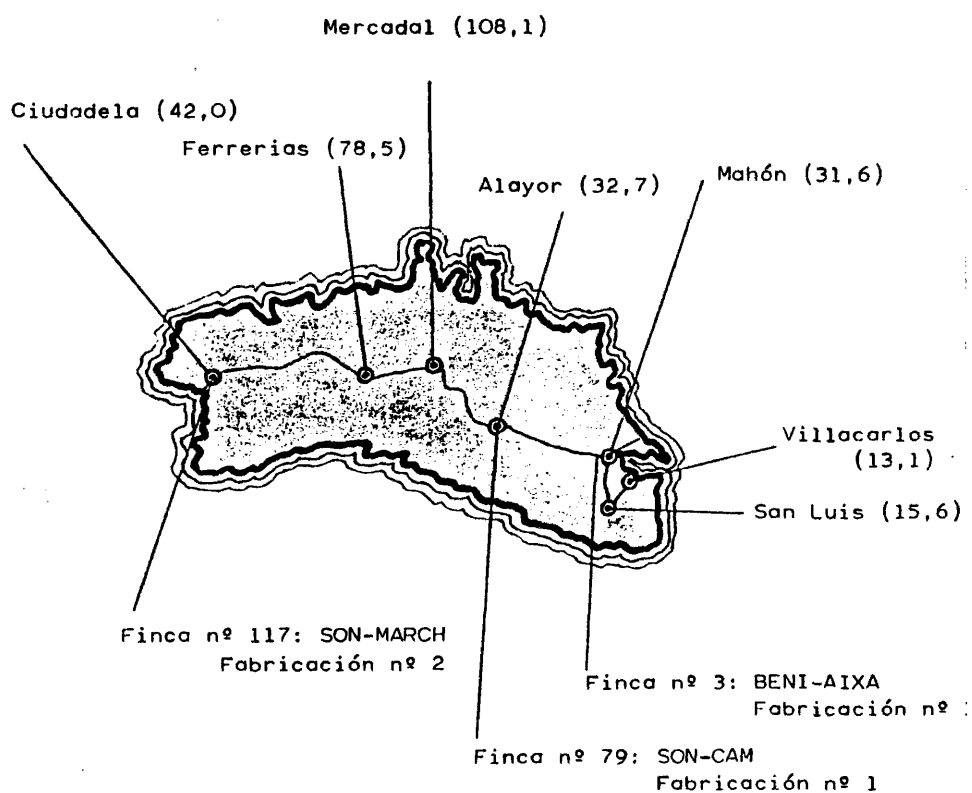
La Figura II.1. recoge la superficie media de las explotaciones ganaderas de la isla, y la localización geográfica de las tres fincas visitadas para la toma de muestras.

En cada una de las tres queserías, se tomó una muestra de leche recién ordeñada (ordeño manual), una muestra de cuajada, y una muestra de queso recién salido de salmuera. Las muestras de leche se tomaron con pipetas estériles de 10 ml., las de cuajada con espátulas de acero y placas de Petri estériles de 90 mm. de diámetro, y las de queso con socabados estériles de acero inoxidable. Con éstos se extraen, en sentido vertical, cilindros de queso del interior con altura y peso variables.

Todas estas muestras se transportaron en nevera a un laboratorio de Alayor donde fueron efectuadas las primeras siembras.

Finalmente, cada mes, se han recibido tres quesos procedentes de las mismas fincas y elaborados los mismos días que los

FIGURA II.1. DISTRIBUCION MUNICIPAL DE LA SUPERFICIE MEDIA (Ha).
 DE LAS EXPLOTACIONES GANADERAS DONDE SE FABRICA
 QUESO PAYES.
 LOCALIZACION DE LAS FINCAS DONDE SE HAN TOMADO
 LAS MUESTRAS.



de las primeras muestras, con el fin de seguir la evolución de la microflora en cada lote o serie, durante un periodo de cuatro meses.

II.2.2. SISTEMÁTICA OPERATIVA DE LAS SIEMBRAS, RECIENTOS Y AISLAMIEN- TOS

II.2.2.1. SIEMBRAS EN PLACA

Las muestras de leche fueron diluidas al 1/10 en solución estéril de Ringer 1/4 (WILSON, 1935). Las suspensiones originales de las muestras de cuajada, se obtuvieron adicionando 10 gr. de las mismas a una solución estéril de 90 ml. de citrato sódico al 2%, previamente calentado a 45°C, y triturándolas a continuación en homogeneizador Virtis. Igualmente se operó para obtener las suspensiones originales de las muestras de queso.

La preparación de diluciones decimales tiene por finalidad realizar, escalonadamente, diluciones del producto para lograr su posterior recuento microbiano. La técnica empleada ha sido la siguiente: Añadir 1 ml. de leche, suspensión de cuajada, o suspensión de queso, a un tubo que contenga 9 ml. de diluyente estéril, agitar. De esta mezcla se toma 1 ml. y se añade a un nuevo tubo conteniendo 9ml. del mismo diluyente estéril, repitiendo la operación hasta preparar un banco de diluciones en función del nú-

mero de gérmenes viables esperados.

De cada dilución se sembró 1 ml. en placas Petri estériles, añadiéndose a continuación los medios de cultivo según la selectividad de los microorganismos. Estos medios han sido los siguientes:

Agar Elliker (ELLIKER y col., 1956). Se utilizó para el cultivo y aislamiento de estreptococos, especialmente recomendado para estreptococos lácticos (DEMETER, 1969).
Período y temperatura de incubación: 48 horas a 32°C.

Agar Rogosa (ROGOSA y col., 1951). Medio selectivo sólido para el cultivo de lactobacilos, modificado por MABBIT y ZIELINSKA (1956).
Período y temperatura de incubación: 48 horas a 32°C.

Agar m-Enterococcus (SLANETZ y BARTLEY, 1957). Medio selectivo usado para el recuento y cultivo de estreptococos del grupo fisiológico Enterococcus.
Período y temperatura de incubación: 48 horas a 45°C.

Agar Manitol-Salt (CHAPMAN, 1945). Para el cultivo y aislamiento de estafilococos y micrococcos.
Período y temperatura de incubación: 48 horas a 37°C.

Agar Desoxicolato. Para el cultivo y aislamiento de bacterias coliformes, especificado en el "Standard Methods for the examination of Dairy Products" (1948).

Período y temperatura de incubación: 24 horas a 37°C.

Agar OGGA (MOSSEL y col., 1962). Para el cultivo y aislamiento de mohos y levaduras.

Período y temperatura de incubación: 48 horas a 27°C.

La preparación de todos estos medios se efectuó de acuerdo con las instrucciones de las casas suministradoras (Difco y Oxoid), realizando las esterilizaciones en autoclave SELECTA - AUTESTER mod. 437 G.

Una vez realizadas las siembras y solidificados los medios, fueron puestas a incubar las placas invertidas, habiendo tenido previamente la precaución de agitarlas con movimiento de rotación uniforme, para asegurar una distribución homogénea de los microorganismos en el medio, siguiendo las normas de la Fédération International de Laiterie-International Dairy-Federation (FIL - IDF), 3:1958.

II.2.2.2. RECUENTO DE MICROORGANISMOS VIABLES

El recuento de colonias se efectuó, una vez transcurridos los períodos de incubación, y observado el oportuno creci-

miento de las mismas, en aquellas placas en que se desarrollaron entre 30 y 500 colonias, siguiendo también las recomendaciones de la norma FIL-IDF, 3:1958.

II.2.2.3. AISLAMIENTO DE LAS COLONIAS

El aislamiento se llevó a cabo tomando con aguja de platino de 20 a 25 colonias bacterianas, y de 10 a 12 colonias de levaduras, en cada una de las placas apropiadas para el recuento. A continuación, se traspasaron a tubos de ensayo con caldo de la misma composición que las placas de procedencia. Después de su incubación y crecimiento fueron congeladas y liofilizadas en liofilizador General-Genevec GDU-15, para su posterior taxonomía.

II.3. RESULTADOS

Las Tablas II.1, II.2, y II.3, muestran los resultados de los recuentos de gérmenes viables estudiados a lo largo de la maduración del queso de Mahón artesanal en las fabricaciones números 1, 2 y 3 respectivamente.

En cada tabla se representa el nº de gérmenes/ml. de leche ó nº de gérmenes/gr. (cuajada y queso), frente a tiempo en días.

Las Figuras II.2, II.3, y II.4, muestran la evolución de la flora microbiana del queso de Mahón artesanal estudiada a lo largo de cuatro meses de maduración, en las fabricaciones números 1, 2 y 3 respectivamente. Se representa en ordenadas el logaritmo del número de gérmenes/g. y en abcisas el tiempo en días, hasta el total de 120 días, período final de la maduración espontánea estudiada.

Los grupos microbianos investigados, las cotas máximas alcanzadas por cada uno, y el momento en que se conseguían esos valores, han sido los siguientes:

Para la fabricación nº 1

Estreptococos: $5,7 \times 10^9$ gér./g. a los 30 días

Lactobacilos : $3,5 \times 10^9$ gér./g. a los 30 días

Enterococos	:	$4,7 \times 10^7$	gér./g. a los 30 días
Micrococos y Estafilococos	:	$1,2 \times 10^6$	gér./g. a los 30 días
Coliformes	:	$3,0 \times 10^7$	gér./g. un día
Lavaduras	:	$6,1 \times 10^5$	gér./g. un día
Mohos	:	$2,1 \times 10^5$	gér./g. en la cuajada

Para la fabricación nº 2

Estreptococos	:	$3,0 \times 10^9$	gér./g. un día
Lactobacilos	:	$1,4 \times 10^8$	gér./g. un día
Enterococos	:	$1,9 \times 10^8$	gér./g. un día
Micrococos y Estafilococos	:	$4,0 \times 10^6$	gér./g. un día
Coliformes	:	$5,0 \times 10^6$	gér./g. un día
Levaduras	:	$5,9 \times 10^6$	gér./g. un día
Mohos	:	$4,0 \times 10^4$	gér./g. en la cuajada

Para la fabricación nº 3

Estreptococos	:	$1,7 \times 10^9$	gér./g. un día
Lactobacilos	:	$5,4 \times 10^8$	gér./g. a los 30 días
Enterococos	:	$2,7 \times 10^8$	gér./g. a los 30 días
Micrococos y Estafilococos	:	$2,7 \times 10^6$	gér./g. un día
Coliformes	:	$7,9 \times 10^7$	gér./g. un día
Levaduras	:	$1,1 \times 10^5$	gér./g. a los 30 días
Mohos	:	$2,0 \times 10^4$	gér./g. un día

TABLA II.1. RESULTADOS DE LOS RECuentOS DE LOS GRUPOS DE GERMENES VIABLES ESTUDIADOS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL QUESO DE MAHON ARTESANAL. FABRICACION Nº 1.

	<u>colif.</u>	<u>enteroc.</u>	<u>microc. estafiloc.</u>	<u>estreptoc.</u>	<u>lactobacilos.</u>	<u>levaduras</u>	<u>mohos</u>
Leche cruda	$9,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$6,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$7,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
Cuajada	$3,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
Queso 1 d.	$3,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^9$	$1,3 \times 10^8$	$6,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$
Queso 30 d.	$1,3 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$5,7 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$2,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^2$
Queso 60 d.	$9,0 \times 10^2$	$8,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^3$	$5,0 \times 10^1$
Queso 90 d.	$1,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	-	$2,0 \times 10^1$
Queso 120 d.	-	$3,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$6,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	-	$1,0 \times 10^2$

34

FIGURA II.2. EVOLUCION DE LA MICROFLORA DEL QUESO DE MAHON ARTESANAL
A LO LARGO DE LA MADURACION. FABRICACION Nº 1

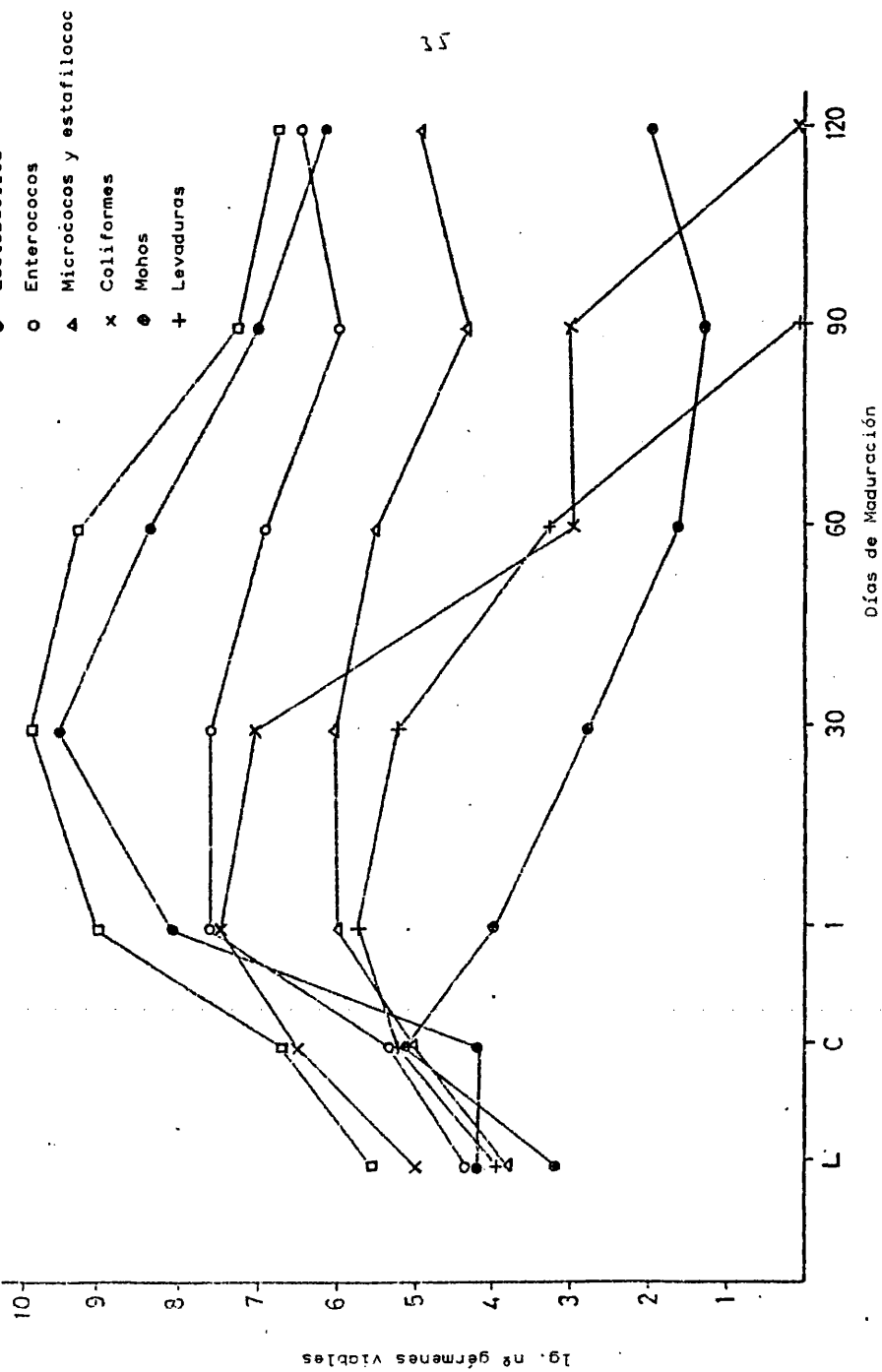


TABLA 11.2. RESULTADOS DE LOS RECuentOS DE LOS GRUPOS DE GERMEs VIABLES ESTUDIADOS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL QUESO DE MAHON ARTESANAL. FABRICACION N° 2.

	<u>colif.</u>	<u>enteroc.</u>	<u>microc. estafiloc.</u>	<u>estreptoc.</u>	<u>lacto- bacilos</u>	<u>levaduras</u>	<u>mohos</u>
Leche cruda	$1,5 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$
Cuajada	$2,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
Queso 1 d.	$5,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^9$	$1,4 \times 10^8$	$5,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$
Queso 30 d.	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$8,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^8$	$9,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$
Queso 60 d.	$1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$1,7 \times 10^2$	-
Queso 90 d.	$2,0 \times 10^2$	$8,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$3,8 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
Queso 120 d.	-	$1,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$6,1 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	-	$6,0 \times 10^2$

FIGURA II.3. EVOLUCION DE LA MICROFLORA DEL QUESO DE MAHON ARTESANAL A LO LARGO DE LA MADURACION. FABRICACION Nº 2.

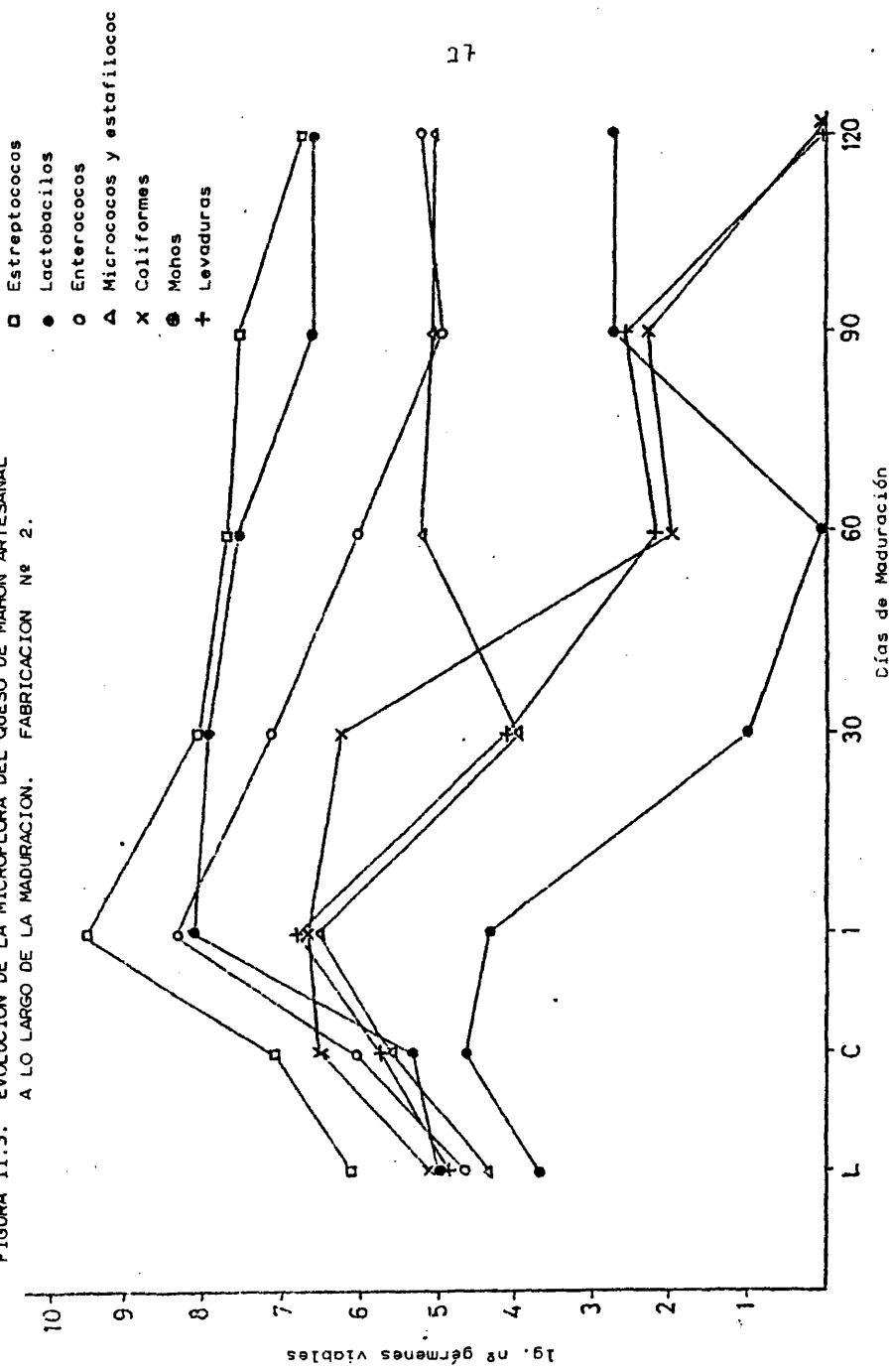


TABLA II.3. RESULTADOS DE LOS RECuentOS DE LOS GRUPOS DE GERMEs VIABLES ESTUDIADOS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL QUESO DE MAHON ARTESANAL. FABRICACION N° 3.

	colif.	enteroc.	microc. estafiloc.	estreptoc.	lacto-bacilos.	levaduras	mohos
Leche cruda	$2,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$
Cuajada	$3,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$
Queso 1 d.	$7,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^9$	$1,1 \times 10^8$	$2,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
Queso 30 d.	$1,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^9$	$5,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^5$	$7,2 \times 10^2$
Queso 60 d.	$1,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$
Queso 90 d.	-	$3,5 \times 10^6$	$5,4 \times 10^5$	$4,2 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$
Queso 120 d.	$7,0 \times 10^1$	$5,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$

II.4. DISCUSION

En la fabricación nº 1 se observa que la máxima concentración de gérmenes, en todos los períodos analizados a lo largo de la maduración, corresponde a los estreptococos que crecieron en Agar Elliker. Sus fracciones cuantitativamente más importantes, así como las de los lactobacilos, se alcanzan a los treinta días de maduración del queso, sufriendo posteriormente un ligero y paulatino descenso en el curso de la misma.

Los coliformes, que constituyen un índice de la calidad e higiene sanitaria del queso, están presentes en la leche, y alcanzan su máximo numérico en el queso de un día, decreciendo a continuación hasta desaparecer en el queso de cuatro meses, resultados concordantes con los obtenidos en el estudio del queso Manchego artesanal (NUÑEZ y col., 1976).

Micrococos y estafilococos están presentes en la leche, aumentando su número en la cuajada y después de la salmuera, posiblemente debido a su carácter halotolerante. A partir del queso de un día su número permanece prácticamente constante.

Levaduras y mohos presentan concentraciones más reducidas que el resto de la flora microbiana. El número máximo de levaduras lo presenta el queso de un día, y el de mohos, la cuajada, descendiendo durante el afinado, y no detectándose levaduras en -

los quesos de tres y cuatro meses. Esta evolución de levaduras difiere sensiblemente con la de otros tipos de quesos, en particular el Camembert artesanal (SCHMITD y LENOIR, 1978) en el que se alcanzan hasta 10^7 levaduras/g. a los treinta días de maduración.

En la fabricación nº 2, la flora láctica domina en todas las etapas, alcanzando los lactobacilos $5,6 \times 10^6$ gér./g. a los cuatro meses de maduración. Es interesante hacer notar que en otros tipos de quesos -Saint Paulin (DUCASTELLE y LENOIR, 1965), Roquefort (DEVOYOD, 1970)- los lactobacilos sólo representan una fracción escasa de la microflora total.

A la flora láctica, sigue en importancia numérica enterococos y coliformes. Estos últimos, no están presentes al final de la maduración, mientras que las tasas de enterococos se mantienen importantes ($1,7 \times 10^5$ gér./g.) hasta en el análisis efectuado en el queso de cuatro meses. De forma similar transcurre la evolución numérica de enterococos en el queso de Roquefort, alcanzándose en éste, 27×10^6 gér./g. a los cien días de afinado (DEVOYOD, 1969).

Micrococos y estafilococos aumentan considerablemente - después del salado, permaneciendo hasta el último estadio analizado en cotas prácticamente constantes. La evolución de estas bacterias halófilas es similar a la encontrada en el estudio del

queso Manchego artesanal (ROMAN, 1975).

Levaduras y mohos, al igual que en la fabricación número 1, se presentan numéricamente inferiores al resto de los grupos bacterianos. Las primeras proliferan activamente en el queso de un día, a continuación disminuyen a lo largo de la maduración, desapareciendo al final de la misma.

En la fabricación nº 3, la proliferación mayor de gérmenes en el curso de la maduración, está a cargo de estreptococos y lactobacilos, dominando los primeros en los estadios iniciales, y tendiendo a igualarse ambos numéricamente al final de los cuatro meses.

Esta fabricación presenta la fracción cuantitativamente más importante de enterococos, persistiendo por su tolerancia a la acidez y carácter halófilo, hasta los cuatro meses de afinado, período en que alcanzan una cota de $5,6 \times 10^6$ gér./g.

La evolución de coliformes y bacterias halófilas-micrococos y estafilococos es similar a la de las fabricaciones anteriores, tendiendo a desaparecer los primeros en los últimos estadios, y manteniéndose los segundos prácticamente constantes en los dos últimos períodos.

Levaduras y mohos, también presentan tasas de prolifera-

ción inferiores al resto de la microflora; y si bien las levaduras en esta fabricación están presentes en el queso de cuatro meses, su número es muy diferente al señalado por otros autores en distintas variedades de queso -Saint Nectaire (VERGEADE, 1975), -Roquefort (DEVOYOD y SPONEM, 1970), Cantal (MILLET y col., 1974), Cabrales (NUÑEZ y col., 1981)- en los que se alcanzan cotas numéricas superiores comparativamente en todos los períodos evolutivos estudiados.

II.5. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la evolución cuantitativa de la flora bacteriana, levaduras y mohos, del queso de Mahón artesanal, durante la fabricación, y a lo largo de un período madurativo de cuatro meses.

Para ello, se han tomado muestras de leche de vaca cruda cuajada y quesos, de tres fabricaciones distintas, procedentes de tres fincas ganaderas de la isla de Menorca.

De acuerdo con los recuentos de gérmenes viables en cada período estudiado, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- 1º) Los resultados del análisis microbiológico de la leche cruda de vaca, destinada a la fabricación de quesos, evidencian una carga microbiana importante de gérmenes no lácticos -constituida principalmente por enterococos y coliformes- lo que pone de manifiesto la contaminación de la misma.
- 2º) La evolución de los diferentes grupos bacterianos durante la maduración, ha sido similar para las tres fabricaciones estudiadas, y comparable a la observada por otros autores (NUÑEZ y col., 1976), (DEVOYOD, 1969), (ROMAN, 1975).
- 3º) Existe un predominio general de estreptococos y lactobaci-

los, dominando los primeros al comienzo de la fabricación. En el curso de la maduración quedan relativamente constantes, mientras que aumenta el número de lactobacilos, tendiendo a igualarse las tasas de crecimiento de ambos al final del último período estudiado.

- 4ª) Las bacterias halófilas (micrococos y estafilococos) alcanzan su máximo numérico después del salado, en el queso de un día, permaneciendo prácticamente constantes en el curso de la maduración.
- 5ª) El número de bacterias coliformes se eleva en todos los quesos desde la cuajada, proliferando notablemente al comienzo de la maduración. Luego siguen un curso evolutivo descendente, y se hallan ausentes al final de la maduración.
- 6ª) El número de enterococos presentes en la leche, aumenta en la cuajada, y particularmente al comienzo de la maduración, después del salado, manteniéndose la tasa alcanzada con ligeros declives hasta el final de la misma.
- 7ª) Las levaduras y los mohos están presentes en el queso de Mahón en número reducido, sensiblemente inferior al resto de la flora microbiana, y a la flora de levaduras estudiada en otras variedades de quesos. No obstante, siguen una

pauta evolutiva similar, multiplicándose notablemente en la cuajada, o en el queso de un día, para descender posteriormente en el curso del afinado. Al igual que los coliformes no están presentes al final de la maduración.

付

C A P I T U L O I I I

IDENTIFICACION DE ESPECIES BACTERIANAS

III.1. INTRODUCCION

Tradicionalmente en las queserías se ha prestado una particular atención a la calidad bacteriológica de la leche, aceptándose para la elaboración de quesos, leches con un índice de contaminación lo menos elevado posible.

En esta exigencia de búsqueda de calidad de la materia prima, influenciada por las condiciones de producción, ordeño y conservación, la mayoría de los trabajos se han dedicado a poner de manifiesto la flora indeseable de bacterias coliformes, y de gérmenes psicótrofos y termorresistentes; sin embargo, a la flora láctica acidificante, responsable en gran medida del proceso de coagulación y de los complejos fenómenos que ocurren a lo largo de la maduración, se le dedicaba menos interés, quizás debido a la constancia de su presencia en la leche cruda.

En esta flora láctica, constituida por bacterias diferentes desde el punto de vista taxonómico, resulta necesario, a la hora de seleccionar una microflora autóctona, poner de manifiesto cuáles son las especies que la integran.

En el Capítulo II, se ha estudiado la importancia relativa de los grupos microbianos que constituyen la microflora genuina del queso de Mahón, habiéndose precisado la evolución de los mismos, y la dominancia de bacterias lácticas y de enterococos

en el interior del queso en los distintos períodos de la maduración.

Este Capítulo se dedica a la determinación de las características taxonómicas que permitan distinguir las diferentes especies de gérmenes lácticos y enterococos, aislados de la leche, cuajada, y queso, en la etapa anterior.

La flora láctica habitualmente, y más raramente los enterococos, son las bacterias implicadas en la elaboración de los "starters" para la fabricación de quesos, a escala industrial, partiendo de leche pasteurizada.

III.2. MATERIALES, METODOS Y TECNICAS

III.2.1. GENERO STREPTOCOCCUS

La identificación de este género, y de sus distintas especies, se realizó de acuerdo con los criterios de SHARPE y col., (1966), y BUCHANAN y GIBBONS (1974).

Las características que definen al género son: cocos en parejas y cadenas más o menos largas, Gram positivos, catalasa negativos, homofermentativos, y reductores del tornasol antes de coagular la leche. Por tanto, las pruebas realizadas para la identificación de este género fueron las siguientes:

- Examen microscópico. Pureza del cultivo, morfología y tinción de Gram. Se utiliza microscopio de contraste de fase Wild-M-20-35626.
- Catalasa. Se estudió añadiendo 1 ml. de agua oxigenada a 5 ml. de cultivo en caldo Elliker.
- Carácter homofermentativo o heterofermentativo de los cocos. Se sembraron las cepas en el medio descrito por GIBSON y ABD-EL-MALEK (1945), agar nutritivo con alta concentración de glucosa; una vez efectuada la siembra, se sellaron los medios con un tapón de agar estéril.

Se consideraron heterofermentativas las cepas que originaron un desplazamiento del tapón de agar tras un período de incubación de 7 días a 32°C.

- Acción sobre la leche tornasolada. Las cepas se sembraron en leche tornasolada estéril, incubándolas durante un período de 7 días a 32°C. Los cambios aparecidos en el medio, reducción, acidificación y coagulación, fueron observados y anotados a las 24 h., 48 h., y 7 días de incubación a 32°C.

III.2.1.1. GENERO STREPTOCOCCUS, DIFERENCIACION DE LOS GRUPOS FISIOLÓGICOS LACTICO (GRUPO N DE LANCEFIELD) Y ENTEROCOCCUS (GRUPO D DE LANCEFIELD),.

Las pruebas realizadas para diferenciar ambos grupos fueron las siguientes:

- Crecimiento a 10°C, a 40°C, y a 45°C. Se comprobó el desarrollo bacteriano en caldo Elliker después de incubar durante 7 días a 10°C, y durante 48 h. a 40°C. y a 45°C. Estas incubaciones se efectuaron en baños de agua termostatados con una sensibilidad de $\pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Crecimiento en presencia de ClNa al 6,5%. Para su observación se utilizó el mismo medio de cultivo con la concentración de

C1Na indicada.

- Crecimiento a pH 9,6. Se utilizó también caldo Elliker previa esterilización y ajuste del pH a 9,6 con NaOH concentrada.

La temperatura de incubación fué de 32°C, excepto para las pruebas de resistencia a temperaturas límites. De acuerdo con los resultados de estas pruebas se identificaron como estreptococos lácticos los siguientes:

Crecimiento a 10°C	+
Crecimiento a 40°C	+
Crecimiento a 45°C	-
Crecimiento 6,5% C1Na	-
Crecimiento a pH 9,6	-

y, como enterococos, aquellos cuya respuesta a los test fueron:

Crecimiento a 10°C	+
Crecimiento a 40°C	+
Crecimiento a 45°C	+
Crecimiento 6,5% C1Na	+
Crecimiento a pH 9,6	+

III.2.1.2. IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO STREPTOCOCCUS
GRUPO LACTICO (N DE LANCEFIELD)

La identidad de las especies de este grupo se basó en el resultado de las siguientes pruebas:

- Voges-Proskauer. La producción de diacetilo y/o acetoina, a partir de la glucosa, se desarrolló según el método de BARRIT (1936), mediante la adición de α -naphthol a los cultivos, después de 7 días de incubación a 32°C.
- Fermentación de la maltosa. Las cepas fueron cultivadas durante 14 días a 32°C en un medio cuya composición fue la siguiente: Peptona 1,5%, Extracto de levadura 0,5%, Tween 80 0,1%, Maltosa 0,5%, y 0,5% de una solución de Rojo de Clorofenol (0,04 g. de clorofenol disueltos en 5 ml. de alcohol etílico de 95°). El medio fue esterilizado por filtración. Antes de proceder a la inoculación, se incubaron los tubos con el medio de cultivo durante 6 días a 32°C para comprobar su esterilidad.
- Crecimiento en presencia de ClNa al 4%. Para su observación se utilizó caldo Elliker con la concentración de ClNa indicada. Se observa el crecimiento a las 48 horas de incubación a 32°C.
- Producción de NH₃ a partir de la arginina. Se empleó el medio descrito por ABD-EL-MALEK y GIBSON (1948), incubando los tubos

sembrados junto a tubos control estériles. Una vez observado el crecimiento, se añadió 2 ml. por tubo de reactivo de Nessler, que da color rojo con los iones amonio.

- Producción de CO₂ a partir de citrato. Se llevó a cabo en el medio de REDDY y col., (1971). La técnica utilizada fué la misma que para demostrar el caracter heterofermentativo. Los cultivos fueron incubados 72 h. a 32°C.

III.2.1.3. IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO STREPTOCOCCUS.

GRUPO ENTEROCOCCUS (D DE LANCEFIELD).

Se realizaron las pruebas siguientes:

- Reducción de telurito potásico. Ha sido utilizado un medio compuesto por agar-Triptosa y telurito potásico al 0,05%. Se sembró en estria en placas Petri, previa esterilización del medio 15 min. a 1 atmósfera de presión, incubando 72 h. a 32°C. Las colonias que reducen el telurito presentan color negro.
- Fermentación de hidratos de carbono y polialcoholes. Las cepas fueron cultivadas durante 14 días a 32°C en el medio descrito en III.2.1.2. para la fermentación de la maltosa. Se utilizaron los siguientes azúcares y alcoholes: Sorbitol, Melezitosa, Manitol, Arabinosa, Rafinosa, Glicerol y Melibiosa.

III.2.2. GENERO LEUCONOSTOC

Siguiendo los criterios adoptados por GARVIE (1960, 1967), y BUCHANAN y GIBBONS (1974), la identidad de las especies de este género se basó en el resultado de las pruebas siguientes:

- Crecimiento a 37°C, 39°C, y 45°C. Se comprobó en caldo Elliker, realizando las incubaciones en baño termostático con una sensibilidad de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Termorresistencia de las cepas. Se realizó inoculando 0,05 ml. de cultivo de caldo Elliker. Los tubos se calentaron en baño María a la temperatura de 55°C durante 15 min. y 30 min. Tras el tratamiento térmico, se incubaron durante 7 días a 32°C. El resultado se consideró negativo cuando no existió indicio alguno de turbidez.
- Voges-Proskauer. Descrito anteriormente (III.2.1.2.)
- Síntesis de dextrano. Se llevó a cabo en el medio descrito por GARVIE (1960), al que se incorporó sacarosa a una concentración del 5%. La producción de sustancias viscosas alrededor de las colonias se tomó como resultado positivo.
- Hidrólisis de la esculina. La prueba se realizó sembrando las cepas en el caldo de NAYLOR y SHARPE (1958), e incubando durante 7 días a 32°C. La hidrólisis de la esculina se detecta por

el ennegrecimiento del medio y la pérdida de fluorescencia.

- Fermentación de hidratos de carbono. El medio base utilizado para los leuconostocs fué el caldo MRS (DE MAN y col., 1960), sin extracto de carne ni glucosa, y con una concentración de rojo de clorofenol del 0,004%. La concentración de azúcares fué del 2%, siendo utilizados los siguientes: Arabinosa, Xylosa, Salicina, Melibiosa, Trehalosa, Manitol, Amigdalina, Cellobiosa, Melezitosa, Rafinosa, y Lactosa.

III.2.3. GENERO LACTOBACILLUS

La identificación de este género se basó en el resultado de las pruebas siguientes:

- Examen microscópico. Pureza del cultivo, morfología y tinción de Gram.
- Prueba de la catalasa. Descrita anteriormente (III.2.1.)
- Ausencia de esporas. Mediante examen microscópico.

Los lactobacilos aislados se clasificaron de acuerdo con el criterio de ORLA JENSEN (1943): caracter homofermentativo o heterofermentativo, y facultad de crecimiento a 15°C y 45°C en caldo Elliker y leche tornasolada, en los tres grupos siguientes:

Grupo I. Streptobacterium. Homofermentativos. Crecimiento a 15°C positivo.

Grupo II. Thermobacterium. Homofermentativos. Crecimiento a 15°C negativo.

Grupo III. Betabacterium. Heterofermentativos.

III.2.3.1. IDENTIFICACION DE ESPECIES DE LACTOBACILLUS PERTENECIENTES AL GRUPO STREPTOBACTERIUM.

Se han seguido las normas descritas por SHARPE (1979), teniendo en cuenta especialmente, para la separación de especies, la fermentación de Arabinosa, Melibiosa y Rafinosa.

Las pruebas realizadas fueron:

- Hidrólisis de la esculina. Descrita anteriormente (III.2.2.)
- Producción de NH₃ a partir de la arginina. Descrita anteriormente (III.2.1.2.)
- Fermentación de hidratos de carbono. Utilizando como medio base caldo MRS (DE MAN y col., 1960), de igual forma que para la identificación de especies del género Leuconostoc.

Los azúcares ensayados fueron: Arabinosa, Lactosa, Melibiosa, Rafinosa, Rhamnosa, y Sacarosa.

La nomenclatura que se ha utilizado en la clasificación de los cepas, consta de dos letras mayúsculas que alternan con dos números. La primera letra M, corresponde a la procedencia del sustrato, en nuestro caso Mahón; el número que sigue a continuación, la fabricación artesanal estudiada (1, 2 ó 3); la letra siguiente indica el tipo de sustrato: L = Leche, C = Cuajada, Q = Queso, correspondiendo el número final, al número de aislamiento de la cepa en cuestión. Para distinguir entre las muestras de queso de un día, un mes, dos meses, tres meses, y cuatro meses, se han usado los siguientes subíndices: Q=1 día, Q₁=1 mes, Q₂ = 2 meses, Q₃ = 3 meses, y Q₄ = 4 meses.

Ejemplos: M-2-C-7 = Mahón-Fabricación nº 2-Cuajada-Cepa 7; M-1-Q₂-12 = Mahón-Fabricación nº 1-Queso de 2 meses - Cepa nº 12.

Dos iniciales mayúsculas, a continuación de la nomenclatura descrita, indican el medio de cultivo selectivo que ha servido como medio nutritivo, a partir del cual se ha efectuado el aislamiento de las colonias: RO = Rogosa, LA = Elliker, ME = m-Enterococcus.

III.3. RESULTADOS

820 Cepas bacterianas han sido identificadas de acuerdo con las respuestas obtenidas frente a las pruebas taxonómicas realizadas para cada especie.

Los resultados de los test ensayados, para poner de manifiesto las distintas especies bacterianas que intervienen a lo largo del proceso madurativo del queso de Mahón, figuran en las Tablas III.1, III.2., III.3., y III.4.

El total de colonias bacterianas aisladas durante el estudio de la evolución de la microflora, para su posterior taxonomía, fué de 1050. Se ha identificado, por tanto, el 78,1% del total de colonias aisladas. El 21,9% restante no ha sido identificado, bien por no haber sobrevivido después del proceso de liofilización, bien por tratarse de microorganismos que, aún procediendo de medios presumiblemente selectivos, han dado respuestas positivas a algunas pruebas realizadas que los descalifican como gérmenes lácticos o enterococos.

La taxonomía bacteriana ha ido encaminada por tanto, a la identificación de bacterias lácticas y enterococos, que son los microorganismos que de manera constatada universalmente (ROSE A.H., 1981) intervienen en el desarrollo de los "starters".

La distribución de las especies bacterianas identificadas en la leche, cuajada y queso de Mahón en cada una de las tres fabricaciones artesanales, así como sus frecuencias absoluta y relativa, aparecen descritas en las Tablas III.5 a III.16.

El histograma de la Fíg. III.1, muestra, a modo de resumen, la composición de la flora láctica y enterococos identificados.

T A B L A . III.1

RESPUESTA FRENTE A LAS PRUEBAS QUE SE EXPRESAN DE LAS CEPAS PERTENECIENTES AL GENERO STREPTOCOCCUS, GRUPO N DE LANCEFIELD.

<u>Nº de Cepas</u>	<u>24</u>
Crecimiento 10°C	+
Crecimiento 40°C	+
Crecimiento 45°C	-
Voges-Proskauer	- (3 ⁺)
Fermentación maltosa	+
Crecimiento 4% ClNa	+ (2-)
NH ₃ de arginina	+
CO ₂ a partir de citrato	-

Diagnóstico: Streptococcus lactis

T A B L A I I I . 2

RESPUESTA FRENTE A LAS PRUEBAS QUE SE EXPRESAN DE LAS CEPAS PERTENECIENTES AL GENERO STREPTOCOCCUS, GRUPO D DE LANCEFIELD

<u>Nº Cepas</u>	<u>107</u>	<u>84</u>	<u>18</u>	<u>116</u>
Reducción telurito K	+	+	-	-
Hidrólisis gelatina	-	+	-	-
TTC	NE	NE	NE	NE
Acción sobre leche tornasolada	RCA	RCA P	RCA	RCA
Crecimiento pH 9,6	+	+	+	+
Crecimiento 6,5% ClNa	+	+	+	+
Fermentación de:				
Sorbitol	+	+	+	-
Melezitosa	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	-
Arabinosa	+	+	+	-
Rafinosa	+	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+
Diagnóstico:	<u>S. faecalis</u> var. <u>faecalis</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>liquefaciens</u>	<u>S. faecium</u>	<u>S. durans</u>

NE: no ensayado

TTC: 2,3,4 trifenil tetrazolio

RCA: reducción, coagulación, acidificación.

RCAP: reducción, coagulación, acidificación, peptonización.

T A B L A III.3

RESPUESTA FRENTE A LAS PRUEBAS QUE SE EXPRESAN DE LAS CEPAS PERTENECIENTES AL GENERO LEUCONOSTOC.

<u>Nº Cepas</u>	<u>3</u>
Crecimiento 37°C	+
Crecimiento 39°C	-
Crecimiento 45°C	-
Resistencia 55°C/15'	+
Resistencia 55°C/30'	+
Voges-Proskauer	+
Síntesis dextrano	-
Hidrólisis esculina	- (1 †)
Fermentación de:	
Arabinosa	-
Xilosa	-
Salicina	-
Sacarosa	+ (1 †)
Melibiosa	-
Trehalosa	-
Manitol	+
Amigdalina	-
Celobiosa	-
Melezitosa	-
Rafinosa	-
Lactosa	+

Diagnóstico: Leuconostoc lactis

T A B L A I I I . 4

RESPUESTAS FRENTE A LAS PRUEBAS QUE SE EXPRESAN DE LAS CEPAS PERTENECIENTES AL GENERO LACTOBACILLUS, GRUPO STREPTOBACTERIUM.

<u>Nº Cepas</u>	<u>13</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>451</u>
Crecimiento a 15°C	+	+	+	+
Crecimiento a 45°C	±	+	-	±
CO ₂ de Glucosa	-	-	-	-
NH ₃ de arginina	-	-	-	-
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+ (10±)
Fermentación de:				
Arabinosa	-	-	-	±
Lactosa	+	+	-	+
Melibiosa	-	-	-	+
Rafinosa	-	-	-	+
Rhamnosa	-	+	-	±
Sacarosa	+	-	+	+ (20-)
Xylosa	-	-	-	±
Diagnóstico:	<u>L.casei</u> <u>var.casei</u>	<u>L.casei</u> <u>var.rhamnosus</u>	<u>L.casei</u> <u>var.alactosus</u>	<u>L.plantarum</u>

T A B L A III.5

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUAJADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 1

Medio agar Elliker

	<u>Especie</u>	<u>Nº cepas</u>
Leche	<u>Streptococcus faecium</u>	2
	<u>Streptococcus lactis</u>	1
	<u>Leuconostoc lactis</u>	1
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	1
Cuajada	<u>Streptococcus lactis</u>	2
	<u>Streptococcus faecalis var. faecalis</u>	1
	<u>Streptococcus durans</u>	1
	<u>Streptococcus faecium</u>	1
Queso 1 día	<u>Streptococcus lactis</u>	1
Queso 30 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	19
	<u>Streptococcus lactis</u>	3
	<u>Leuconostoc lactis</u>	1
Queso 60 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	16
Queso 90 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	10
	<u>Streptococcus durans</u>	1
	<u>Streptococcus faecium</u>	1
Queso 120 días	<u>Streptococcus faecalis var. faecalis</u>	5
	<u>Streptococcus faecium</u>	4
	<u>Streptococcus faecalis var. liquefaciens</u>	3
	<u>Streptococcus durans</u>	2

T A B L A III.6

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUAJADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 2

Medio agar Elliker

	<u>Especie</u>	<u>Nº cepas</u>
Leche	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens.</u>	3
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	2
	<u>Streptococcus faecium</u>	1
Cuajada	<u>Streptococcus durans</u>	9
	<u>Streptococcus lactis</u>	2
Queso 1 día ..	<u>Streptococcus lactis</u>	7
	<u>Streptococcus durans</u>	1
Queso 30 días.	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens.</u>	10
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	8
Queso 60 días.	<u>Lactobacillus plantarum</u>	11
	<u>Streptococcus lactis</u>	2
	<u>Streptococcus faecium</u>	2
	<u>Leuconostoc lactis</u>	1
	<u>Streptococcus faecalis var. liquefaciens</u>	1
Queso 90 días.	<u>Lactobacillus plantarum</u>	18
	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>	2
	<u>Lactobacillus casei var. rhamnosus</u>	1
	<u>Streptococcus faecalis var. liquefaciens</u>	1
Queso 120 días	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>	9
	<u>Lactobacillus casei var. alactosus</u>	1
	<u>Streptococcus lactis</u>	1
	<u>Streptococcus faecalis var. liquefaciens</u>	1
	<u>Streptococcus faecalis var. faecalis ...</u>	1
	<u>Streptococcus faecium</u>	1

T A B L A III.7

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUAJADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 3

Medio agar Elliker

	<u>Especie</u>	<u>Nº cepas</u>
Leche	<u>Streptococcus durans</u>	6
	<u>Streptococcus lactis</u>	2
Cuajada	<u>Streptococcus durans</u>	8
	<u>Streptococcus lactis</u>	1
Queso 1 día ..	<u>Streptococcus durans</u>	6
	<u>Streptococcus lactis</u>	1
Queso 30 días.	<u>Streptococcus durans</u>	11
Queso 60 días.	<u>Lactobacillus plantarum</u>	11
	<u>Streptococcus lactis</u>	1
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u> .	1
Queso 90 días	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u> .	11
	<u>Streptococcus durans</u>	8
Queso 120 días	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u> .	14
	<u>Streptococcus durans</u>	4
	<u>Streptococcus faecium</u>	1

T A B L A III.8

ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUAJADA Y QUESO DE MAHON. FRECUENCIAS ABSOLUTA Y RELATIVA.

Medio agar Elliker

Fabricación nº 1

<u>Especies identificadas</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>%</u>
<u>Lactobacillus plantarum</u>	46	60,6
<u>Streptococcus faecium</u>	8	10,5
<u>Streptococcus lactis</u>	7	9,2
<u>Streptococcus faecalis var. faecalis</u>	6	7,9
<u>Streptococcus durans</u>	4	5,3
<u>Streptococcus faecalis var. liquefaciens</u> ..	3	3,9
<u>Leuconostoc lactis</u>	2	2,6
Total	76	100

Fabricación nº 2

<u>Especies identificadas</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>%</u>
<u>Lactobacillus plantarum</u>	37	38,6
<u>Streptococcus faecalis var. liquefaciens</u> ..	16	16,7
<u>Streptococcus lactis</u>	12	12,5
<u>Lactobacillus casei var. casei</u>	11	11,5
<u>Streptococcus durans</u>	10	10,4
<u>Streptococcus faecium</u>	4	4,2
<u>Streptococcus faecalis var. faecalis</u>	3	3,1
<u>Leuconostoc lactis</u>	1	1,0
<u>Lactobacillus casei var. rhamnosus</u>	1	1,0
<u>Lactobacillus casei var. alactosus</u>	1	1,0
Total	96	100

Fabricación nº 3

<u>Especies identificadas</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>%</u>
<u>Streptococcus durans</u>	43	50,0
<u>Streptococcus faecalis var. faecalis</u>	26	30,2
<u>Lactobacillus plantarum</u>	11	12,8
<u>Streptococcus lactis</u>	5	5,8
<u>Streptococcus faecium</u>	1	1,2
Total	86	100

T A B L A III.9

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUA-
JADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 1

Medio agar Rogosa

	<u>Especie</u>	<u>Nº cepas</u>
Leche	<u>Lactobacillus plantarum</u>	16
Cuadaja	<u>Lactobacillus plantarum</u>	8
Queso 1 día	<u>Lactobacillus plantarum</u>	14
Queso 30 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	21
	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>	1
Queso 60 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	17
Queso 90 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	21
Queso 120 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	21

T A B L A III.10

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUA-
JADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 2

Medio agar Rogosa

	<u>Especie</u>	<u>Nº Cepas</u>
Leche	<u>Lactobacillus plantarum</u>	18
Cuajada	<u>Lactobacillus plantarum</u>	4
Queso 1 día	<u>Lactobacillus plantarum</u>	14
	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>	1
Queso 30 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	25
Queso 60 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	18
Queso 90 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	19
	<u>Lactobacillus casei var. alactosus.</u>	2
Queso 120 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	25

T A B L A III.11

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUA-
JADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 3

Medio agar Rogosa

	<u>Especie</u>	<u>Nº Cepas</u>
Leche	<u>Lactobacillus plantarum</u>	17
Cuajada	<u>Lactobacillus plantarum</u>	20
Queso 1 día	<u>Lactobacillus plantarum</u>	18
Queso 30 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	18
Queso 60 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	18
Queso 90 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	8
Queso 120 días	<u>Lactobacillus plantarum</u>	17

T A B L A I I I . 1 2

ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUAJADA Y QUESO DE MAHON. FRECUENCIAS ABSOLUTA Y RELATIVA.

Medio agar Rogosa

Fabricación nº 1

<u>Especies identificadas</u>	<u>nº cepas</u>	<u>%</u>
<u>Lactobacillus plantarum</u>	118	99,2
<u>Lactobacillus casei var. casei</u>	1	0,8
Total	119	100

Fabricación nº 2

<u>Especies identificadas</u>	<u>nº cepas</u>	<u>%</u>
<u>Lactobacillus plantarum</u>	123	97,6
<u>Lactobacillus casei var. alactosus</u> ...	2	1,6
<u>Lactobacillus casei var. casei</u>	1	0,8
Total	126	100

Fabricación nº 3

<u>Especies identificadas</u>	<u>nº cepas</u>	<u>%</u>
<u>Lactobacillus plantarum</u>	116	100
Total	116	100

T A B L A III.13

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUA-
JADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 1

Medio agar m-Enterococcus

	<u>Especie</u>	<u>Nº Cepas</u>
Leche	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis.</u>	10
Cuajada	<u>Streptococcus faecalis var. faecalis</u>	10
Queso 1 día	<u>Streptococcus durans</u>	3
	<u>Streptococcus faecium</u>	1
Queso 30 días	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis.</u>	10
Queso 60 días	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis.</u>	6
	<u>Streptococcus durans</u>	3
	<u>Streptococcus faecium</u>	1
Queso 90 días	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis.</u>	10
Queso 120 días	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis.</u>	10

T A B L A III,14

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUA-
JADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 2

Medio agar m-Enterococcus

	<u>Especie</u>	<u>Nº Cepas</u>
Leche	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u>	9
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u> ...	1
Cuajada	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u>	10
Queso 1 día	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u>	8
Queso 30 días	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u>	10
Queso 60 días	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u>	8
	<u>Streptococcus durans</u>	2
Queso 90 días	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u>	10
Queso 120 días ...	<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u>	10

T A B L A 111.15

DISTRIBUCION DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUA-
JADA Y QUESO DE MAHON.

Fabricación nº 3

Medio agar m-Enterococcus

	<u>Especie</u>	<u>Nº Cepas</u>
Leche	<u>Streptococcus durans</u>	8
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	2
Cuajada	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	7
	<u>Streptococcus durans</u>	3
Queso 1 día ..	<u>Streptococcus durans</u>	8
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	1
Queso 30 días.	<u>Streptococcus durans</u>	10
Queso 60 días.	<u>Streptococcus durans</u>	8
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	2
Queso 90 días.	<u>Streptococcus durans</u>	9
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	1
Queso 120 días	<u>Streptococcus durans</u>	5
	<u>Streptococcus faecium</u>	3
	<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	2

T A B L A III.16

ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN LA LECHE, CUAJADA Y QUESO DE MAHON. FRECUENCIAS ABSOLUTA Y RELATIVA.

Medio agar m-Enterococcus

Fabricación nº 1

<u>Especies identificadas</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>%</u>
<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	56	87,5
<u>Streptococcus durans</u>	6	9,4
<u>Streptococcus faecium</u>	2	3,1
Total	64	100

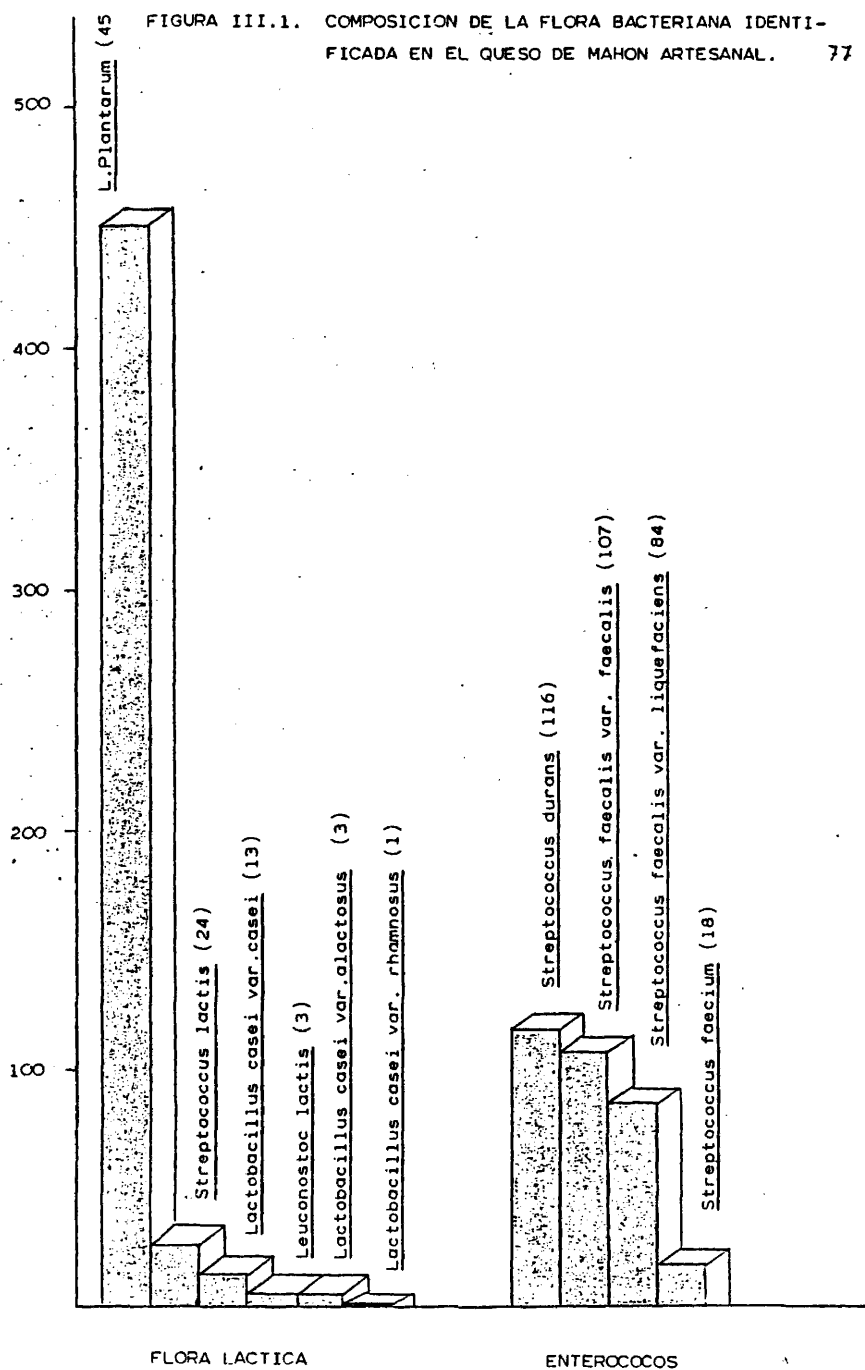
Fabricación nº 2

<u>Especies identificadas</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>%</u>
<u>Streptococcus faecalis var.liquefaciens</u> .	65	95,6
<u>Streptococcus durans</u>	2	2,9
<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	1	1,5
Total	68	100

Fabricación nº 3

<u>Especies identificadas</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>%</u>
<u>Streptococcus durans</u>	51	73,9
<u>Streptococcus faecalis var.faecalis</u>	15	21,7
<u>Streptococcus faecium</u>	3	4,4
Total	69	100

FIGURA III.1. COMPOSICION DE LA FLORA BACTERIANA IDENTIFICADA EN EL QUESO DE MAHON ARTESANAL. 77



III.3.1. FLORA LACTICA

agar Elliker

258 Cepas bacterianas han sido identificadas a partir de las colonias crecidas en este medio. Sin embargo, solamente 134 cepas, es decir, el 52%, se identificaron como bacterias lácticas. Las 124 cepas restantes (48%) presentaron características del gén. Streptococcus pertenecientes al Grupo Enterococcus (D de Lancefield).

Del conjunto de bacterias identificadas solamente el 9,3% ha correspondido al gén. Streptococcus (N de Lancefield). Aunque el medio agar Elliker suele describirse como muy favorable para el desarrollo de bacterias lácticas, y recomendado especialmente para el aislamiento de estreptococos lácticos, soporta también el crecimiento de enterococos (ORDOÑEZ y col., 1978), y micrococos (ORDOÑEZ y BURGOS 1977). La elevada tasa de especies de enterococos identificadas (48%) ponen de manifiesto la escasa selectividad de este medio.

Atendiendo a la flora láctica, la especie dominante ha sido Lactobacillus plantarum. Representa el 83,6% sobre el total de bacterias lácticas en la fabricación nº 1, el 58,7% en la fabricación nº 2, y, el 68,7% en la fabricación nº 3. Las 24 cepas del gén. Streptococcus (N de Lancefield) han presentado las características de la especie Streptococcus lactis (17,9% sobre el total de bacterias lácticas). Estas bacterias se desarrollan a 10°C

y a 40°C, crecen en presencia de ClNa al 4%, y producen amoníaco a partir de la arginina desaminándola. Por el contrario, no se desarrollan a 45°C, no producen CO₂ a partir de citrato, ni diacetilo y/o acetoína a partir de la glucosa.

Sigue en orden de dominancia la especie Lactobacillus casei con 13 cepas identificadas, lo que representa el 9,7% sobre el total de bacterias lácticas. Se ha diferenciado esta especie, de Lactobacillus plantarum, por su respuesta negativa a la formación de ácido a partir de melibiosa, arabinosa y rafinosa.

Las variedades Lactobacillus casei var. casei (productora de ácido a partir de lactosa y sacarosa), Lactobacillus casei var. rhamnosus (productora de ácido a partir de lactosa y rhamnosa), y Lactobacillus casei var. alactosus (incapaz de fermentar la lactosa) han sido detectadas en porcentajes escasos.

El resto de bacterias lácticas se identificaron como pertenecientes al gén. Leuconostoc. La única especie puesta de manifiesto ha sido Leuconostoc lactis (solamente 3 cepas, 2,2% sobre el total de gérmenes lácticos), productora de acetoína a partir de la glucosa, y, de ácido, a partir de sacarosa, manitol y lactosa. Crece a 37°C, siendo incapaz de desarrollarse a 39°C y a 45°C. Su termorresistencia durante 15' y 30' a 55°C es positiva.

agar Rogosa

361 Cepas bacterianas se identificaron a partir de las colonias que crecieron en este medio.

Todas las cepas procedentes de las tres fabricaciones de queso presentaron las siguientes características: formas bacilares, Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativas, y no productoras de gas a partir de la glucosa. Se identificaron como pertenecientes al g n. Lactobacillus. De acuerdo con su caracter homofermentativo y su crecimiento abundante a 15 C, y escaso o nulo a 45 C, se incluyeron en el grupo Streptobacterium.

De las 361 cepas, 357 (98,8%) se identificaron como Lactobacillus plantarum atendiendo a su capacidad de fermentar arabinosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, rhamnosa, sacarosa y xylosa. Esta especie es dominante en las tres fabricaciones de queso. Representa el 99,2% en la primera fabricación, el 97,6% en la segunda y el 100% en la tercera.

Las 4 cepas restantes se identificaron como Lactobacillus casei. De ellas, 2 cepas (0,6%), fermentaron lactosa y sacarosa (Lactobacillus casei var. casei), y las otras 2 fermentaron solamente la sacarosa (Lactobacillus casei var. alactosus).

De acuerdo con estos resultados, el medio agar Rogosa - aparece como fuertemente selectivo para el crecimiento de especies

del gén. Lactobacillus, si bien se ha descrito también como favorable para el crecimiento de especies de los gén. Leuconostoc y Pediococcus (SHARPE y col., 1966).

III.3.2. ENTEROCOCOS

agar m-Enterococcus

201 Cepas han sido identificadas a partir de las colonias crecidas sobre este medio. Todas las cepas ofrecieron las características siguientes: cocos, Gram positivos, catalasa negativos; crecieron bien a 10°C y a 45°C, en presencia de ClNa al 6,5%, proliferaron a pH 9,6, y redujeron el tornasol antes de coagular la leche. Se incluyeron por tanto dentro del gén. Streptococcus (Grupo D de Lancefield).

Las especies se identificaron de acuerdo con su capacidad de reducir el telurito potásico, hidrolizar la gelatina, y producir ácido a partir de sorbitol, melecitosa, manitol, arabinosa, rafinosa, glicerol y melibiosa.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio taxonómico, en la fabricación nº 1, domina la especie Streptococcus faecalis var. faecalis (87,5%), en la fabricación nº 2, Streptococcus faecalis var. liquefaciens (95,6%), y en la fabricación nº 3, Streptococcus durans (73,9%).

agar Elliker

Las cepas de enterococos identificadas a partir de las colonias que se propagaron en este medio, representaron el 48% del

total de bacterias identificadas.

El orden de dominancia de las especies halladas fué el siguiente: Streptococcus durans (46%), Streptococcus faecalis var. faecalis (28,2%), Streptococcus faecalis var. liquefaciens (15,3%) y Streptococcus faecium (10,5%).

III.4. DISCUSION

III.4.1. FLORA LACTICA

Gén. Streptococcus

De acuerdo con los resultados precedentes, todas las cepas de estreptococos lácticos han presentado las características de Streptococcus lactis. Esta bacteria, que se encuentra presente - prácticamente en todos los tipos de quesos, es la reponsable, junto con Streptococcus cremoris, del proceso de acidificación inicial (COLLINS, 1962).

El hecho de no haber aislado Streptococcus cremoris, puede parecer sorprendente, si se considera que siempre está asociado a Streptococcus lactis (PERRY 1961, DAWSON y FEAGAN 1957, ORDOÑEZ y BURGOS 1977). En el queso de Roquefort, representa esta especie el 24% de los estreptococos lácticos (DEVOYOD y MULLER 1969). No obstante, en el queso Manchego solamente fueron identificadas 3 cepas de Streptococcus cremoris (ORDOÑEZ y col., 1978), y, ninguna en el queso azul de Cabrales (NUÑEZ y MEDINA, 1979), ni en el queso Roncal (ORDOÑEZ y col., 1980).

En el estudio microbiológico de la maduración de la Mozzarella, los gérmenes lácticos, aislados en número de 20 fueron todos de la especie Streptococcus lactis (IÑIGO y ROSSI, 1957).

Debido a que el habitat natural de Streptococcus cremoris, y sus relaciones ecológicas con otras especies de estreptococos, no son bien conocidas todavía, es posible que su incidencia nula, o en tasas muy inferiores a Streptococcus lactis en estos tipos de quesos, pudiera explicar por qué es difícil su aislamiento por el método de dilución en placas (SANDINE y col., 1977).

Gén. Leuconostoc

La presencia de este género en quesos ha sido descrita desde 1952 (OVERCAST y ALBRECHT, 1952), si bien su papel en el proceso madurativo no es totalmente conocido.

Debido a su caracter heterofermentativo, pueden considerarse como microorganismos capaces de producir "pequeños ojos" en el queso Manchego (ORDOÑEZ, BARNETO y MARMOL, 1978). Otros autores opinan que son gérmenes desfavorables, ya que pueden dar lugar a la formación de compuestos de sabor amargo (FRYER, 1969).

Solamente 3 cepas han sido identificadas, en las fabricaciones 1 y 2, como pertenecientes a la especie Leuconostoc lactis. No se han puesto de manifiesto las especies Leuconostoc dextranicum, ni Leuconostoc mesenteroides, que aparecen descritas como más frecuentes en la maduración de otros tipos de quesos -Cabrales- (NUÑEZ y MEDINA, 1979).

Debido a la escasa población de leuconostocs en el interior del queso de Mahón, se presume que su interés tecnológico, en la fabricación de este queso, es despreciable.

Gén. Lactobacillus

Lactobacillus plantarum y Lactobacillus casei son las dos únicas especies de este género identificadas a lo largo de la maduración del queso. Las especies de lactobacilos mesófilos constituyen con frecuencia la flora principal en los últimos períodos madurativos de los quesos de pasta prensada no cocida, lo mismo en los procedentes de leche cruda, que en los de leche pasteurizada. Han sido estudiadas en el queso Cheddar (NAYLOR y SHARPE, 1958), en el Saint Paulin (DUCASTELLE y LENOIR, 1965), Edam (SYRJASEN, 1965), Tilsit (van KERNEN y KANDLER, 1966), Roquefort (DEVOYOD, 1970) y Grana (BATTISTOTTI y BOTTAZZI, 1972).

La presencia de Lactobacillus plantarum y Lactobacillus casei ha sido puesta de manifiesto también, como únicas especies representantes del gén. Lactobacillus, en quesos manchegos artesanales (NUÑEZ, 1976). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el estudio del queso Serra portugués (HISCOX y col., 1941), queso Cheddar (PERRY y col., 1960), queso Roquefort (DEVOYOD, 1970) y Cabrales (BURGOS y col., 1971).

Son especies muy semejantes en cuanto a poder acidificante de azúcares y polialcoholes, y, si bien, Lactobacillus casei se instala más fácilmente en el queso, que Lactobacillus plantarum, este último, si está presente en la leche, persiste normalmente en el queso hasta estadios avanzados de la maduración (SHARPE, 1961).

La dominancia casi absoluta de Lactobacillus plantarum en las tres fabricaciones estudiadas, coincide con estudios similares de SHARPE y BRIDLEY (1956), en el queso Stilton, fabricado también a partir de leche de vaca.

III.4.2. ENTEROCOCOS

Es de destacar la elevada tasa de crecimiento de estos géneros sobre agar Elliker, colonias que se pensaron lácticas en un principio debido a la presumible selectividad de este medio.

La dominancia de especies aisladas de las colonias crecidas sobre su medio específico -agar m-Enterococcus-, ha sido distinta en las tres fabricaciones estudiadas.

Del conjunto total de especies identificadas, Streptococcus faecalis var. faecalis y Streptococcus faecalis var. liquefaciens, aparecen en relación próxima a 1:1.

La predominancia de esta última variedad parece estar relacionada directamente con la calidad del queso. En el queso de Roquefort, las fabricaciones de peor calidad organoléptica, han mostrado siempre mayor porcentaje de Streptococcus faecalis var. faecalis (DEVOYOD, 1969).

ORDOÑEZ y col., (1978), encuentran que el 80% de las cepas de enterococos aisladas del queso Manchego pertenecen a Streptococcus faecalis var. faecalis, mientras que MARTINEZ MORENO (1976) encuentra Streptococcus durans en mayor proporción estudiando el mismo tipo de queso.

Estas diferencias no son de extrañar, ya que al proceder

estas bacterias de contaminaciones externas, su llegada a la leche, o al queso durante la fabricación, es totalmente fortuita.

Los enterococos han sido detectados, en muchas variedades de queso, a diferentes niveles de maduración, (EFTHMIOU y col., 1974), constatándose también, su larga permanencia durante la misma, lo que puede explicarse por sus actividades glicolíticas parecidas a las de los cocos lácticos (JENSEN y col., 1975), y, por su capacidad para resistir y desarrollarse en condiciones adversas: gran tolerancia a la temperatura, sal y acidez.

Debido a estas razones, se está prestando actualmente gran atención al papel tecnológico que pueden desempeñar los enterococos en el proceso madurativo del queso.

III.5. CONCLUSIONES

Se ha realizado el estudio taxonómico bacteriano de las cepas aisladas de la leche, cuajada y queso de Mahón durante un período madurativo de cuatro meses.

Las fabricaciones artesanales de queso estudiadas han sido tres, procedentes de puntos de distinta localización geográfica dentro de la isla de Menorca.

1ª) 820 Cepas bacterianas han sido identificadas como pertenecientes a los géneros: Streptococcus, Lactobacillus y Leuconostoc.

La investigación de especies ha ido encaminada a la detección de aquellas que juegan un importante papel en la maduración del queso, y que, por tanto, hace posible su inclusión en el desarrollo de los "starters" microbianos.

2ª) En la flora láctica identificada la diversidad de especies se reduce a cuatro distintas: Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Streptococcus lactis, y Leuconostoc lactis.

3ª) La especie dominante de bacilos lácticos ha sido Lactobacillus plantarum, que constituye la casi totalidad de la flora láctica en los últimos estadios de la maduración.

4º) Los cocos lácticos se presentan en escasos porcentajes, alcanzando Streptococcus lactis el 9,3% solamente, de la totalidad de colonias propagadas en agar Elliker, habiéndose identificado un 48% de estas colonias como pertenecientes al grupo Enterococcus.

5º) Se ha detectado una importante población de enterococos, que persiste hasta los últimos períodos de la maduración del queso.

6º) La dominancia de especies de enterococos ha sido distinta en las tres fabricaciones estudiadas, encontrándose en el conjunto de las tres fabricaciones Streptococcus faecalis var. faecalis y Streptococcus faecalis var. liquefaciens en relación próxima 1:1, y siendo Streptococcus durans la especie dominante.

92

C A P I T U L O I V

IDENTIFICACION DE ESPECIES DE LEVADURAS

IV.1. INTRODUCCION

Los estudios de levaduras en los quesos están programados en base al conocimiento de la evolución de las mismas durante la maduración, y a la identidad de las especies, como paso previo a los ensayos de su fisiología y funcionalidad. En este sentido, la flora de levaduras que aparece en los quesos de fabricación artesanal, ha sido ampliamente estudiada: Cantal (MILLET y col., 1974), Cabra (DEIANA y col., 1977), Fiore-Sardo (FATICHENTI y col., 1977), Gorgonzola (OTOGALLI y col., 1971), Gruyère y Beaufort (ACCOLA y col., 1978), Pecorino (ROSINI, 1976), y Talegio (VIZZARDI, 1975) entre otros.

FATICHENTI y col., (1979), en el estudio del queso de cabra de pasta blanda, elaboran por primera vez un "starter" mixto de bacterias lácticas termófilas y levaduras, aplicando también una nueva tecnología para la fabricación de este queso de pasta blanda y maduración breve.

En el Capítulo II se estudió la evolución numérica de la flora de levaduras en el interior del queso de Mahón, y a pesar de la relativa importancia numérica que presentan en este queso, resulta evidente que el siguiente paso es precisar la identidad de las especies que integran esta microflora espontánea de levaduras.

IV.2. MATERIALES, METODOS Y TECNICAS

IV.2.1. IDENTIFICACION DE ESPECIES

Se han utilizado las técnicas de la Escuela Holandesa de Kluyver en Delft, y de la Escuela de Microbiología Enológica de - Perugia.

Los principales caracteres investigados han sido los siguientes:

- Exámen microscópico
- Exámen de las formaciones pseudomiceliales
- Formación de esporas
- Asimilación de nitratos
- Fermentación de azúcares
- Asimilación de azúcares
- Escisión de arbutina
- Poder fermentativo
- Formación de velo
- Reacción de litmus-milk

Esta última prueba se ha realizado sólo para levaduras del género Cándida.

El procedimiento sistemático se acomoda a los propuestos por LODDER y KREGER VAN RIJ (1967), y LODDER (1970). En casos determinados se ha recurrido al sistema de clasificación de BARNETT y PANKHURST (1974).

IV.2.1.1. EXAMEN MICROSCOPICO

Se realiza sobre los cultivos de levaduras sembrados en agar malta, y en mosto de uva estéril de 10⁰Bé.

La observación en agar malta se hace tomando la muestra con aguja estéril y colocándola en un porta, sobre una gota de agua también estéril; se emplea microscopio de contraste de fase, anotando forma, tamaño y tipo de gemación.

La observación de levaduras en mosto de uva estéril, se lleva a cabo a los 3 días de la siembra, observando los mismos caracteres morfológicos.

IV.2.1.2. EXAMEN DE LAS FORMACIONES SEUDOMICELIARES

La capacidad de formar o no pseudomicelio es un carácter taxonómico importante para distinguir entre determinadas especies.

Las ramificaciones pseudomiceliales provienen de gemación; las células hijas forman agregados, y aunque entre ellas no aparecen septos definidos, sí se perciben constricciones más o menos profundas. Es característico el hecho de que la célula terminal sea de igual tamaño o más corta que el resto.

El método empleado para su observación es el siguiente:

En el fondo de una placa Petri se coloca papel absorbente y un tubo de vidrio acodado sobre el que depositamos un porta. Después de esterilizarlo en estufa a 140°C durante 3 horas, aplicamos, trabajando en condiciones asépticas, unas gotas de agar malta sobre el porta.

La siembra se hace en estría una vez que el medio ha solidificado. Los posibles ramificaciones se observan al microscopio a los 15 y 30 días de efectuada la siembra.

El papel absorbente es necesario mantenerlo húmedo durante todo el período de incubación.

IV.2.1.3. FORMACION DE ESPORAS

La esporulación de las cepas se intenta provocar, cultivándolas primeramente sobre un medio rico en glucosa, y cambiándolas, tras un período de dos días, a otro medio de cultivo pobre en glucosa y que contiene acetato potásico. La composición en ambos medios es la siguiente:

Medio "1"

Extracto de levadura	8 g.
Peptona	3 g.
Glucosa	100 g.

Agar	20 g.
Agua destilada	100 ml.

Medio "2"

Extracto de levadura	1 g.
Glucosa	0,5g.
Acetato potásico	10 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

En el medio "1" se mantienen las cepas durante 2 días a 28°C. Seguidamente se siembran, estas cepas a exámen, en el medio "2" de cultivo, en el que se mantienen por espacio de 5 días a 25°C.

Pasado el período de incubación en el medio "2", se hace una preparación en fresco y se observa al microscopio. En los casos poco claros, se ha practicado una tinción de esporas con verde de malaquita.

Después de la observación microscópica, se anota la forma celular, número de ascosporas producida en cada asca y las formas de las mismas.

IV.2.1.4. ASIMILACION DE NITRATOS

Para la realización de esta prueba es necesario preparar dos medios diferentes, uno con nitrato potásico y el otro carente de él. La composición de estos medios es la siguiente:

Medio "1"

Yeast Carbon Base	11,7 g.
Nitrato potásico	0,78 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

Medio "2"

Yeast Carbon Base	11,7 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

Una vez preparados los medios, (distribuidos a razón de 5 ml. por tubo de ensayo), esterilizados en autoclave a una atmósfera de presión durante 15 minutos, e inclinados los tubos para obtener una mayor relación superficie/volumen, se prepara también una solución de suero fisiológico al 0,85%, repartiéndola en tubos de ensayo a razón de 10 ml. por tubo.

En el suero, previamente esterilizado a una atmósfera de

presión durante 15 minutos, se siembra el cultivo joven, agitando seguidamente el tubo, con el fin de que la distribución celular sea homogénea. Inmediatamente después, vertemos el suero inoculado en los tubos de ensayo que contienen los medios, con y sin nitrato potásico, tirando seguidamente el sobrenadante.

La incubación se realiza durante 15 días a 28°C. Cumplido este tiempo, se comparan los cultivos pertenecientes al mismo microorganismo, y se observa si la presencia de nitratos ha facilitado o no el crecimiento de las colonias.

En el caso de que el crecimiento sea mayor en el medio que contiene nitrato, que en el que carece de él, se considera positivo el desarrollo de la prueba.

IV.2.1.5. FERMENTACION DE AZUCARES

Esta prueba se realiza a partir de un cultivo joven de 48 horas, en un medio líquido cuya composición es:

Yeast Nitrógeno Base	0,67	g.
Azúcar a examen	2,00	g.
Agua destilada	100	ml.

Este medio se deposita en tubos de ensayo con campana Durham a razón de 8 ml. por tubo, y se somete a esterilización

en autoclave a una atmósfera de presión durante 20 minutos.

La campana recogerá el gas en el caso de que el azúcar en cuestión sea fermentado por la especie con la cual se trabaja. La incubación se prolonga, a partir del momento de la siembra, por un período de 15 días para anotar las fermentaciones tardías que puedan producirse.

En el caso de la rafinosa, el tiempo de incubación a 28°C es de 20 días, transcurridos los cuales se realiza una cromatografía de papel para los medios en los que el agente fermentativo ha resultado positivo.

La rafinosa está formada por tres azúcares:

Fructosa-Glucosa-Galactosa, teniendo en cuenta que:

Fructosa-Glucosa = Sacarosa

Glucosa-Galactosa = Melibiosa

Si es melibiosa el compuesto que queda en el medio, la fermentación ha sido 1/3 igual, que si queda sacarosa libre.

En cambio, el hecho de que quede galactosa libre nos indica que la fermentación ha sido 2/3.

Es también posible que no quede resto de ningún azúcar libre en el medio, lo cual indica que la rafinosa ha sido totalmente

fermentada: Fermentación 3/3.

La cromatografía de papel se realiza sobre papel Whatman nº 1. Mediante una micropipeta se hacen tres aplicaciones sucesivas de cada uno de los cultivos fermentados en rafinosa. En cada aplicación hay que esperar a que la mancha anterior esté completamente seca.

Sobre el mismo papel, y de igual forma, se hacen otras aplicaciones de soluciones de azúcares que pudieran aparecer como resultado de la fermentación de la rafinosa, y solución de rafinosa misma. Estos azúcares son: Sacarosa, melibiosa, galactosa y fructosa. Se utilizan como patrones.

Usando el mismo eluyente n-butanol:piridina:agua (6:4:3), se satura el papel y se deja en una cubeta durante 12 horas. Una vez fuera de la cubeta y completamente seco, se pulveriza el revelador-fijador (p-anisidina clorhídrica solución) sobre el papel. A continuación se introduce en la estufa hasta la aparición de las manchas indicadoras.

IV.2.1.6. ESCISION DE ARBUTINA

Se procede a la realización de esta prueba como medio de confirmar la actuación o no del enzima β -glucosidasa en las cepas a exámen.

El medio utilizado tiene la siguiente composición:

Arbutina	0,5 g.
Yeast extract	0,1 g.
Agar	2,0 g.
Agua destilada	100 ml.

Una vez preparado se deposita en tubos de ensayo a razón de 5 ml. por tubo, se esteriliza a una atmósfera de presión durante 20 minutos; anteriormente se ha depositado una gota de sal férrica soluble por tubo, que reaccionará con la quinona libre, procedente de la hidrólisis de la arbutina -(hidroquinona- β -D-glucopiranosido)- dando lugar a la aparición de un color oscuro si actúa el enzima, o quedando en su coloración original si no es así.

La siembra se realiza en estría a partir de un cultivo -joven de 48 horas, incubando los tubos sembrados a continuación a 28°C. A los 15 días se compara la tonalidad del medio con la de un tubo que se conserva con medio estéril como patrón.

IV.2.1.7. ASIMILACION DE AZUCARES

La prueba de asimilación de azúcares se realiza solamente para las cepas que no han fermentado alguno de ellos. Se trata de conocer las cepas que son capaces de metabolizarlos por vía oxidativa.

Los tubos de ensayo que se utilizan han sido esterilizados previamente en estufa a la temperatura de 180°C durante 2 horas.

El medio de cultivo está compuesto por:

Yeast Nitrogen Base	6,7 h.
Azúcar a examen	10,0 g.
Agar	20,0 g.
Agua destilada	1000 ml.

En cada uno de los tubos se depositan 10 ml. del medio ya homogeneizado, sometiéndolos a esterilización en autoclave (una atmósfera/20 minutos). A continuación se dejan enfriar hasta que solidifique el medio, quedando éste inclinado y dispuesto para la siembra.

Por otra parte, se dispone de tantos tubos de ensayo, conteniendo 10 ml. de agua estéril, como cepas se van a someter a exámen.

La siembra se realiza partiendo de un cultivo de 48 horas en los tubos conteniendo el agua estéril. Tras la agitación de éstos, vertemos su contenido en el medio de asimilación, eliminando a continuación el sobrenadante.

Transcurridos 15 días de incubación a 28°C, se observa el crecimiento de las colonias si la asimilación del azúcar problema es positiva.

Esta misma prueba puede realizarse por el método auxonográfico, consistente en verter en placas Petri estériles, una suspensión de la cepa en cuestión, junto con 20 ml. del mismo medio fluidificado, agitando rotativamente de forma que el reparto de colonias resulte lo más homogéneo posible.

Una vez solidificado el medio, se colocan sobre él discos de papel absorbente -"Scheleicher & Schull"- impregnados en soluciones estériles de los azúcares al 2%.

Las placas se mantienen en estufa a 28°C, y a los 4 días se observa si se han producido halos de crecimiento alrededor de algunos de los discos de papel impregnados en los azúcares a investigar.

IV.2.1.8. PODER FERMENTATIVO

El poder fermentativo es la medida del porcentaje (v/v) de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir.

Para la realización de esta prueba se dispone de matraces de 100 ml., que se tapan con algodón cardado y se esterilizan a 180°C durante 2 horas.

A partir de mosto concentrado de uva, se prepara mosto de 12° Bé, y se distribuyen 50 ml. de éste en cada matraz, esterili-

zándolos a continuación durante 20 minutos a una atmósfera de presión.

Las cepas a exámen se han sembrado previamente en agar - malta, y a partir de este cultivo se lleva a cabo la siembra en los matraces que contienen el mosto estéril. Tras la inoculación, se sustituye el tapón de algodón cardado por una válvula con ácido sulfúrico concentrado, que evita la entrada de oxígeno y permite la salida de CO_2 , así como la fijación de otros productos de la fermentación.

Terminadas las siembras, se pesa cada matraz, operación - que se repite cada 3 días, para de este modo, poder medir por diferencia de peso, el anhídrido carbónico formado, hasta que se alcance un peso constante.

Calculando la diferencia entre la primera pesada y la última, y multiplicando esta diferencia por el factor 2,6, se obtiene un producto que es igual al poder fermentativo expresado en % de alcohol en volumen.

El cálculo de este factor se realiza a través de los siguientes pasos:

180 g. de glucosa al fermentar producen 88 g. de CO_2 más 92 g. de etanol; por tanto a 1 g. de CO_2 le corresponden 1,04 g. de etanol.

Siendo la densidad del etanol 0,79 a los 1,04 g. le corresponde un volumen de 1,3 ml. de etanol.

La diferencia de peso en gramos, multiplicada por 1,3 dará el volumen de etanol producido.

V ml. de mosto 1,3 x P ml. de etanol
100 ml. de mosto x ml.

y siendo en este caso $V = 50$ ml., $x = 1,3 \times 100 \times P/50 = 2,6 \times P$

En la práctica, se multiplica por 2,5 dado que existe una contracción de volumen, al mezclarse el etanol que se produce con el medio acuoso.

IV.2.1.9 FORMACION DE VELO

Se parte de mosto concentrado de uva, con el cual, se prepara mosto diluido de 8° Bé, ajustando el pH a 5. Se entuba a razón de 10 ml. por tubo, y se esteriliza a una atmósfera de presión durante 15 minutos.

La siembra se realiza a partir de un cultivo joven de 48 horas, manteniendo los tubos sembrados durante un mes a 28°C.

La primera observación se lleva a cabo a los 2 días de la siembra, anotando la posible aparición de:

Presencia de velo con el signo V

Presencia de anillo con el signo A

Ausencia de velo con el signo -

El signo S se reserva para los casos en que se aprecie sedimentación de la cepa en el mosto.

IV.2.1.10 REACCION DE LITMUS-MILK

Se ha investigado esta propiedad solamente en levaduras del género Cándida.

Una vez preparado el medio, se distribuye en tubos de ensayo a razón de 10 ml. por tubo, esterilizándolos a 100°C durante 3 días consecutivos. Posteriormente se inoculan e incuban a 25°C de 1 a 4 semanas.

Solamente en determinados casos ocurren cambios específicos en este medio -(cambios de color, coagulación, peptonización, etc.)- muy útiles como carácter taxonómico para la determinación de especies, principalmente Cándida lipolytica.

La nomenclatura utilizada en la clasificación de levaduras ha sido la misma que la descrita en III.2.3.1., para la taxonomía bacteriana.

IV.3. RESULTADOS

Los resultados de los test ensayados, para poner de manifiesto las distintas especies de levaduras que intervienen a lo largo del proceso madurativo del queso de Mahón, aparecen en las Tablas IV.1, IV.2, IV.3, IV.4, IV.5, y IV.6.

De acuerdo con estos resultados han sido identificadas las siguientes especies:

- Candida rugosa (ANDERSON) DIDDENS y LODDER
- Trichosporon capitatum DIDDENS y LODDER
- Saccharomyces itálicus CASTELLI
- Saccharomyces delbrueckii LINDNER
- Torulopsis sphaerica, forma imperfecta de Saccharomyces (Kluuyveromyces) lactis (DOMBROWSKY) VAN DER WALT
- Torulopsis inconspicua LODDER y KREGER VAN RIJ
- Rhodotórula rubra (DEMME) LODDER
- Candida lipolytica (HARRISON) DIDDENS y LODDER
- Debaryomyces hansenii (ZOPF) LODDER y KREGER VAN RIJ

TABLA IV.1. RESPUESTAS FRENTE A LAS PRUEBAS TAXONOMICAS QUE SE
EXPRESAN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS PERTENECIENTE AL
GENERO CANDIDA

<u>Nº de Cepas</u>	<u>45</u>	<u>4</u>
Formación de pseudomicelio	+	+
Formación de Esporas	-	-
Asimilación de nitratos	-	-
Fermentación de:		
- glucosa	-	-
- galactosa	-	-
- maltosa	-	-
- sacarosa	-	-
- lactosa	-	-
- rafinosa	-	-
Asimilación de:		
- glucosa	+	+
- galactosa	+	-
- maltosa	-	-
- sacarosa	-	-
- lactosa	-	-
Escisión de arbutina	-	+
Poder fermentativo	O	O
Formación de velo	V-A	S
Reacción de litmus-milk	Cambio coloración(azul) Peptonización	
Diagnóstico:	<u>Candida rugosa</u>	<u>Candida lipolytic</u>

TABLA IV.2. RESPUESTAS FRENTE A LAS PRUEBAS TAXONOMICAS QUE SE
EXPRESAN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS PERTENECIENTES AL
GENERO TRICHOSPORON

<u>Nº de Cepas</u>	<u>27</u>
Formación de pseudomicelio	+
Formación de esporas	-
Asimilación de nitratos	-
Fermentación de:	
- glucosa	-
- galactosa	-
- maltosa	-
- sacarosa	-
- lactosa	-
- rafinosa	-
Asimilación de:	
- glucosa	+
- galactosa	+
- maltosa	-
- sacarosa	-
- lactosa	-
Escisión de arbutina	-
Poder fermentativo (% de alcohol en volumen)	0
Formación de velo	V-A

Diagnóstico: Trichosporon capitatum

TABLA IV.3. RESPUESTAS FRENTE A LAS PRUEBAS TAXONOMICAS QUE SE
EXPRESAN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS PERTENECIENTES AL
GENERO SACCHAROMYCES

<u>Nº de Cepas</u>	<u>19</u>	<u>15</u>
Formación de pseudomicelio	-	-
Formación de esporas	+ (1-2)	+ (1-4)
Asimilación de nitratos	-	-
Fermentación de:		
- glucosa	+	+
- galactosa	+	+
- maltosa	-	+ (3 [±])
- sacarosa	-	+
- lactosa	-	-
- rafinosa	-	-
Asimilación de:		
- glucosa	+	+
- galactosa	+	+
- maltosa	-	+
- sacarosa	-	+
- lactosa	-	-
Escisión de arbutino	-	-
Poder fermentativo (% de alcohol en volumen)	mínimo: 9,6(M-2-C-3) máximo: 11,2(M-3-Q-6)	mínimo: 11,2 (M-3-Q-1) máximo: 12,8 (M-3-Q-2)
Formación de velo	A	A
Diagnóstico:	<u>Saccharomyces delbrueckii</u>	<u>Saccharomyces</u> <u>itálicus</u>



TABLA IV.4. RESPUESTAS FRENTE A LAS PRUEBAS TAXONOMICAS QUE SE EXPRESAN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS PERTENECIENTE AL GENERO TORULOPSIS

<u>Nº de Cepas</u>	<u>13</u>	<u>10</u>
Formación de pseudomicelio	-	-
Formación de esporas	-	-
Asimilación de nitratos	-	-
Fermentación de:		
- glucosa	-	+
- galactosa	-	+
- maltosa	-	+
- sacarosa	-	+
- lactosa	-	+
- rafinosa	-	1/3
Asimilación de:		
- glucosa	+	+
- galactosa	-	+
- maltosa	-	+
- sacarosa	-	+
- lactosa	-	+
Escisión de arbutina	-	+
Poder fermentativo (% de alcohol en volumen)	0	mínimo: 6,2 (M-3-L-3) máximo: 7,5 (M-3-Q-7)
Formación de velo	S	V.S.
Diagnóstico:	<u>Torulopsis</u> <u>inconspicua</u>	<u>Torulopsis</u> <u>sphaerica</u>

TABLA IV.5. RESPUESTAS FRENTE A LAS PRUEBAS TAXONOMICAS QUE SE
EXPRESAN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS PERTENECIENTES AL
GENERO RHODOTORULA

<u>Nº de Cepas</u>	<u>5</u>
Formación de pseudomicelio	-
Formación de esporas	-
Asimilación de nitratos	-
Fermentación de:	
- glucosa	-
- galactosa	-
- maltosa	-
- sacarosa	-
- lactosa	-
- rafinosa	-
Asimilación de:	
- glucosa	+
- galactosa	+
- maltosa	+
- sacarosa	+
- lactosa	-
Escisión de arbutina	+
Poder fermentativo	O
Formación de velo	A.S.
Diagnóstico:	<u>Rhodotórula rubra</u>

TABLA IV.6. RESPUESTAS FRENTE A LAS PRUEBAS TAXONOMICAS QUE SE
EXPRESAN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS PERTENECIENTES AL
GENERO DEBARYOMYCES

<u>Nº de Cepas</u>	<u>2</u>
Formación de pseudomicelio	-
Formación de esporas	+ (1)
Asimilación de nitratos	-
Fermentación de:	
- glucosa	-
- galactosa	-
- maltosa	-
- sacarosa	-
- lactosa	-
- rafinosa	-
Asimilación de:	
- glucosa	+
- galactosa	+
- maltosa	+
- sacarosa	+
- lactosa	+
Escisión de arbutina	-
Poder fermentativo	O
Formación de velo	V.S.
Diagnóstico:	<u>Debaryomyces hansenii</u>

Los resultados de la identificación de especies de levaduras aisladas de la leche figuran en la Tabla IV.7; los resultados de la identificación de levaduras de la cuajada, en la Tabla IV.8, y los resultados de la identificación de especies en los aislamientos efectuados a partir de las muestras de queso aparecen descritos en la Tabla IV.9.

La Tabla IV.10 corresponde a la distribución de especies en las tres fabricaciones de queso estudiadas.

A modo de resumen, la Tabla IV.11 recoge las especies de levaduras presentes en el queso de Mahón y sus porcentajes sobre el total de especies identificadas.

En el lote o fabricación nº 1 son especies dominantes - Trichosporon capitatum (54%), y Cándida rugosa (32%).

En la fabricación nº 2, Cándida rugosa (60%) y Saccharomyces delbrueckii (20%), y en la fabricación nº 3, Saccharomyces itálicus (33,3%), Torulopsis sphaerica (22,2%), y Torulopsis inconspicua (22,2%). En este último lote aparece la mayor diversidad de especies.

TABLA IV.7. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DE LEVADURAS AISLADAS DE LAS TRES MUESTRAS DE LECHE.

<u>Especies identificadas</u>	<u>Fab. nº 1</u>	<u>Fab. nº 2</u>	<u>Fab. nº 3</u>
<u>Trichosporon capitatum</u>	7	-	-
<u>Cándida rugosa</u>	1	1	2
<u>Rhodotórula rubra</u>	-	5	-
<u>Cándida lipolytica</u>	-	4	-
<u>Torulopsis sphaerica</u>	-	-	2
<u>Torulopsis inconspicua</u>	1	-	1
<u>Saccharomyces itálicus</u>	-	-	-
<u>Saccharomyces delbrueckii</u>	-	-	-
<u>Debaryomyces hansenii</u>	-	-	-

TABLA IV.8. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DE LEVADURAS AISLADAS DE LAS TRES MUESTRAS DE CUAJADA.

<u>Especies identificadas</u>	<u>Fab. nº 1</u>	<u>Fab. nº 2</u>	<u>Fab. nº 3</u>
<u>Trichosporon capitatum</u>	5	-	-
<u>Cándida rugosa</u>	5	7	-
<u>Rhodotórula rubra</u>	-	-	-
<u>Cándida lipolytica</u>	-	-	-
<u>Torulopsis sphaerica</u>	-	-	2
<u>Torulopsis inconspicua</u>	-	-	3
<u>Saccharomyces itálicus</u>	-	-	5
<u>Saccharomyces delbrueckii</u>	-	3	-
<u>Debaryomyces hansenii</u>	-	-	-

TABLA IV.9. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION DE ESPECIES AISLADAS DE LAS MUESTRAS DE QUESO DE MAHON ARTESANAL

<u>Especies identificadas</u>	<u>Fab. nº 1</u>	<u>Fab. nº 2</u>	<u>Fab. nº 3</u>
<u>Trichosporon capitatum</u>	15	-	-
<u>Cándida rugosa</u>	10	19	-
<u>Rhodotórula rubra</u>	-	-	-
<u>Cándida lipolytica</u>	-	-	-
<u>Torulopsis sphaerica</u>	-	-	6
<u>Torulopsis inconspicua</u>	2	-	6
<u>Saccharomyces itálicus</u>	-	-	10
<u>Saccharomyces delbrueckii</u>	4	6	6
<u>Debaryomyces hansenii</u>	-	-	2

TABLA IV.10 DISTRIBUCION DE LAS ESPECIES DE LEVADURAS IDENTIFICADAS EN LAS TRES FABRICACIONES DE QUESO DE MAHON ARTESANAL.

	Nº de Cepas	<u>Trichosporon capitatum</u>	<u>Cándida rugosa</u>	<u>Rhodotórula rubra</u>	<u>Cándida lipolytica</u>	<u>Torulopsis sphaerica</u>	<u>Torulopsis inconspicua</u>	<u>Saccharomyces italicus</u>	<u>Saccharomyces delbrueckii</u>	<u>Debaryomyces hansenii</u>
<u>Fab. nº 1</u>										
Leche	9	7	1	-	-	-	1	-	-	-
Cuajada	10	5	5	-	-	-	-	-	-	-
Queso	31	15	10	-	-	-	2	-	4	-
<u>Fab. nº 2</u>										
Leche	10	-	1	5	4	-	-	-	-	-
Cuajada	10	-	7	-	-	-	-	-	3	-
Queso	25	-	19	-	-	-	-	-	6	-
<u>Fab. nº 3</u>										
Leche	5	-	2	-	-	2	1	-	-	-
Cuajada	10	-	-	-	-	2	3	5	-	-
Queso	30	-	-	-	-	6	6	10	6	2
TOTALES	140	27	45	5	4	10	13	15	19	2

TABLA IV.11. ESPECIES DE LEVADURAS IDENTIFICADAS EN EL QUESO DE MAHON ARTESANAL. FRECUENCIAS ABSOLUTA Y RELATIVA.

<u>Especies identificadas</u>	<u>Nº de Cepas</u>	<u>% sobre el total</u>
<u>Cándida rugosa</u>	45	32,1
<u>Trichosporon capitatum</u>	27	19,3
<u>Saccharomyces delbrueckii</u>	19	13,6
<u>Saccharomyces itálicus</u>	15	10,7
<u>Torulopsis inconspicua</u>	13	9,3
<u>Torulopsis sphaerica</u>	10	7,1
<u>Rhodotórula rubra</u>	5	3,6
<u>Cándida lipolytica</u>	4	2,8
<u>Debaryomyces hansenii</u>	2	1,4

IV.4. DISCUSION

Las especies identificadas en este estudio taxonómico demuestran que la flora de levaduras del queso de Mahón artesanal es variable según las fabricaciones. Estas especies también se han identificado en pruebas de clasificación análogas efectuadas en otros tipos de quesos estudiados con anterioridad: Camembert, Robiola, Limburgo, Roquefort, Talegio, etc. (GRIPON, 1978).

Se aprecia, en conjunto, un claro predominio de cepas no esporuladas sobre cepas ascosporógenas, siendo las de mayor frecuencia Cándida rugosa y Trichosporon capitatum. La primera, fué aislada por primera vez de mantequillas y margarinas por PETTE (1946). La segunda, fué identificada con anterioridad por CAPRIOTTI (1957), como especie dominante en un complejo estudio sobre la maduración del queso Limburgo fabricado en Holanda. Ambas especies mayoritarias, son de poder fermentativo nulo e incapaces de asimilar la lactosa, por lo que no deben contribuir a la desaparición de este azúcar del queso en los primeros días, al menos de forma directa.

Del conjunto de las nueve especies distintas clasificadas, solamente dos -Cándida rugosa y Saccharomyces delbrueckii- aparecen en las tres fabricaciones estudiadas; mientras que especies que fermenten la lactosa, solamente ha sido identificada una -Torulopsis sphaerica- y en una sola fabricación. De ello se dedu-

ce que la producción de CO₂ por fermentación queda muy reducida en las levaduras.

También es de destacar que en la fabricación nº 2 se han identificado especies en la leche -Rhodotórula rubra y Cándida lipolytica- que posteriormente no han sido detectadas ni en la cuajada ni en el queso, lo que puede ser debido al azar en el aislamiento de colonias, o bien a la disminución del pH como consecuencia de la progresiva acidificación.

Las especies de levaduras esporuladas identificadas han sido solamente tres -Saccharomyces delbrueckii, Saccharomyces italicus y Debaryomyces hansenii- . Las dos primeras son levaduras habituales en los mostos de uva, donde aparecen descritas en trabajos de microbiología enológica, con mayor frecuencia que en los quesos, como se hace patente en los estudios de los agentes de fermentación de mostos de uva españoles con Denominación de Origen (IÑIGO y col., 1960, 1964).

La especie que aparece con menor frecuencia relativa ha sido Debaryomyces hansenii; esta especie ha sido ensayada por FATI-CHEMTE y col., (1979) como integrante de un "fermento" mixto de bacterias lácticas y levaduras, usado en la fabricación industrial del queso de cabra italiano. De los ensayos realizados, el "starter" seleccionado fué aquél que contenía mayor proporción de ésta levadura, obteniéndose un queso más tierno, pastoso y de gran un-

tuosidad, con sabor ligeramente ácido y aroma delicado.

Refiriéndonos a los resultados globales obtenidos, es preciso señalar que la flora de levaduras del interior del queso de Mahón parece estar constituida mayoritariamente por especies no esporuladas, a las que pertenecen los géneros Cándida, Trichosporon, Torulopsis y Rhodotórula- todas ellas más resistentes a la sal que los Saccharomyces, mientras que especies esporuladas o ascospóroenas solamente se detectan los géneros Saccharomyces y Debaryomyces.

IV.5. CONCLUSIONES

La naturaleza de la flora blastomicética del queso de Mahón ha sido estudiada a partir de muestras tomadas en tres fabricaciones artesanales, hechas con leche cruda de distinta procedencia, dentro de la isla de Menorca.

140 Cepas de levaduras han sido identificadas después de su aislamiento de leche, cuajada y queso durante cuatro meses de maduración, deduciéndose de este estudio las siguientes consideraciones:

1ª) De acuerdo con los criterios taxonómicos de LODDER (1967, 1970), esta flora está formada por especies de los géneros:

Cándida

Trichosporon

Saccharomyces

Torulopsis

Debaryomyces

Rhodotórula

2ª) La diversidad de especies se reduce a nueve, siendo distintas las especies que dominan en las muestras examinadas de cada fabricación.

3º) De las 140 cepas clasificadas, 96 son de poder fermentativo nulo, lo cual representa un 68,5% del total de cepas, - frente a un 31,5% de cepas fermentadoras. De poder fermentativo alto se han identificado dos especies -Saccharomyces itálicus y Saccharomyces delbrueckii- y, solamente una de poder fermentativo medio -Torulopsis sphaerica-. De estas especies, solamente la - última fermenta la lactosa, representando la única especie adaptada a sustratos lácteos; las dos primeras más bien pueden considerarse como huéspedes ocasionales.

4º) En el conjunto de cepas identificadas, se aprecia un predominio notable de las no esporuladas (74,3%), sobre las esporuladas (25,7%), incluso en las especies que fermentan la lactosa -formadas exclusivamente por estirpes de la levadura no esporulada Torulopsis sphaerica- lo que sugiere un estadio evolutivo algo retrasado del grupo de las fermentativas.

5º) Considerando el aspecto ecológico del conjunto de las especies, se observa una dominancia de levaduras aerobias sobre - anaerobias, y de no esporuladas sobre ascosporógenas, lo que corrobora -por la situación geográfica y caracteres climáticos de la isla- los resultados de la identificación de levaduras en otros sustratos fermentativos como el mosto de uva.

126

C A P I T U L O V

SELECCION DE CEPAS BACTERIANAS EN BASE A

SUS CARACTERISTICAS DE INTERES TECNOLOGICO

V.1. INTRODUCCION

Las bacterias lácticas más usadas en la industria láctea pertenecen a los géneros Streptococcus y Lactobacillus. Las especies del primero -en particular, Streptococcus lactis y Streptococcus cremoris- contribuyen, gracias a la acidificación láctica que producen, a incrementar la acción del cuajo, de forma que la coagulación mixta que se produce, constituye la base de fabricación de numerosos tipos de quesos.

La actividad acidificante de estas especies, transformando la lactosa principalmente en ácido láctico, ayuda además, a evitar la putrefacción de la cuajada.

En el estudio de los quesos tipo Manchego, NUÑEZ y col., (1979) observan que las cepas de Streptococcus lactis con poder acidificante superior al 0,25% resultan idóneas para los fermentos, asegurando una correcta acidificación de la pasta, a la vez que favorecen el desuerado y evitan la proliferación de coliformes.

Mientras que los estreptococos lácticos suelen constituir la flora dominante en la cuajada, y en el comienzo de la maduración de los quesos, los lactobacilos participan más tardíamente en la misma, desarrollando actividades proteolíticas y lipolíticas, e interviniendo, a veces, en el desarrollo de los aromas.

Son varios los estudios, en particular los de POZNANSKI y RYMASZEWSKI (1965), TOKITA y HOSONO (1968), CREAMER (1970) DO NGOC y col., (1971), WECKX y VAN DER POORTEN (1973), GRIPON y col., - (1975), etc., que se han dedicado a poner de manifiesto la degradación de proteínas durante la maduración de los quesos, y a la descripción de los procesos químicos que acontecen durante la proteólisis.

Sin embargo, son más escasos los trabajos en que se describe el papel ejercido por cada especie microbiana, y particularmente por sus enzimas, destacando los de MABBIT y col., (1959), REITER y col., (1967), OHMIYA y SATO (1970), y GREEN y FOSTER (1974) entre otros.

Investigaciones llevadas a cabo por MILLER y KANDLER (1967) con cultivos puros de estreptococos y lactobacilos, demuestran que con los primeros se obtiene un incremento del N no proteico comprendido entre el 1% y el 2%, en tanto que el obtenido con los lactobacilos es del 4 ó 5%.

RAPP (1969) estudia distintas especies de lactobacilos, observando que la hidrólisis más acusada de la caseína está a cargo de Lactobacillus acidophilus, seguido de Lactobacillus bulgáricus, Lactobacillus helvéticos y Lactobacillus casei.

KOSIKOWSKI (1978), cita estas tres últimas especies como responsables de los caracteres de acidez y sabor, no solo del yo-

gur, kefir y koumis, sino también de algunos quesos italianos y del queso Emmental.

SHARPE (1979), cita a Lactobacillus casei como una de las bacterias más frecuentes de los starters mesófilos que emplea actualmente la industria láctea.

DUCASTELLE y LENOIR (1969), en el estudio microbiano del queso tipo Saint-Paulin, determinan como especie dominante de lactobacilos -Lactobacillus plantarum- seleccionando cepas con alto poder proteolítico, y recomendándolas, debido también a su carácter filante, para la fabricación industrial de este tipo de queso.

De todo lo anteriormente expuesto, y del estudio de la microflora de los quesos artesanales, se deduce, que cada vez es mayor el número de cepas bacterianas seleccionadas por sus características de interés tecnológico. Asimismo, la práctica casi generalizada actualmente, de usar "starters" idénticos para fabricar variedades de queso distintas, está siendo desplazada en el sentido de utilizar cepas autóctonas que desarrollen los caracteres genuinos de las variedades artesanales.

El objetivo de este Capítulo se centra en la selección de cepas de estreptococos lácticos, lactobacilos y enterococos, en base a la actividad acidificante de los primeros, y a otro tipo de actividades enzimáticas de los últimos.

V.2. MATERIALES, METODOS Y TECNICAS

V.2.1. ACTIVIDAD ACIDIFICANTE DE ESTREPTOCOCOS LACTICOS

Se han ensayado las 24 cepas de Streptococcus lactis procedentes de las tres fabricaciones estudiadas de queso de Mahón artesanal.

A la fabricación nº 1, corresponden 7 cepas, 12 cepas a la fabricación nº 2, y las 5 cepas restantes a la fabricación nº 3.

Para determinar el poder acidificante de cada cepa, se ha operado de la siguiente forma:

En matraces de 250 ml. se depositan 100 ml. de leche descremada estéril Skinmilk (Difco), esterilizando a continuación los mismos durante 15 min. a 1 atmósfera de presión. Una vez enfriados los matraces a 30°C, se siembra cada uno con un cultivo joven de 24 horas de las cepas cuyo poder acidificante se quiere determinar. Esta siembra se realiza al 2%, es decir, 2 ml. de cultivo por matraz. La incubación se realiza a 32°C.; y periódicamente, a las 16,18,20 y 22 horas de incubación se extraen 10 ml. de cada matraz, determinando la acidez total producida, mediante valoración con hidróxido sódico 0,1 N, y como indicador solución de fenolftaleína al 2% en alcohol.

La acidez total se ha expresado en grados Dornic.

V.2.2. ACTIVIDAD CASEOLITICA DE LACTOBACILOS Y ENTEROCOCOS

Para obtener una información cuantitativa de la actividad caseolítica de los lactobacilos y enterococos, presentes en el queso de Mahón artesanal, e identificados en el Capítulo III, se ha seguido la siguiente técnica de difusión:

Se utilizan placas de Petri estériles de 90 mm. de diámetro, conteniendo cada una 10 ml. de leche descremada estéril Skin-Milk (Difco), y 10 ml. de una solución estéril de agar al 3% en agua destilada.

Para aplicar la muestra se extrajo con taladrataponos, del centro de la placa, un círculo de 10 mm. de diámetro. La difusión se realizó aplicando un volumen de 0,1 ml. de una suspensión de las cepas a examen en agua estéril, en la cavidad central practicada en la placa, e incubando éstas a 30°C durante un período de 1 a 8 días.

La digestión de la caseína se manifiesta por la aparición de un halo alrededor de la cavidad practicada en el centro de la placa, seleccionando en principio aquellas cepas en las que el diámetro del halo producido es superior a 25 mm.

V.2.3. ANALISIS ENZIMATICO DE LACTOBACILOS Y ENTEROCOCOS POR EL SISTEMA API-ZYM.

El sistema API-ZYM es un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas, aplicable a diversos materiales biológicos, tales como tejidos, células diversas, entre ellas microorganismos, líquidos orgánicos ... (LAVIOLETTE, 1977), en los que la actividad enzimática se detecta por el desarrollo de una coloración.

El dispositivo se presenta bajo la forma de una galería que contiene 20 cúpulas de 9 mm. de diámetro y 3 mm. de altura, cuyo fondo está constituido por un soporte que contiene el sustrato adecuado en solución tamponada (Tris maleato 0,05 M para pH 5,4; Tris ClH 0,05 M para pH 7,5 y 8,5).

Se ensayan solamente las cepas de lactobacilos y enterococos que en la prueba analítica V.2.2., han dado un halo de proteólisis superior a 25 mm.

Una solución de células de cada cepa, con densidad comprendida entre 5 y 6 en la escala de Mc Farland, se reparte con pipeta Pasteur estéril, a razón de 2 gotas de suspensión por cúpula. Cada galería se deposita en una caja de incubación, a la cual se añaden 5 ml. de agua destilada estéril para evitar la deshidratación. Estas cajas, una vez cerradas con tapa de plástico transpa-

rente, son puestas a incubar durante 6 horas a 37°C. Acabado el período de incubación, se depositan en cada cúpula una gota de reactivo A, y una gota de reactivo B. La composición de estos reactivos es la siguiente:

Reactivo A

Tris hidroximetil amino metano	250 g.
Acido clorhídrico (37%)	110 ml.
Lauril sulfato	100 g.
Agua destilada hasta	1000 ml.

Reactivo B

Fast Blue BB Sigma	3,5 mg.
2-Metoxietanol hasta	1000 ml.

Transcurridos 5 minutos, después de depositar los reactivos en cada cúpula, se exponen las galerías durante 10 segundos a una lámpara de 1000 wátios; al término de los mismos, se efectúa la lectura de las coloraciones desarrolladas, anotando los resultados según un baremo de 0 (reacción negativa) a 5 (reacción de intensidad máxima).

Cada galería utilizada permite la investigación de 19 actividades enzimáticas (Tabla V.1).

La escala de Mc Farland se prepara a partir de cloruro bá-

rico al 1% y ácido sulfúrico al 1%, en 10 tubos de ensayo del mismo diámetro.

En el tubo 1, se depositan 0,1 ml. de solución de cloruro de bario, en el tubo 2, 0,2 ml., en el tubo 3, 0,3 ml, ... y, en el tubo 10, 1 ml. El volumen de cada tubo se lleva a 10 ml. mediante adición de ácido sulfúrico. Una vez preparadas estas soluciones se agitan los tubos, al igual que los de las suspensiones microbianas cuya turbidez se requiere comparar con los mismos.

TABLA V.1. GALERIA ENZIMATICA API-ZYM

<u>Nº</u>	<u>ENZIMA INVESTIGADO</u>	<u>SUSTRATO</u>
1	Testigo	
2	Fosfatasa alcalina	2-Naftil fosfato
3	<u>Esterasa (C₄)</u>	2-Naftil butirato
4	<u>Esterasa lipasa (C₈)</u>	2-Naftil caprilato
5	<u>Lipasa (C₁₄)</u>	2-Naftil myristato
6	<u>Leucina aminopeptidasa</u>	L-leucil-2-naftilamida
7	<u>Valina aminopeptidasa</u>	L-valil-2-naftilamida
8	<u>Cistina aminopeptidasa</u>	L-cistil-2-naftilamida
9	<u>Tripsina</u>	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
10	<u>Quimotripsina</u>	N-benzoil-DL-fenilalanina-2-naftil- amida
11	Fosfatasa acida	2-Naftil fosfato
12	Fosfoamidasa	Naftol-AS-BI-fosfodiamida
13	-galactosidasa	6-Br-2-naftil- -D-galactopiranó- sido
14	-galactosidasa	2-Naftil- -D-galactopiranósido
15	-glucuronidasa	Naftol-AS-BI- D-glucuronato
16	-glucosidasa	2-Naftil- -D-glucopiranósido
17	-glucosidasa	6-Br-2-naftil- -D-glucopiranósido
18	-glucosaminidasa	1-Naftil-N-acetil- -D-glucosami- nida.
19	-mannosidasa	6-Br-2-naftil- -D-mannopiranósido
20	-fucosidasa	2-naftil- L-fucopiranósido

V.3. RESULTADOS

V.3.1. SELECCION DE ESTREPTOCOCOS LACTICOS

En las Tablas V.2, V.3, y V.4, se recogen los resultados de la actividad acidificante de las cepas de Streptococcus lactis - procedentes de quesos artesanales de las fabricaciones nº 1, nº 2 y nº 3, respectivamente.

Las Figuras V.1, V.2, y V.3, muestran de manera gráfica la evolución del poder acidificante de estas cepas a lo largo de 22 horas de incubación a 32°C.

En la fabricación nº 1, la cepa de mayor poder de transformación de lactosa en ácido láctico, es la M-1-Q₁-14, que alcanza a las 22 horas una acidez total de 70,2° D.

En las pruebas efectuadas con las cepas de la fabricación nº 2, se alcanzan, en general, actividades mayores que con las cepas de la fabricación nº 1, destacando la M-2-Q-19, cuya titulación de acidez es ya, a las 16 horas, de 70,2°D, alcanzando 72,9°D a las 22 horas de incubación. Debido a la velocidad de transformación de la lactosa en ácido láctico, y a la regularidad del curso de ésta transformación, la citada cepa de Streptococcus lactis ha sido seleccionada para su inclusión en los "starters".

Curiosamente con todas las cepas de esta especie procedentes de la fabricación nº 3, se alcanzan los valores más bajos de producción de ácido láctico.

TABLA V.2. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE DE
STREPTOCOCCUS LACTIS

Fabricación nº 1

Actividad acidificante (° Dornic)				
Horas	16	18	20	22
Cepa				
M-1-L-25	31,5	33,3	33,3	35,1
M-1-C-2	51,3	54,9	63,9	63,0
M-1-C-8	38,7	39,6	46,8	49,5
M-1-Q-17	27,9	27,9	27,9	28,8
M-1-Q ₁ -1	68,4	70,2	67,5	68,4
M-1-Q ₁ -4	56,7	59,4	65,7	63,9
M-1-Q ₁ -14	65,7	67,5	66,6	70,2

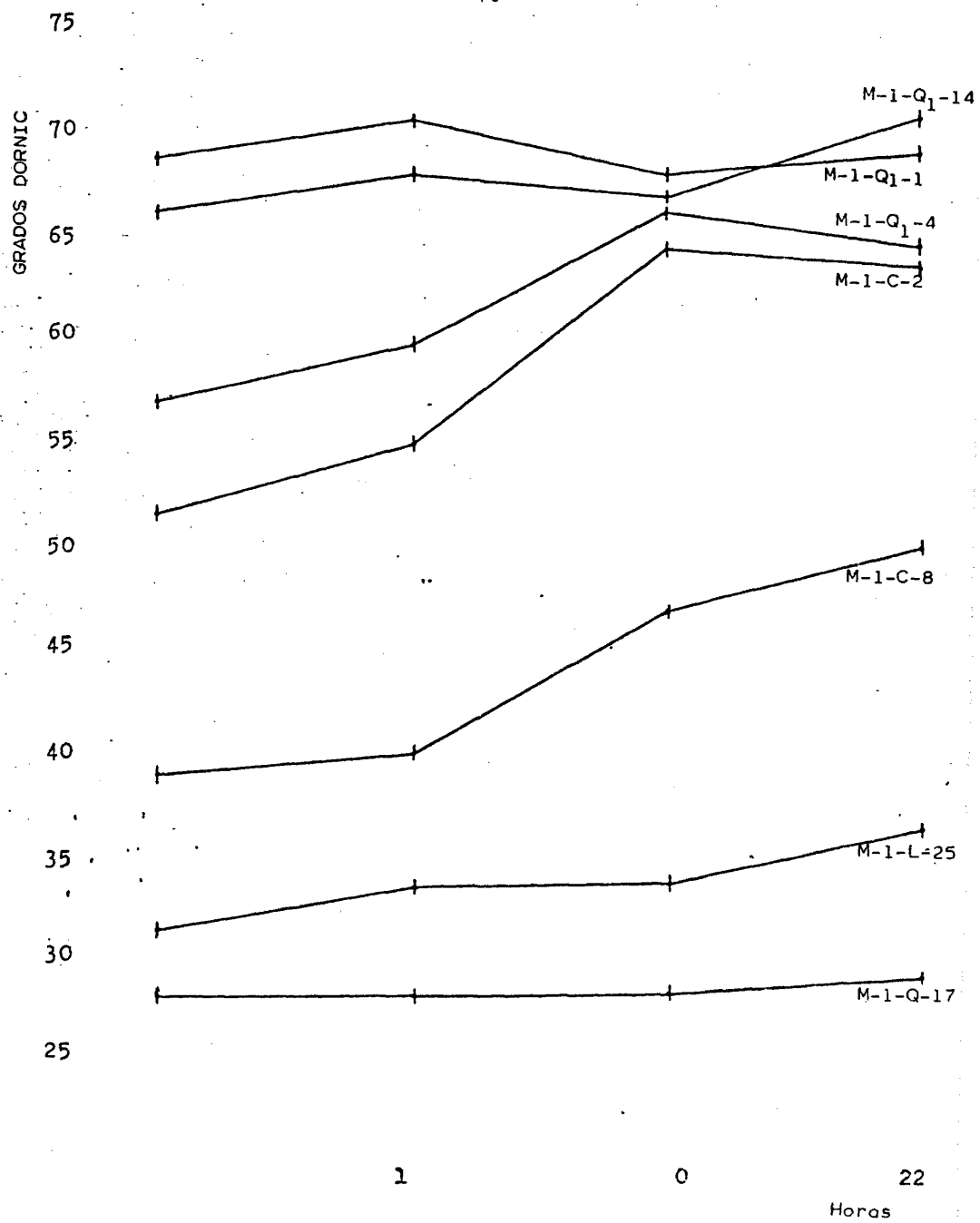


FIG. V.1. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE DE STREPTOCOCCUS LACTIS.
Fabricación nº 1

TABLA V.3. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE DE
STREPTOCOCCUS LACTIS

Fabricación nº 2

Actividad acidificante (° Dornic)				
Horas	16	18	20	22
<u>Cepa</u>				
M-2-C-20	44,1	63,0	67,5	73,8
M-2-C-24	44,1	46,8	48,6	53,1
M-2-Q-1	37,8	40,5	41,4	45,0
M-2-Q-5	47,7	52,2	54,0	54,0
M-2-Q-9	48,6	53,1	56,7	58,5
M-2-Q-10	24,3	22,5	23,4	22,5
M-2-Q-12	54,0	58,5	58,5	63,0
M-2-Q-17	20,7	21,6	23,4	24,3
<u>M-2-Q-19</u>	<u>70,2</u>	<u>71,1</u>	<u>73,8</u>	<u>72,9</u>
M-2-Q ₂ -12	45,9	46,8	50,4	51,3
M-2-Q ₂ -16	63,9	64,8	72,0	71,1
M-2-Q ₄ -24	44,1	45,9	48,6	51,3

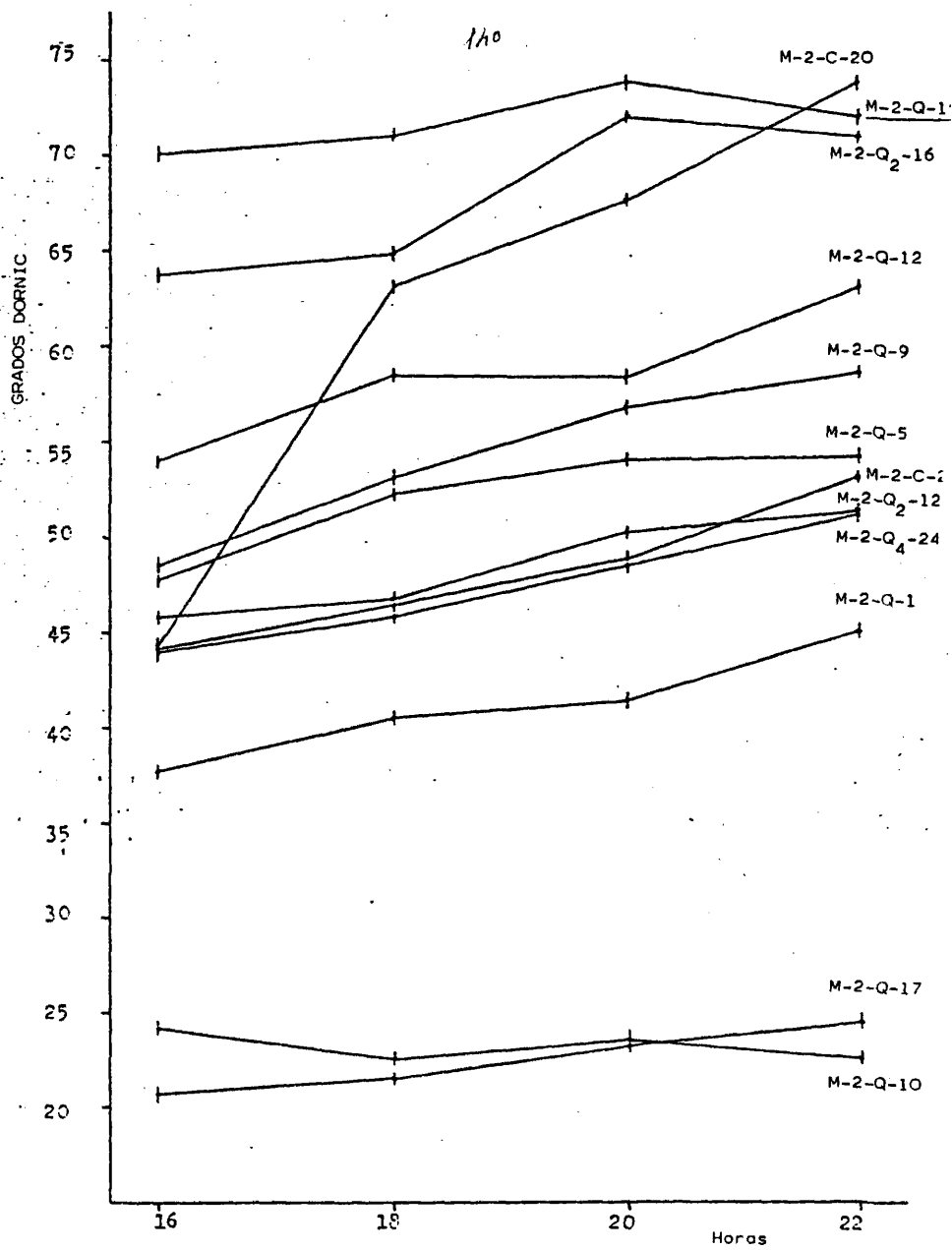


FIG.V.2. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE DE STREPTOCOCCUS LACTIS

Fabricación nº 2

TABLA V.4. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE DE
STREPTOCOCCUS LACTIS

Fabricación nº 3

Actividad acidificante (° Dornic)				
Horas	16	18	20	22
Cepa				
M-3-L-3	47,7	49,5	50,4	52,2
M-3-L-17	46,8	47,7	51,3	53,1
M-3-L-19	39,6	43,2	46,8	50,4
M-3-C-11	36,9	37,8	36,9	39,6
M-3-Q-18	31,5	32,4	44,1	47,7

142

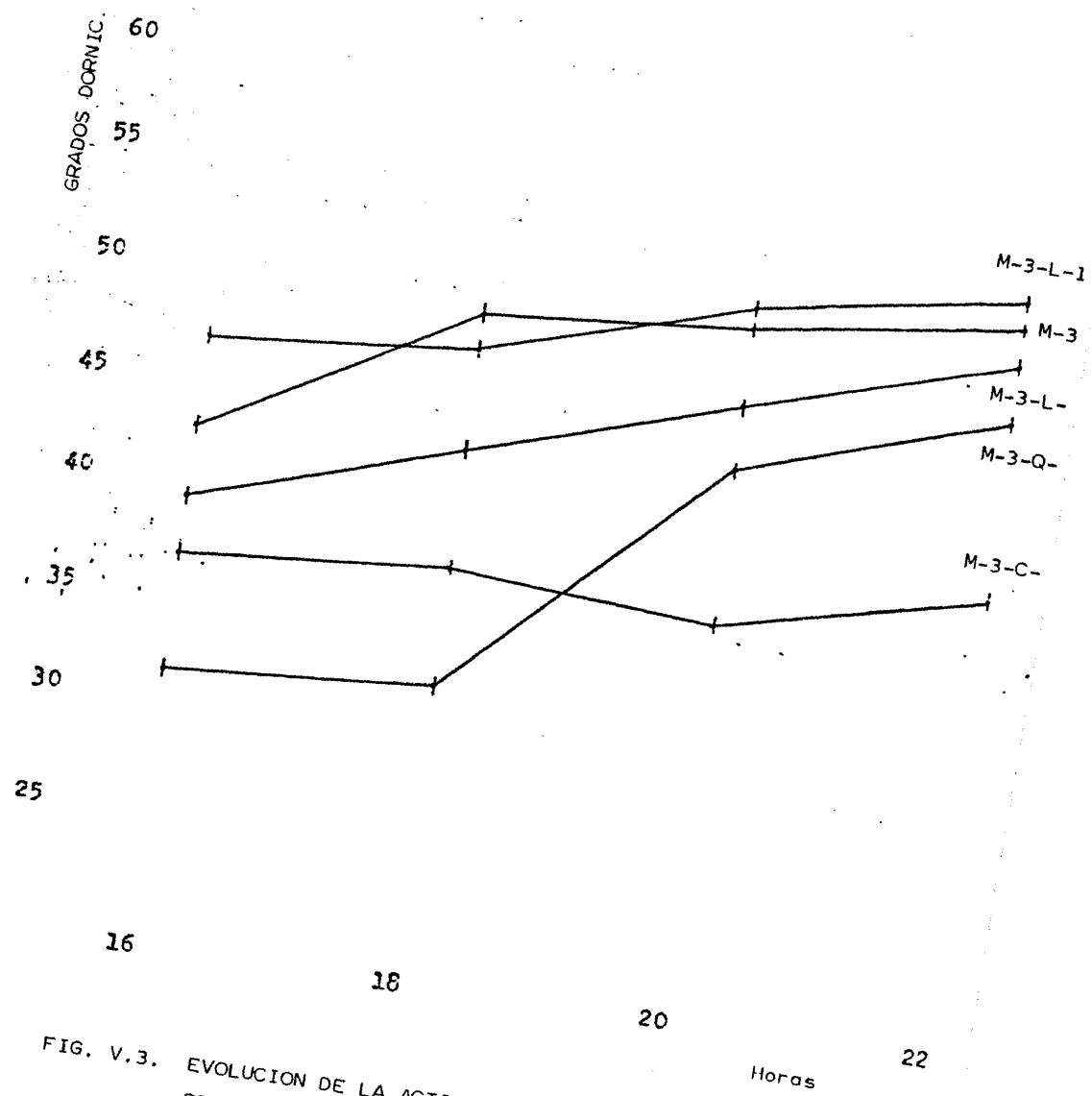


FIG. V.3. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE DE STREPTOCOCCUS LACTIS.
Fabricación nº 3

V.3.2. SELECCION DE LACTOBACILOS

En un primer intento de medir cuantitativamente la actividad caseolítica de los lactobacilos, mediante el test de digestión de la caseína (V.2.2), se han preseleccionado aquellas cepas en las que el diámetro del halo producido es superior a 25 mm, y que a continuación se describen:

<u>Fabricación nº 1</u>	M-1-Q ₁ -21(RO)	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-1-Q ₃ -20 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
<u>Fabricación nº 2</u>	M-2-Q ₁ -22 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-2-Q ₂ -1 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-2-Q ₂ -19 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-2-Q ₃ -4 (LA)	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₃ -10 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₃ -23 "	<u>Lactobacillus casei var. rhamnosus</u>
	M-2-Q ₄ -1 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -3 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -4 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -6 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -7 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -10 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -13 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -16 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -18 "	<u>Lactobacillus casei var. casei</u>
	M-2-Q ₄ -22 "	<u>Lactobacillus casei var. alactosus</u>

<u>Fabricación nº 3</u>	M-3-Q ₂ -5 (RO)	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-3-Q ₂ -10 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-3-Q ₂ -13 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-3-Q ₂ -14 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-3-Q ₃ -11 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	M-3-Q ₄ -8 "	<u>Lactobacillus plantarum</u>

Estas cepas preseleccionadas, son las que se han sometido a los análisis de actividades enzimáticas por el sistema API-ZYM, con el objetivo de seleccionar definitivamente aquellas cuyas actividades proteolíticas -fundamentalmente (Leucina-aminopeptidasa, Valina-aminopeptidasa, Cistina-aminopeptidasa)-, y lipolíticas -(Esterasa, Esterasa-lipasa, y Lipasa)- alcancen los valores máximos.

Los resultados de las cepas examinadas de Lactobacillus plantarum y Lactobacillus casei, se describen en las Tablas V.5 y V.6 respectivamente. La figura V.4 muestra los perfiles enzimáticos de las cepas de ambas especies.

De acuerdo con estos resultados, de las 11 cepas de Lactobacillus plantarum, a las que se ha realizado el análisis enzimático por el sistema API-ZYM, ha sido seleccionada la cepa M-1-Q₁-21, debido a la máxima intensidad de reacción obtenida en las pruebas de Leucina-aminopeptidasa y Valina-aminopeptidasa en cuanto a actividades proteolíticas; su actividad Esterasa-lipasa (C8),

TABLA V.5. EQUIPAMIENTO ENZIMÁTICO DE LACTOBACILLUS PLANTARUM AISLADOS A PARTIR DE QUESO DE MAHON ARTESANAL.

ENZIMAS	C E P A S								(RO)		
	M-3-Q ² -5	M-3-Q ² -10	M-3-Q ² -13	M-3-Q ² -14	M-3-Q ³ -11	M-3-Q ⁴ -8	M-2-Q ² -19	M-2-Q ² -1		M-2-Q ¹ -22	M-1-Q ¹ -21
Fosfatasa alcalina	0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5
Esterasa (C4)	1,5	1,5	1,5	1,5	2	1,5	1,5	1,5	2	2	1,5
Esterasa lipasa (C8)	2	1,2	2	1,5	2	1,5	2	2	3	3	4
Lipasa (C14)	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0,2	1	0
Leucina-aminopeptidasa	3,5	4	3,5	4	4,5	4,5	4,5	4,5	4	5	5
Valina-aminopeptidasa	3,5	4	3,5	4	4	4,5	4,5	4,5	5	5	5
Cistina-aminopeptidasa	0	0,1	0,1	0,2	0	1	0,5	0,5	1	1	0,5
Tripsina	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0
Quimotripsina	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0,2	0	1	0,7
Fosfatasa ácida	3	1,5	2	1	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	2	4
Fosfoamidasa	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2	1
α-Galactosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-Galactosidasa	3	4	2	4	4	5	5	5	4	5	4
β-Glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Glucosidasa	3	3	4	4	3,5	2	2	2	1,5	4	3
β-Glucosidasa	0,5	0,2	1	0,2	1,5	0	0	0	0	3	3
β-Glucosaminidasa	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Mannosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Fucosidasa	0	0	0,1	0,1	0	1	0,2	0,2	0,2	0,5	0,1

145

es la más fuerte de las actividades lipolíticas halladas, siguiéndole en orden decreciente la Esterasa (C4), y la Lipasa (C14).

Respecto a las 13 cepas de Lactobacillus casei analizadas, atendiendo al mismo criterio, se han seleccionado las siguientes: M-2-Q₃-4 = Lactobacillus casei var. casei, M-2-Q₃-23 = Lactobacillus casei var. rhamnosus, y M-2-Q₄-22 = Lactobacillus casei var. alactosus. Estas 3 cepas muestran una intensidad de reacción de 4 para las actividades Leucina-aminopeptidasa y Valina-aminopeptidasa, en tanto que la intensidad de reacción para la Cistina-aminopeptidasa puede considerarse prácticamente nula.

Las actividades lipolíticas Esterasa (C4) y Esterasa-lipasa (C8) son elevadas (4) para la cepa M-2-Q₃-4, y de intensidad media para las otras dos cepas, pero en cualquier caso iguales o superiores a las del resto de las cepas analizadas.

V.3.3. SELECCION DE ENTEROCOCOS

Siguiendo la misma sistemática operativa que para la selección de lactobacilos, se han preseleccionado, atendiendo a los resultados del test de digestión de la caseína, descrito en V.2.2, 5 cepas de Streptococcus durans, de un total de 30 cepas de esta especie ensayadas.

No se han ensayado cepas de Streptococcus faecium debido a su presencia minoritaria en el queso artesanal. Streptococcus faecalis y sus variedades tampoco se han tenido en cuenta por objetivas razones higiénicas.

Las cepas de Streptococcus durans han mostrado, en general, un halo de proteólisis inferior al obtenido con los lactobacilos, por lo que se ha tomado como criterio de preselección un diámetro del halo igual o superior a 15 mm. Estas cepas son las siguientes:

M-1-Q-2 (m-E)

M-1-Q₂-2 "

M-1-Q₂-8 "

M-2-Q₂-10 "

M-2-Q₂-6 "

Posteriormente han sido sometidas a los análisis de actividades enzimáticas, para seleccionar aquella que presente unas intensidades de reacción máximas para las actividades proteolíticas y lipolíticas investigadas.

El contenido enzimático de Streptococcus durans se describe en la Tabla V.7. La figura V.4 muestra el perfil enzimático de estas cepas.

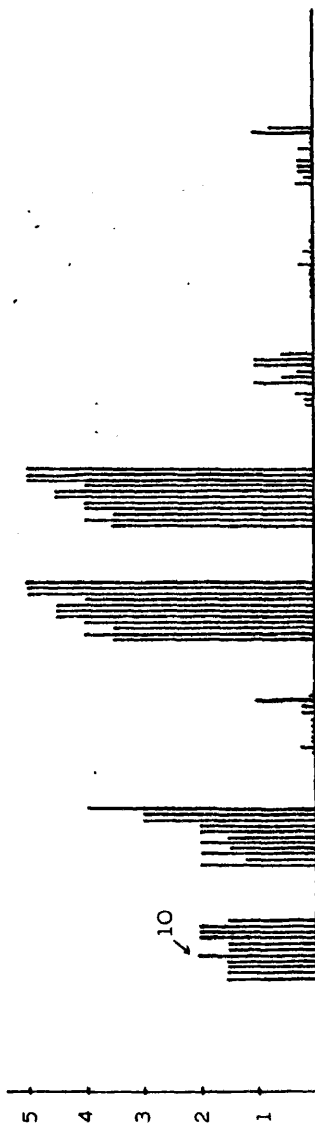
De acuerdo con estos resultados ha sido seleccionada la cepa M-2-Q₂-6 (m-E).

TABLA V.7. EQUIPAMIENTO ENZIMÁTICO DE STREPTOCOCCUS DURANS AISLADOS DE QUESO DE MAHON ARTESANAL.

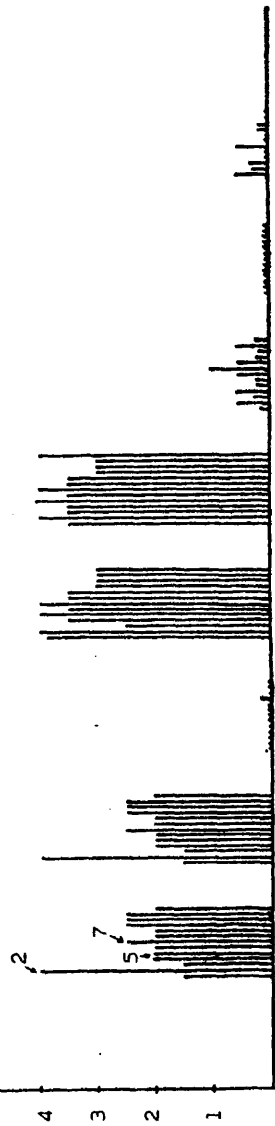
C E P A S

ENZIMAS	M-1-Q-2	M-1-Q-2	M-1-Q-1-8	M-2-Q-1-10	M-2-Q-1-6
Fosfatasa alcalina	0,5	0,1	0,2	0,2	1
Esterasa (C4)	2	0,5	0,8	1	3
Esterasa-lipasa (C8)	2	0,1	0,8	1	3
Lipasa (C14)	0	0	0	0	0
Leucina-aminopeptidasa	2,5	0,5	0,5	0,5	2
Valina-aminopeptidasa	0,5	0	0	0	0,8
Cistina-aminopeptidasa	0,7	0	0	0	2
Tripsina	0,5	0	0	0	0,8
Quimotripsina	4	0	0	0,5	3
Fosfata ácida	2	0,5	0,5	0,5	4
Fosfoamidasa	1	0	1	0	1,5
α-Galactosidasa	0	0	0	0	0
β-Galactosidasa	0	0	0	0	0
β-Glucuronidasa	0	0	0	0	0
α-Glucosidasa	0	0	0	0	0
β-Glucosidasa	0	0	0	0	0
β-Glucosaminidasa	0	0	0	0	0
α-Mannosidasa	0	0	0	0	0
α-Fucosidasa	0	0	0	0	0

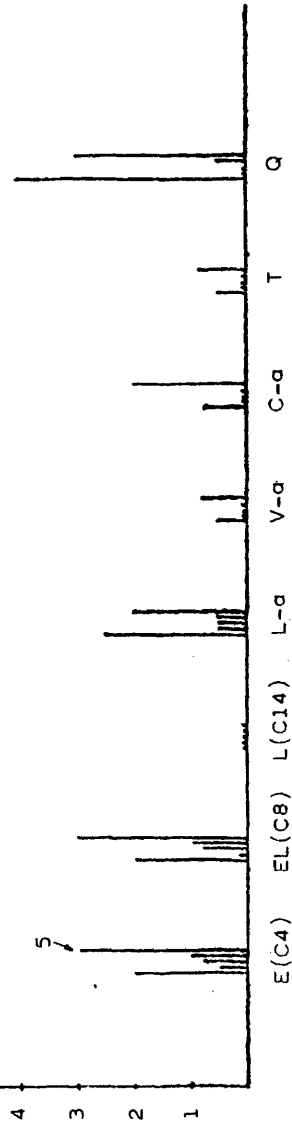
144



10 = M-1-Q₁-21
Lactobacillus plantarum



2 = M-2-Q₃-4
 5 = M-2-Q₃-23
 7 = M-2-Q₄-22
Lactobacillus casei



5 = M-2-Q₂-6
Streptococcus durans

V.4. DISCUSION

Los resultados de la prueba de actividad acidificante realizada con 24 cepas de Streptococcus lactis, aislados de queso de Mahón artesanal, evidencian una notable variabilidad en el poder y en la velocidad de transformación de la lactosa en ácido láctico.

Para la fabricación nº 1, la actividad mínima corresponde a la cepa M-1-L-25 que al final de la incubación alcanza 31,5^oD, en tanto que el poder máximo, en el mismo período de 22 horas, corresponde a la cepa M-1-Q₁-14 con 70,2^oD.

En las cepas procedentes de la fabricación nº 2, esta variabilidad resulta aún más acusada. La cepa M-2-Q-10 prácticamente - carece de este poder, mientras que por el contrario, la cepa seleccionada M-2-Q-19, alcanza en 16 horas 70,2^oD, es decir, 7,2 g. de ácido láctico por litro. Esta circunstancia hace que su inclusión en el "starter" sea aconsejable para que asegure una correcta acidificación de la cuajada, además de evitar, gracias al descenso rápido del pH, la proliferación de bacterias que dificultan una adecuada maduración del queso.

Las cepas de Streptococcus lactis del queso artesanal nº 3, muestran un curso regular en la formación de ácido láctico, estando comprendidos los valores del mismo, entre 3,96 g./l. y 5,31 g./l. cantidades sensiblemente inferiores a las que se consiguen con las

cepas aisladas de la fabricación precedente.

Para la selección de lactobacilos, se han investigado las actividades proteolíticas y lipolíticas, dada la importancia que reviste la liberación de aminoácidos y ácidos grasos durante la maduración del queso.

Para Lactobacillus plantarum, las variaciones encontradas en los sistemas enzimáticos, de una cepa a otra, son muy escasas.

Las actividades endopeptidásicas, del tipo tripsina o quimotripsina, están prácticamente ausentes en todas las cepas estudiadas. En cambio las actividades exopeptidásicas, del tipo amino peptidasas, están presentes en la mayor parte de ellas y a niveles sensiblemente similares. Las actividades leucina-aminopeptidasa y valina-aminopeptidasa son máximas en 3 de las 11 cepas con un valor de 5, mostrando en las restantes una intensidad de reacción comprendida entre 3,5 y 4. Por el contrario, la cistina-aminopeptidasa aparece regularmente distribuida, en valores escasos o nulos, en las diferentes cepas.

Para las actividades lipásica y esterásica se observa una distribución semejante. La actividad esterasa-lipasa es la más fuerte, seguida de la esterasa que está menos desarrollada, pero aparece en conjunto menos variable; y por último, la actividad lipásica es escasa, o nula, en todas las cepas. Otros autores, -

CARINI y LODI (1975), han obtenido actividades lipásicas bacterianas más importantes cuando han cambiado las condiciones experimentales, en el sentido de aumentar de 6 a 8 horas, el período de incubación de las galerías. De acuerdo con BRANDL y ZIZER (1973), una hipótesis que pudiera explicar el mayor nivel de la actividad lipásica a mayor período de incubación, sería la lisis de las células producida durante el período de incubación más largo, por liberación de enzimas lipolíticos endocelulares.

Los perfiles enzimáticos de Lactobacillus casei y sus var. casei, ramnosus y alactosus, están muy próximos a los de Lactobacillus plantarum, si se exceptúan determinadas actividades oxidásicas (β -galactosidasa y α -glucosidasa) que aparecen más acusadas en las cepas de ésta última especie.

Las actividades aminopeptidásicas oscilan entre 2,5 y 4 de intensidad, a excepción de la Cistina-aminopeptidasa, que como en el caso anterior es casi nula o inexistente, ocurriendo igual con las endopeptidasas tripsina y quimotripsina.

En las actividades lipásicas y esterásicas también se observa una distribución similar; alta o media para la esterasa y esterasa-lipasa, y escasa o nula para la lipasa.

Las cepas de lactobacilos que hemos seleccionado muestran actividades aminopeptidásicas y esterásicas altas, careciendo prác

ticamente de actividades exopeptidásicas y lipásicas exocelulares.

Las diferentes cepas de Streptococcus durans estudiadas, muestran en general escasa actividad enzimática, habiéndose seleccionado una cepa con solo actividad esterásica y algo de Cistina-aminopeptidasa.

Asimismo, cabe destacar la presencia en esta cepa de exopeptidasas, principalmente la quimotripsina, que está prácticamente ausente en las 24 cepas de lactobacilos estudiadas.

V.5. CONCLUSIONES

Se ha investigado la actividad acidificante de 24 cepas de Streptococcus lactis, y las actividades proteolíticas y lipolíticas exocelulares de 11 cepas de Lactobacillus plantarum, 13 cepas de Lactobacillus casei y 5 cepas de Streptococcus durans, mediante un micrométodo normalizado que permite un análisis de estas actividades enzimáticas y la posibilidad de efectuar un estudio comparativo de los resultados.

1º) En idénticas condiciones experimentales, el poder acidificante de Streptococcus lactis es muy variable de unas cepas a otras, habiéndose seleccionado aquella que presenta una mayor actividad, en un tiempo fijo.

2º) Las actividades aminopeptidásicas están presentes en todas las cepas de lactobacilos a niveles sensiblemente similares, con excepción de la cistina-aminopeptidasa, cuya actividad es escasa o nula.

3º) Las actividades endopeptidásicas -del tipo tripsina y quimotripsina- están prácticamente ausentes en las diferentes cepas de lactobacilos.

4º) Para las actividades lipásicas y esterásicas, se ob-

serva igualmente una distribución similar en los lactobacilos, -
siendo de caracter medio o fuerte las actividades esterasa (C4) y
esterasa-lipasa (C8), y prácticamente nula la lipasa (C14).

59) El perfil enzimático de Streptococcus durans es sen-
siblemente diferente del perfil enzimático de los lactobacilos.
Con excepción de la quimotripsina, el resto de los enzimas proteo-
líticos no están presentes, o lo están en cantidades notablemente
inferiores; lo que confirma las diferencias taxonómicas entre es-
tas especies.

C A P I T U L O V I

ELABORACION DE UN "STARTER" PARA QUESO DE MAHON
FABRICACION DEL MISMO A ESCALA SEMI-INDUSTRIAL -
PARTIENDO DE LECHE PASTERIZADA

VI.1. INTRODUCCION

Hasta finales del siglo XIX, para fabricar mantequilla o queso, se dejaba la leche a temperatura ambiente con objeto de que la flora láctica presente en ella se desarrollase y provocase la fermentación. Este procedimiento implicaba también desarrollos circunstanciales de gérmenes indeseables, responsables de modificaciones desagradables en el sabor y aroma de los quesos.

A partir del momento en que se comprueba que la fabricación correcta del queso, está relacionada directamente con el control microbiológico de la fermentación de la cuajada, comienza a perfilarse una nueva tecnología en la que, progresivamente, estos métodos primitivos, se van modificando y sustituyendo por otros más modernos y racionales.

STORCH (1890) en Dinamarca, y CONN (1889) en Estados Unidos, fueron quienes por primera vez demostraron experimentalmente que se podía obtener una mantequilla de buena calidad utilizando cultivos puros de Streptococcus lactis. Sin embargo, el producto obtenido carecía del aroma característico de la mantequilla tradicional.

Es posteriormente, en 1919, cuando HAMMER y BAJLEY en Estados Unidos, STORCH en Dinamarca y BOEKHOUT y OTT DE VRIES en los Países Bajos, al observar que los cultivos lácticos pro-

pician un buen aroma, cuando se llega al verdadero control microbiológico de la fermentación del queso; llegan a establecer que dichos cultivos estaban formados por una mezcla de dos especies distintas de bacterias: Streptococcus lactis, responsable de la acidez, y Streptococcus cremoris, responsable de la producción de aroma.

Más tarde, en 1936, se identifican otras especies de bacterias lácticas productoras de aromas, que fueron clasificadas como Streptococcus diacetylactis por MATUSEWSKI y col., (1936) en Polonia, y Streptococcus citrophilus por VAN BEYNUM y PETTE (1936) en los Países Bajos.

Los "starters", usados comercialmente en la industria láctea, responden a tres tipos diferentes de acuerdo con su composición y según la clasificación propuesta por LAWRENCE y col., (1976):

- Cultivo puro único ("single strain starters")
- Varios cultivos puros ("multiple strain starters")
- Cultivo mixto ("mixed strain starters")

Los primeros están formados, generalmente, por un cultivo puro de Streptococcus cremoris, o de Streptococcus lactis.

En el segundo caso son varios los cultivos que se aplican, bien en momento diferentes, o simultáneamente, y lo forman mezclas

de tres o cuatro cultivos puros de Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Streptococcus diacetylactis, o género diferentes como el Leuconostoc.

Los cultivos mixtos utilizados corrientemente en Italia y América del Norte, están formados por mezclas no aisladas de varias cepas de distintas especies como Streptococcus cremoris, - Streptococcus lactis, etc. Estos cultivos tienen mayores ventajas aplicativas por no presentar relaciones fágicas entre ellas. Y por tanto, son más resistentes a los bacteriófagos que los cultivos puros, pues contienen varias cepas con genotipos diferentes.

COGAN (1980), subdivide a los cultivos mixtos en cuatro tipos, según la naturaleza de las bacterias productoras de aroma que estos contienen:

- Cultivos tipo B, que contienen distintas especies de Leuconostocs productoras de aroma (Leuc. citrovorum, Leuc. dextranicum, y/ó Leuc. lactis).

- Cultivos tipo D, con la especie Streptococcus diacetylactis como productora de aroma; esta especie origina al fermentar el citrato, varios compuestos, metabolitos finales, entre los cuales predomina el diacetilo.

- Cultivos tipo B-D que contienen a la vez Leuconostoc

y Streptococcus diacetylactis, y

- Cultivos tipo N ú O, que no contienen bacterias productoras de aroma.

La selección de cepas de Leuconostoc y Streptococcus diacetylactis está basada en la velocidad de producción de CO₂ a partir de citrato, eligiendo aquellas que lo producen rápida o lentamente, según el tamaño de "ojo" que se estime óptimo para la mejor textura del queso en cuestión.

La inclusión de especies bacterianas de otros género, como por ejemplo el gén. Lactobacillus, en los "starters", está motivada por la capacidad de estos gérmenes en liberar aminoácidos esenciales (ácido glutámico, valina, lisina, prolina y leucina) en su actividad proteolítica de la caseína.

Estudios realizados por MILLER y KANDLER (1967), con cultivos puros de estreptococos y lactobacilos, demuestran en el queso un incremento del nitrógeno no protéico comprendido entre el 1 y el 2%, mientras que con el uso de lactobacilos, dicho incremento alcanzó el 4-5%.

En relación con la preparación de los "starters", existen tres técnicas y formas diferentes de conservación (TOFTE-JESPERSEN N.J., 1974):

- "Starters" secos.
- "Starters" liofilizados.
- "Starters" congelados.

Los primeros se obtienen por cultivo de los gérmenes en leche adicionada de lactosa y carbonato cálcico -el suero se elimina por prensado- secando el residuo bajo vacío. La tasa de supervivencia apenas sobrepasa el 1-2% después del tratamiento.

En el "starter" liofilizado, procede congelar el cultivo, sublimando el agua a continuación por secado bajo vacío; se consigue una tasa de supervivencia superior al 50%.

Finalmente, los "starters" congelados fueron puestos por primera vez a punto por LEWIS (1956). Se obtienen sembrando masivamente las cepas en frascos de plástico con leche estéril, congelándolos al momento, y conservándolos a -20°C . La posterior descongelación e incubación de los mismos se realizan de acuerdo con las necesidades de fabricación.

La conservación de los "starters" a -20°C . entrañaba una pérdida de actividad acidificante de las cepas. COWMAN y SPECK (1965), demostraron que la conservación en nitrógeno líquido a -196°C evitaba la pérdida de esa capacidad. Estos mismos investigadores, años más tarde, en Estados Unidos, y BERGERE (1968) en Francia, prepararon suspensiones concentradas congeladas de bacte

rias lácticas. Para ello, cultivan los gérmenes y recogen por - centrifugación, suspendiéndolos a continuación en un pequeño volumen de medio que congelan en nitrógeno líquido. Este procedimiento, presenta la ventaja de que se puede utilizar el concentrado - directamente en la leche puesta ya en la cuba de cuajar; además evita muchos riesgos de contaminación en la preparación tradicional de los "starters".

En la preparación clásica de un "starter", se parte de un cultivo y siembras sucesivas en leche pasteurizada, hasta llegar a un volumen que represente el 0,5-2% de la leche a cuajar. El medio utilizado para estos pases previos iniciales es leche, normalmente reconstituída de leche en polvo exenta de antibióticos, pasteurizada a la máxima temperatura admitida en este proceso, en recipientes especialmente diseñados para estos fines (ROBERTSON, 1966), que reciben comunmente el nombre de lactofermentadores.

Una vez refrigerada la leche, después de la pasteurización, se siembra el lactofermentador, se incuba a temperatura adecuada durante un tiempo variable, según la naturaleza del cultivo y la acidez titulable que se desee conseguir. Alcanzada la cual, se - refrigera el cultivo a 2-4^oC, pudiéndose conservar, y hacer uso del mismo a lo largo de los tres o cuatro días siguientes.

El objetivo y fin último de nuestro trabajo se ha centrado precisamente en la elaboración de un "starter" con las cepas bac-

terianas aisladas del queso artesano de Mahón, que previamente - hemos seleccionado atendiendo a sus características lactológicas más destacadas, y que las definen como las estirpes más apropiadas para ser aplicadas en la elaboración de este tipo de queso, partiendo naturalmente de leche pasteurizada, y sobre volúmenes de escala piloto.

Con la puesta a punto de esta tecnología hemos pretendido - llegar a una optimización de la calidad del queso de Mahón. Los ensayos a escala industrial, junto a los resultados del análisis - sensorial de las formas obtenidas, darán o no la viabilidad apetecible a este intento de innovación tecnológica que hacemos para este caso concreto de queso con Denominación de Origen Mahón.

VI.2. MATERIALES, METODOS Y TECNICAS

VI.2.1. ELABORACION DE "STARTERS"

En la Tabla VI.1 se relacionan las especies bacterianas y sus correspondientes cepas utilizadas en estas experiencias, seleccionadas en el Capítulo V en base a sus propiedades de interés técnico-lactológico, así como las distintas combinaciones para formar los diferentes "starters" a que hemos llegado.

Cada uno de ellos se preparó a partir de la cepa correspondiente liofilizada, tras regeneración en leche desnatada estéril, cultivándolas durante 16 horas a 32°C. Transcurrido este período, se efectuó un recuento en cada subcultivo para comprobar que las cargas hallaban el mismo nivel o potencia; de esta forma se asegura una equitativa participación de las distintas especies en los "starters".

Para cada combinación se utilizó un matraz de 250 ml. de capacidad, con 100 ml. de leche desnatada estéril, sembrando, de acuerdo con las proporciones de cada una de las cepas, en la proporción previamente establecida.

Después de 16 horas a 32°C, se homogeneizaron por agitación, y posteriormente cada cultivo se liofilizó en viales de vidrio estéril a razón de 2 ml. por vial.

- 166 -

Los cultivos así preparados, se conservaron a 4°C hasta el momento de su empleo en la fabricación experimental de los -
quesos.

TABLA VI.1. COMPOSICION DE LOS DISTINTOS "STARTERS" ELABORADOS
PARA LA FABRICACION INDUSTRIAL DEL QUESO DE MAHON

"S"-nº1	<u>Streptococcus lactis</u>	M-2-Q-19	(99%)
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	M-1-Q ₁ -21	(1%)
"S"-nº2	<u>Streptococcus lactis</u>	M-2-Q-19	(98%)
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	M-1-Q ₁ -21	(1%)
	<u>Lactobacillus casei var.casei</u>	M-2-Q ₃ -4	(1%)
"S"-nº3	<u>Streptococcus lactis</u>	M-2-Q-19	(97%)
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	M-1-Q ₁ -21	(1%)
	<u>Lactobacillus casei var.casei</u>	M-2-Q ₃ -4	(1%)
	<u>Lactobacillus casei var.rhamnosus</u>	M-2-Q ₃ -23	(1%)
"S"-nº4	<u>Streptococcus lactis</u>	M-2-Q-19	(97%)
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	M-1-Q ₁ -21	(1%)
	<u>Lactobacillus casei var.casei</u>	M-2-Q ₃ -4	(1%)
	<u>Lactobacillus casei var.alactosus</u>	M-2-Q ₄ -22	(1%)
"S"-nº5	<u>Streptococcus lactis</u>	M-2-Q-19	(98%)
	<u>Lactobacillus plantarum</u>	M-1-Q ₁ -21	(1%)
	<u>Streptococcus durans</u>	M-2-Q ₂ -6	(1%)

VI.2.2. FABRICACION DE QUESOS A ESCALA SEMI-INDUSTRIAL

Se han fabricado 5 lotes de quesos en una planta piloto de 200 litros de capacidad partiendo de leche pasteurizada. Se obtienen 5 quesos en cada lote de aproximadamente 2 kg. cada uno.

El proceso de elaboración, que queda expuesto esquemáticamente en la Tabla VI.2. es el siguiente:

La pasteurización de la leche cruda se realiza en pasteurizador de placas APV-Junior, durante 15 segundos a una temperatura de 75°C. A continuación se enfría la leche a 32°C, en cuba Lacta experimental de 200 l. de capacidad y dotada de camisa calefactora, termómetro, pala de agitación mecánica, y lira mecánica, con velocidad regulable para el corte de la cuajada.

Antes de proceder a la inoculación del "starter", se añaden a los 100 l. de leche, 20 g. (0,2%) de cloruro cálcico.

La siembra del "starter" en la cuba de cuajar se efectúa en proporción del 1% (1 l.). Quince minutos después se adicionan 16 ml. de un cuajo comercial de titulación conocida.

A los 45 minutos de agregar el cuajo, se procede al corte de la cuajada mediante lira mecánica hasta obtener granos del tamaño de un garbanzo.

TABLA VI.2. PROCESO DE ELABORACION DEL QUESO DE MAHON A ESCALA SEMI-INDUSTRIAL

	Volumen de leche por fabricación	100 l.
Tratamiento	Temperatura de pasterización	75°C.
	Tiempo de pasterización	15 s.
Adiciones	Cloruro cálcico	20 g. (0,2%)
	Inóculo de "starters"	1 l. (1%)
	Cuajo líquido	16 ml.
	Temperatura de cuajado	32°C.
	Tiempo de cuajado	45 min.
Elaboración	Moldeado	Manual en paños
	Prensado	Prensa vertical
	Tiempo de prensado	2 horas
	Salado	Salmuera de 23° Bé
	Tiempo de Salado	6 a 8 horas
Maduración	Condiciones de Maduración	12°C, 90% H.R.
	Tiempo de Maduración	4 meses

Después del desuerado mecánico, se distribuye la cuajada en lienzos, procediendo a un moldeado manual para que cada pieza de queso adquiriera la forma característica.

El prensado se efectúa en prensa vertical no hidráulica por espacio de 2 horas, al cabo de las cuales se introducen los quesos en un baño de salmuera de 23° Bé, durante un tiempo de 6 a 8 horas. Concluido el período de salado, se introducen los quesos en cámara de maduración, a 12°C de temperatura y 90% de humedad relativa, manteniéndolos allí durante un período de 4 meses.

VI.2.2.1. CONTROL DE LAS CARGAS MICROBIANAS

La leche pasteurizada utilizada en la fabricación de los 5 lotes de quesos fué sometida, en todos los casos, a recuento de los principales grupos microbianos: gérmenes lácticos, enterococos, coliformes, micrococos y estafilococos, levaduras, y mohos, con objeto de comprobar el grado de eficacia del tratamiento térmico.

La técnica seguida fué la descrita en II.2.2. El medio utilizado para los recuentos de estreptococos lácticos fué agar Elliker adicionado de 0,1% de acetato de talio y 0,025 g/l. de púrpura de bromocresol.

Los mismos recuentos efectuados en la leche pasteurizada, -

se han realizado en los quesos fabricados experimentalmente a los 4 meses de maduración; de esta forma es fácil interpretar los resultados comparando las cargas microbianas de los quesos artesanos y la de los quesos industriales al término del período de afinado.

VI.2.2.2. DETERMINACIONES QUIMICAS

En un queso de cada lote se han determinado los siguientes parámetros químicos:

pH. Mediante homogeneización de 10 g. de queso en 50 ml. de agua destilada, la medida se verifica con pHmetro Titriskop E-516.

Extracto seco. Se ha seguido la técnica descrita en la norma 5A de la FIL-IDF, 1969.

Se depositan 20 g. de arena y un malaxador, varilla de vidrio con forma de maza, en una cápsula de acero inoxidable. A continuación se introduce en estufa a 105°C, la cápsula conteniendo la arena y el malaxador hasta obtener un peso constante.

Conseguido éste, se deja enfriar la cápsula y se pesa de nuevo. Seguidamente se deposita en la misma 3 g. de queso y se vuelve a pesar.

Con ayuda del malaxador de vidrio, se tritura cuidadosamente la muestra de queso con la arena, y nuevamente se introduce la cápsula en la estufa a 105°C durante 4 horas. Este secado se continúa hasta obtener un peso constante, realizando pesadas con intervalos de media hora.

La diferencia entre la primera pesada y la última, referida a 100, expresa el extracto seco en % con una precisión de $\pm 0,1$.

Materia grasa total. Se ha realizado por el método de Van Gulik, modificación del método de Gerber-Siegfeld, consistente en la utilización de un butirómetro especial abierto por sus dos extremos.

La técnica es la siguiente:

Una muestra de 3 g. de queso, se deposita en el butirómetro junto con 10 ml. de ácido sulfúrico (densidad 1,820), calentando en baño maria a 65°C. Periódicamente se invierte el butirómetro hasta la disolución del queso, adquiriendo entonces la mezcla una coloración pardo violeta.

Se agrega a continuación 1 ml. de alcohol amílico exento de furfurool (0,815), y se agita fuertemente el butirómetro. Se vuelve a calentar seguidamente durante 5 minutos a 65°C., transcurrido éste período se centrifuga a 1000 r.p.m. también durante

5 minutos, y se lee a nivel del menisco la columna de grasa. En este método, bastante exacto para quesos duros, la escala del butirómetro, expresa directamente el % de grasa.

VI.2.2.3. VALORACION DE LA CALIDAD ORGANOLEPTICA

La hemos efectuado según un baremo establecido por 5 catadores especializados. Dicho baremo se ha confeccionado en función de las características de sabor, textura, olor y color de los quesos.

<u>Características Organolépticas</u>	<u>Factor contribución a la calidad final</u>
Sabor	0,50
Textura	0,20
Olor	0,18
Color	0,12

Posteriormente cada uno de los componentes del jurado valoró, independientemente, sobre 10 puntos, cada una de las características organolépticas citadas, en los quesos de cada lote.

VI.3. RESULTADOS

VI.3.1. ANALISIS MICROBIOLOGICO

El resultado de los recuentos de los principales grupos microbianos en la leche pasteurizada (Tabla VI.3), evidencia la escasa o nula resistencia de las bacterias coliformes al tratamiento térmico; hecho análogo ocurre con las levaduras y los mohos.

Los enterococos aparecen en valores comprendidos entre 10^1 gér./ml., y 10^3 gér./ml. representando las bacterias no lácticas más termorresistentes.

Micrococos y estafilococos se detectan en cotas muy bajas, con excepción de la leche destinada a la fabricación nº 5, en la que se alcanza una cota de $2,4 \times 10^3$ gér./ml.

La escasa presencia de bacterias lácticas en la leche pasteurizada, entre límites de 10 y 100 gér./ml. demuestran, una baja recontaminación en el aire, y en los utensilios de la quesería.

Los resultados del recuento de microorganismos en los 5 lotes de quesos, a los 4 meses de maduración, se exponen en la Tabla VI.4. Las mayores cifras corresponden a la microflora láctica, seguida de los enterococos y bacterias halófilas, que se encuentran sensiblemente a la misma proporción, en tanto que, prácticamente, no se detectan, o mínimamente, las bacterias coliformes, las levaduras y los mohos.

TABLA VI.3. RESULTADOS DE LOS RECUENTOS DE LOS PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES
EN LA LECHE PASTERIZADA

	Fab. "S" nº 1	Fab. "S" nº 2	Fab. "S" nº 3	Fab. "S" nº 4	Fab. "S" nº 5
Estreptococos	$2,9 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^1$
Lactobacilos	$2,3 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$	$1,8 \times 10^2$	$6,8 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$
Enterococos	-	$5,8 \times 10^3$	$8,0 \times 10^1$	$5,8 \times 10^1$	$2,6 \times 10^2$
Coliformes	-	-	$2,4 \times 10^1$	-	-
Micrococos y Estafilococos	-	$1,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^1$	$2,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$
Levaduras	-	-	-	-	-
Mohos	-	-	-	-	-

175

TABLA VI.4. RESULTADOS DE LOS RECUENTOS DE LOS PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES EN EL QUESO DE MAHON SEMI-INDUSTRIAL A LOS CUATRO MESES DE MADURACION

	<u>Fab. "S" nº 1</u>	<u>Fab. "S" nº 2</u>	<u>Fab. "S" nº 3</u>	<u>Fab. "S" nº 4</u>	<u>Fab. "S" nº 5</u>
Estreptococos	$2,8 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$9,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$
Lactobacilos	$1,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$
Enterococos	$3,4 \times 10^2$	$3,6 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$5,1 \times 10^4$
Coliformes	$6,6 \times 10^2$	-	-	-	-
Micrococos y Estafilococos	$6,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^2$	$5,2 \times 10^3$
Levaduras	$2,2 \times 10^1$	-	$1,0 \times 10^1$	-	$1,2 \times 10^2$
Mohos	-	$1,0 \times 10^1$	-	$1,4 \times 10^2$	-

VI.3.2. ANALISIS QUIMICOS

El valor de pH alcanzado en el extracto seco, y la materia grasa, en los 5 quesos analizados a los cuatro meses de maduración, se exponen en la Tabla VI.5.

El pH mínimo -5,0- corresponde al queso nº 1, en tanto que el máximo -5,31- lo alcanza el queso nº 3 y el nº 4.

El valor del extracto seco oscila entre 58,06%, valor mínimo en el queso nº 3, y 64,26%, valor máximo en el queso nº 1.

La materia grasa, referida a tanto por ciento de extracto seco, es, en todos los casos, superior al 40%, siendo el queso nº 1, el que presenta menor porcentaje (41,1%), y el nº 2, el que alcanza el valor máximo (48,1%).

VI.3.3. ANALISIS SENSORIAL

El criterio seguido por los miembros del Jurado de cata ha sido el siguiente:

- Emitir una nota numérica sobre diez puntos
- Contemplar las siguientes características organolépticas como más importantes: sabor, textura, olor y color.

TABLA VI.5. RESULTADOS DE LOS ANALISIS QUIMICOS EFECTUADOS EN QUESO DE MAHON SEMI-INDUSTRIAL A LOS 4 MESES DE MADURACION

	<u>pH</u>	<u>Extracto seco " (%)</u>	<u>Materia grasa (% en extracto seco)</u>
Fab. "S" nº 1	5,00	64,26	41,1
Fab. "S" nº 2	5,20	62,10	48,1
Fab. "S" nº 3	5,31	58,06	43,9
Fab. "S" nº 4	5,31	59,80	44,9
Fab. "S" nº 5	5,12	62,10	47,1

La puntuación alcanzada por cada lote, así como la media aritmética de ésta, se exponen en las Tablas VI.6, VI.7, VI.8, - VI.9, y VI.10.

La calificación global de cada lote (Tabla VI.11), se ha obtenido sumando el producto de la puntuación de cada propiedad, por un factor que el Jurado estimó contribuía a la calidad final.

Estas calificaciones resultan bajas, y muy similares para el primer $-(32,6)-$ y quinto $-(34,9)-$ lote; es algo más elevada para el lote segundo $-(50,9)-$, destacando el lote tercero y el cuarto que obtienen calificaciones de $-(68,3)-$ y $-(77,4)-$ puntos respectivamente.

TABLA VI.6. VALORACION DE LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DEL LOTE DE QUESOS Nº 1.

"Starter" constituido por: Streptococcus lactis y Lactobacillus plantarum

<u>Características</u>	<u>Catador</u>					<u>Media</u>
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	
Sabor	3	3	2	4	1	2,6
Textura	4	4	4	4	3	3,8
Color	5	5	5	5	4	4,8
Olor	3	3	3	3	2	2,8

TABLA VI.7. VALORACION DE LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DEL LOTE DE QUESOS Nº 2.

"Starter" constituido por: Streptococcus lactis, Lactobacillus plantarum y Lactobacillus casei var. casei

<u>Características</u>	<u>Catador</u>					<u>Media</u>
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	
Sabor	5	5	6	6	3	5,0
Textura	5	6	6	6	4	5,4
Color	5	6	6	5	4	5,2
Olor	4	5	6	6	3	4,8

TABLA VI.8. VALORACION DE LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DEL LOTE DE QUESOS Nº 3.

"Starter" constituido por: Streptococcus lactis,
Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei var.
casei y Lactobacillus casei var. rhamnosus

Catador

<u>Características</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>Media</u>
Sabor	8	7	7	7	6	7,0
Textura	8	7	8	7	5	7,0
Color	7	7	7	6	6	6,6
Olor	7	7	6	6	5	6,2

TABLA VI.9. VALORACION DE LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DEL LOTE DE QUESOS Nº 4.

"Starter" constituido por: Streptococcus lactis,
Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei var.
casei y Lactobacillus casei var. alactosus

Catador

<u>Características</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>Media</u>
Sabor	9	8	9	8	7	8,2
Textura	8	7	9	7	7	7,6
Color	8	7	7	7	6	7,0
Olor	7	7	8	8	6	7,2

TABLA VI.10. VALORACION DE LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DEL LOTE DE QUESOS Nº 5

"Starter" constituido por: Streptococcus lactis, Lactobacillus plantarum, y Streptococcus durans.

<u>Características</u>	<u>Catador</u>					<u>Media</u>
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	
Sabor	2	4	4	3	2	3,0
Textura	4	5	5	5	3	4,4
Color	5	5	4	4	3	4,2
Olor	3	4	4	3	1	3,0

TABLA VI.11. PUNTUACION TOTAL DE CADA CARACTERISTICA ORGANOLEPTICA Y CALIFICACION GLOBAL DE CADA LOTE DE QUESOS

<u>Lote de Quesos</u>	<u>Puntos sobre 100</u>				
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
Sabor	26	50	70	82	30
Textura	38	54	70	76	44
Color	48	52	66	70	42
Olor	28	48	62	72	30
Calidad organo- léptica global	32,6	50,9	68,3	77,4	34,9

VI.4. DISCUSION

Vamos ahora a comentar los resultados experimentales obtenidos a lo largo del proceso completo de elaboración controlada del queso a escala piloto. Así vemos que los resultados del control de la carga microbiana en la leche pasteurizada, destinada a la fabricación de los 5 lotes de quesos, ponen de manifiesto la eficacia del tratamiento térmico para destruir bacterias coliformes, levaduras y mohos, no existiendo prácticamente recontaminación de la misma en las etapas posteriores.

Aunque la pasteurización ha sido correcta en todos los casos, existe una ligera contaminación de gérmenes lácticos en la quesería, como demuestra el número de lactobacilos hallados, entre los 50 gér./ml. y 680 gér./ml.

Este hecho ya fué indicado por NAYLOR y SHARPE (1958), al comprobar que existe en las queserías una microflora residente y permanente, que puede variar de unas fábricas a otras, de acuerdo con las distintas condiciones ecológicas en ellas reinantes.

Nuestros datos confirman que los enterococos aparecen como los microorganismos no esporulados más termorresistentes contenidos en la leche y que escapan en mayor número a la pasteurización. Hecho ya comprobado por MARMOL y col., (1977).

Finalmente, los micrococos y estafilococos desaparecen - prácticamente de la leche una vez pasteurizada. No obstante, en el queso de 4 meses estos grupos llegan a alcanzar los 8.000 gér./g., lo que claramente indica que existe una recontaminación de la cuajada a lo largo del proceso de elaboración, teniendo su origen los focos de contaminación probablemente en la salmuera.

En elaboraciones industriales éstas contaminaciones fueron detectadas en forma más acusada por ROMAN (1975) en el queso Manchego y MARMOL (1976) en el queso del Roncal.

En la Figura VI.1, se comparan los resultados del recuento de grupos microbianos en el queso de Mahón artesano, y en el fabricado con "starter" a los 4 meses de afinado. Destaca una notable similitud en la proliferación de la microflora láctica de ambos tipos de queso. Lo que puede ser interpretado en el sentido de que la carga inicial de estreptococos y lactobacilos presentes en la leche, o añadidos en el "starter", no influye marcadamente en la evolución posterior de estas bacterias.

Los valores alcanzados por el resto de los grupos microbianos, indican que en los quesos fabricados con leche pasteurizada hay un notable descenso en la tasa de proliferación de los mismos.

En una revisión crítica de los resultados del análisis quí

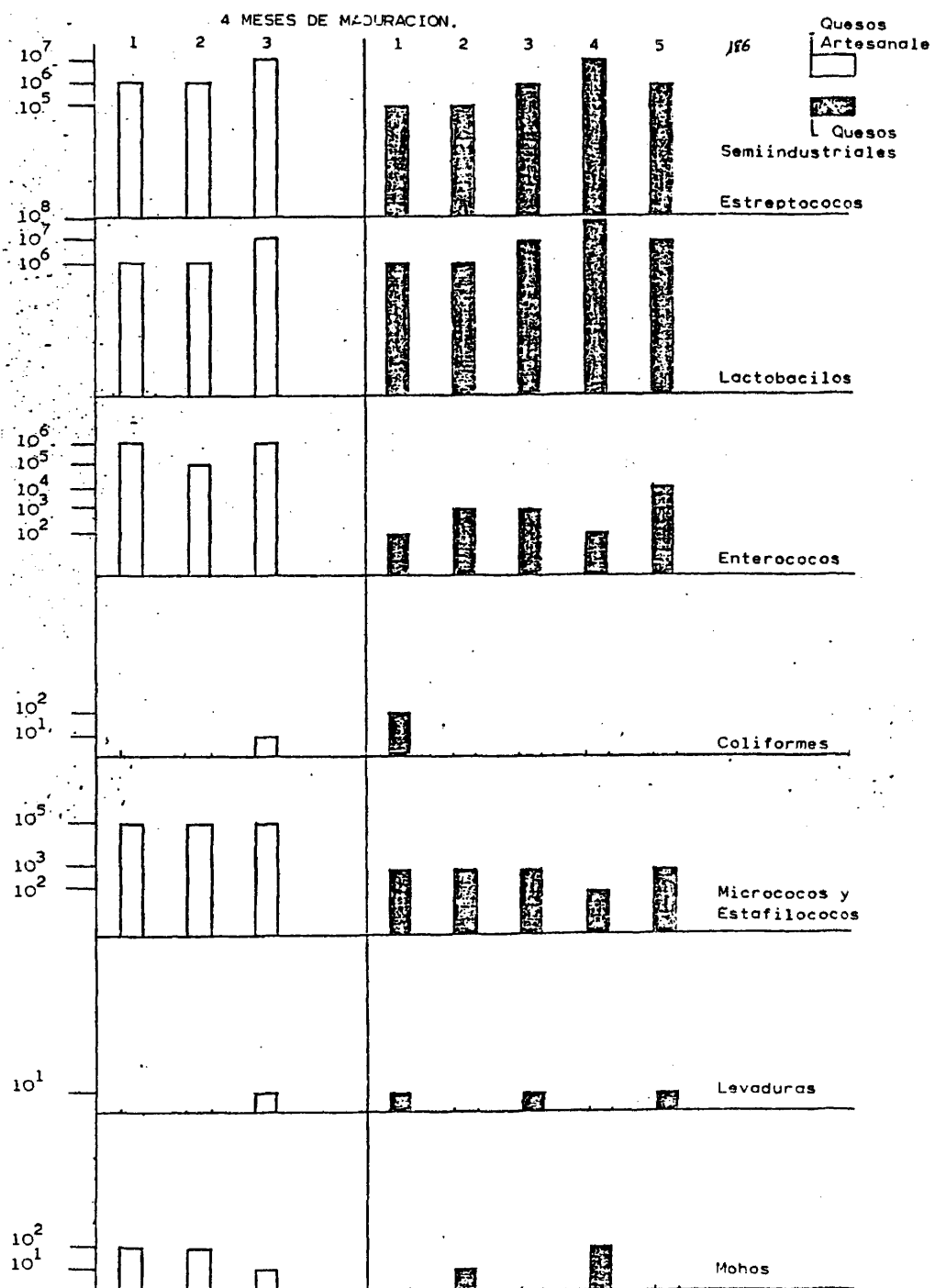
mico obtenidos en estas experiencias, los valores del pH alcanzados en el proceso (entre 5,0 y 5,31), pueden considerarse normales para el período de maduración considerado.

Los valores máximos del extracto seco -(64,26% y 62,10%)- en los lotes de quesos nº 1 y nº 5, respectivamente, se consideran excesivos y están en consonancia con la textura de los mismos; hecho que también se refleja en la escasa puntuación por éstos alcanzada. La excesiva dureza de estos quesos, hay que atribuirla al trabajo manual de la cuajada o maldeo previo al prensado.

En relación con la materia grasa en el extracto seco, se observa que en todos los casos es superior al 40%, catalogándose los quesos nº 1, nº 3 y nº 4 como quesos grasos, en tanto que el nº 2 y el nº 5 se consideran extragrasos, de acuerdo con la clasificación adoptada por el Código Alimentario Español.

Por último, pasamos a contemplar los resultados del análisis sensorial que determina la calidad organoléptica del queso. Se observa la plena demostración de la contribución microbiológica a la calidad organoléptica; la cual corre a cargo de los dos "starters" elaborados con mayor diversidad de especies.

El carácter organoléptico más destacable e importante, según el baremo establecido, corresponde al sabor, que, junto con el olor están más directamente relacionados con la actividad microbiana.



Ya anteriormente otros autores, como SHERWOOD (1939), LANE y HAMER (1953), comprobaron que la adición de cepas de lactobacilos a la leche pasteurizada, conducían a quesos con sabor más intenso. El trabajo experimental (LANE y HAMER, 1953) se realizó utilizando diversas cepas, precisamente de Lactobacillus casei, comprobando su efecto sobre la descomposición de la materia nitrogenada, y el incremento del sabor en el queso Cheddar fabricado con leche pasteurizada.

SOROKIN (1967), determinó un notable incremento en la liberación de ácidos grasos en el queso, cuando a un "starter" formado por diversas cepas de Streptococcus cremoris, se añadían también cepas de lactobacilos.

La textura es el carácter lactológico del queso más íntimamente ligado a una correcta tecnología; y dentro de ésta, la dureza determina con amplitud todo el carácter, ya que sobreponiéndose a los otros (elasticidad, plasticidad, etc.), los llega a eliminar completamente. En la técnica del moldeado se ha tratado de imitar la elaboración "ritual" llevada a cabo por los payeses en Menorca, y quizás las presiones hayan resultado excesivas particularmente en los lotes nº 1 y nº 5.

El color puede considerarse como un atributo que aunque no independiente de la flora microbiana, sí está más influenciado - por otros factores de fabricación, como por ejemplo la adición de

colorantes autorizados. La mayor puntuación de éste atributo en los lotes nº 3 y nº 4, puede ser debida circunstancialmente, al mayor número de carotenos presentes en la leche que sirvió para la elaboración de los mismos.

VI.5. CONCLUSIONES

Como continuación y finalidad aplicada de los resultados del trabajo microbiológico expuesto en los Capítulos anteriores, hemos llegado a la elaboración de 5 "starters", "fermentos", ó "cultivos iniciadores" distintos, con diferentes cepas bacterianas aisladas de queso de Mahón artesanal. Con cada uno de ellos, se ha procedido a la fabricación de quesos en planta piloto, partiendo de leche pasteurizada, y aplicando la misma tecnología.

Del análisis de los resultados microbiológico, químico, y sensorial de los quesos artesanos y los elaborados con "starters", hemos llegado a las conclusiones siguientes:

1º) En quesos artesanos y semi-industriales, de 4 meses de maduración, los crecimientos alcanzados por la microflora láctica, son similares; por tanto, la proporción inicial de gérmenes lácticos de la leche cruda, o añadidos en el "starter", no influye, por lo menos de forma decisiva, en la evolución posterior de estas bacterias.

2º) Los enterococos y las bacterias halófilas (micrococos y estafilococos), también se encuentran presentes en los quesos al final de la maduración, pero en proporción notablemente inferior en los elaborados de forma controlada; siendo obviamente su-

periores las tasas de estos microorganismos en los quesos artesanos.

3º) El resto de los grupos microbianos investigados -bacterias coliformes, levaduras y mohos- puede considerarse prácticamente ausente al término del afinado en los quesos semi-industriales, hecho que no ocurre en todos los casos considerados de -quesos artesanos.

4º) No existen diferencias muy significativas en los valores de pH en dicho período, así como tampoco en los de extracto seco, y materia grasa.

5º) La puntuación más elevada, asignada a los lotes de queso nº 3 y nº 4, sugiere la idea de que la contribución fundamental a la calidad organoléptica del queso de Mahón, ha de correlacionarse con el uso del "starter" que contiene mayor número de especies.

6º) Como consecuencia, postulamos, para la elaboración industrial del queso de Mahón, el uso de un "starter" constituido por las cepas que hemos seleccionado, correspondientes a las especies:

1. Streptococcus lactis
2. Lactobacillus plantarum

3. Lactobacillus casei var. casei
4. Lactobacillus casei var. alactosus

Estas cepas aparecen sigladas en este trabajo como:

1. M-2-Q-19
2. M-1-Q₁-21
3. M-2-Q₃-4
4. M-2-Q₄-22

y se hallan conservadas por liofilización en el banco de microorganismos de la colección bacteriana del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C.

171

RESUMEN

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL PROCESO MADURATIVO DEL QUESO DE MAHÓN.
ELABORACION DE UN "STARTER" PARA SU FABRICACION A PARTIR DE LECHE
PASTERIZADA.

La finalidad de este trabajo de investigación abarca tres puntos fundamentales:

Llegar a un exhaustivo conocimiento de los microorganismos que intervienen en el proceso de maduración espontánea del queso de Mahón artesanal, tanto desde el punto de vista taxonómico como fisiológico y técnico.

Establecer las prioridades y porcentajes de su participación en el proceso fermentativo.

Basados en los resultados conseguidos en los dos apartados anteriores llegar a la consecución de un "starter" adecuado con el que producir la elaboración de quesos en condiciones biológicas y fisicoquímicas controladas, partiendo de leche pasteurizada.

Para ello, se han estudiado tres fabricaciones de queso de Mahón artesano, procedentes de puntos de distinta localización geográfica dentro de la isla de Menorca, a lo largo de cuatro meses de maduración espontánea.

La microflora láctica identificada está formada por las es-

pecies: Streptococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei var. casei, Lactobacillus casei var. alactosus, Lactobacillus casei var. rhamnosus y Leuconostoc lactis.

El grupo fisiológico de los enterococos (Estreptococos del Grupo D de Lancefield) identificados, está constituido por las especies: Streptococcus durans, Streptococcus faecalis var. faecalis, Streptococcus faecalis var. liquefaciens y Streptococcus faecium.

La microflora de levaduras en el interior del queso de Mahón la integran las especies: C. rugosa, Tr. capitatum, Sacch. delbrueckii, Sacch. itálicus, T. inconspicua, T. sphaerica, Rh. rubra, C. lipolytica y Deb. hansenii.

En el estudio de la evolución de la microflora se observa un predominio de gérmenes lácticos, que alcanzan su máximo numérico en el queso de un día o en el de 30 días de maduración. Existen asimismo poblaciones importantes de enterococos, bacterias coliformes, micrococos y estafilococos.

Atendiendo a la capacidad de transformación de la lactosa en ácido láctico (actividad o poder acidificante) de Streptococcus lactis y a otras actividades enzimáticas -fundamentalmente proteolíticas y lipolíticas- de diferentes especies del gén. - Lactobacillus, se han seleccionado las cepas más idóneas para constituir cinco "starters". Con ellos se han fabricado cinco lotes

de queso, en planta piloto, partiendo de leche pasteurizada; y de los resultados del análisis sensorial de los mismos, se postula - la conveniencia de usar, para la elaboración industrial controlada del queso de Mahón, aquél que está constituido por las cepas seleccionadas por nosotros de las especies: Streptococcus lactis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei var. casei y Lactobacillus casei var. alactosus.

B I B L I O G R A F I A

ABD-EL-MALEK Y., GIBSSON, T. (1948)

"Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk".
J. Dairy Res., 15, 233.

ABD-EL-MALEK Y., GIBSSON, T. (1948)

"Studies in the bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci".
J. Dairy Res., 15, 249.

ACCOLAS J.P., MELCION D., VASSAL L. (1978)

"Study on the surface microflora of Gruyère and Beaufort cheeses".
XX Int. Dairy Congr., vol. E, 762.

ALFORD J.A., FRAZIER W. C. (1950)

"Occurrence of micrococci in Cheddar cheese made from raw and from pasteurized milk".
J. Dairy Sci., 33, 107.

ALFORD J.A., FRAZIER W. C. (1950)

"Effect of micrococci on the development of flavor when added to Cheddar cheese made from pasteurized milk".
J. Dairy Sci., 33, 115.

BARNETT J.A., PANKHURST R.J. (1974)

"A new key to the yeast"
North Holland Publishing Company. Amsterdam-London.

BARRIT M.M. (1936)

"The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol".
J. Path. Bacteriol., 42, 441.

BATTIOSTI B., BOTTAZZI V. (1972)

"Microbiology of Grana cheese. VIII. Citrate fermenting lactobacilli in Grana cheese".

Scienza Technol., Lattiero Casearia. 23, 59.

BERGERE J. L. (1968)

"Production massive de cellules de streptocoques lactiques. III. Production de différentes souches en culture à pH constant".

Le Lait, 48, 131.

Van BEYNUM J., PETTE J. W. (1936)

"De beteeknis der melkzuurbacterien bij de boteraromavorming".

Versl. Landbouwk. Ond., 42, 361.

BODINI T., GIUCCIARDI A., CRAVERI R. (1969)

"Microbiological and chemical study of some soft cheeses, and the identification of the yeast and fungi".

Dairy Sci., Abstr., 32, 3452.

BOEKHOUT F. W. J., OTT DE VRIES J. J. (1919)

"Aromabildner bei der rahmsäuerung".

Zentralblatt f. Bakteriologie, 49, 373.

BOTTAZZI V. (1959)

"Pediococci in Parmesan cheese".

Il Latte, 33, 21.

BOTTAZZI V. (1960)

"The microbiology of Parmesan cheese. Part II. Pediococcal microflora during ripening".

Annali Microbiol., Milano, 10, 57.

BRANDL E., ZIZER T. (1973)

"Über die spaltung aromatischer ester durch präparate von mikroorganismen mit lipolytischer und proteolytischer aktivität".
Ost Milchw., 28 (12), 15.

BUCHANAN R. E., GIBBONS N. E. (1974)

Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 8 th.ed. Waverley Press Inc., Baltimore.

BURGOS J., LOPEZ A., SALAS TREPAT F. J. (1971)

"Maduración del queso de Cabrales. Microflora. I. Lactobacilos."
Anales Fac., Vet., León, 17, 109.

CAPRIOTTI A. (1957)

"Lievitti nella maturazione dei formaggi. I. Nota : Formaggio Limburgo".
Il Latte XXXI, 235, 332.

CARINI S., RESMINI P. (1968)

"Caseinolytic activity of Lactic bacteria. I. Methods for the determination of the caseinolytic and endoprotease activities".
Ann., Microbiol., Enzimol., 16 (3-6), 139.

CARINI S., KADERAVEK G., DE GREGORI A., INVERNIZZI F. (1971)

"Il formaggio Robiola e le sue caratteristiche chimiche e microbiologiche".
Il Latte, 45, 615.

CARINI, S., LODI R., BRAGHINI T., FEDELLI E. (1975)

"Robiola cheese and its chemical and microbiological characteristics".
Dairy Sci., Abstr., 34, 4225.

CARINI S., LODI R. (1975)

"L'attività lipolitica dei lieviti nella maturazione dei prodotti lattiero-caseari".

L'Industria del Latte 11 (3-4), 3.

CHAPMAN G. H. (1945)

"The significance of sodium chloride on studies of staphylococci".

J. Bacteriol., 50, 201.

CHAZAUD M. T. (1977)

"Problèmes posés par les milieux sélectifs pour streptocoques lactiques. Stabilité des levains industriels".

Revue Lait., France., 358, 605.

CLARK W. S., REINBOLD G. W. (1967)

"The low temperature microflora of young Cheddar cheese".

J. Milk Food Technol., 30, 54.

COGAN T. M. (1980)

"Les levains lactiques mésophiles. Une revue".

Le Lait 597, 397.

COLLINS E. B. (1962)

"Culture identity and selection. Symposium on lactic starter cultures".

J. Dairy Sci., 45, 1263.

COMPAIRE C. (1969)

"Quesos. Tecnología y control de calidad".

Publicaciones de Capacitación Agraria. M^o de Agricultura.

CONN H. W. (1889)

"Bacteria in milk, cream and butter and the ripening of cream".

Conn., Agric., Exp., Sta., Ann., Rep., 2, 57.

COWMAN R. A., SPECK M. L. (1965)

"Ultra low temperature storage of lactic streptococci".
J. Dairy Sci., 48, 1531.

CREAMER L. K. (1970)

"Protein breakdown in Gouda cheese".
N.Z.J. Dairy Sci., Technol., 5, 152.

DAHLBERG A. C., KOSIKOWSKI F. V. (1948)

"The development of flavor in american Cheddar cheese made from
pasteurized milk with Streptococcus faecalis starter".
J. Dairy Sci., 31, 275.

DALE G. (1972)

"Moisissures et levures de la flore du fromage de Saint-Nectaire".
Rev., Lait., Frçse., 296, 199.

DAWSON D. J., FEAGAN J. T. (1957)

"Bacteriology of Cheddar cheese. A study of starter organism in -
manufacture and maturing".
J. Dairy Res., 24 (2), 210.

DE MAN J. C., ROGOSA M., SHARPE E. (1960)

"A medium for the cultivation of lactobacilli".
J. Appl., Bacteriol., 23, 130.

DEIANA P., FATICHENTI F., FARRIS G. A. (1977)

"Indagini microbiologiche sul latte e sul formaggio di capra in
Sardegna. Nota I : I lieviti".
Ind., del Latte, 13, 49.

DELESPAUL G., GUEGUEN M., LENOIR J. (1973)

"La flore fongique superficielle des fromages de Saint-Nectaire et
Tome de Savoie. I. Son evolution au cours de l'affinage".
Revue Lait., Frçse., 313, 715.

DEMETER K. J. (1969)

"Lactobacteriología".

Editorial Acribia. Zaragoza. España.

DEMETER, K. J., ELBERTZHAGEN H. (1971)

"Elementos de Microbiología Lactológica".

Editorial Acribia. Zaragoza. España.

DESMAZEAUD M. J., DEVOYOD J. J. (1974)

"Mise en évidence et caractérisation partielle de différentes peptidases chez Sacch. lactis".

Annales de Biologie Animale, Bioch., Biophys., 14, 327.

DEVOYOD J. J. (1969)

"La flore microbienne du fromage de Roquefort. II. Staphylocoques et microcoques".

Le Lait, 481-482, 20.

DEVOYOD J. J., MULLER M. (1969)

"La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les leuconostocs. Influence de différentes microorganismes de contamination".

Le Lait, 49, 369.

DEVOYOD J. J. (1969)

"La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques".

Le Lait, 489-490, 637.

DEVOYOD J. J., DESMAZEAUD M. (1970)

"Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. I. Action des entérocoques vis à vis des streptocoques lactiques et de leuconostocs. Nature de substances stimulantes produites par Streptococcus faecalis var. liquefaciens".

Le Lait, 497, 374.

DEVOYOD J. J. (1970)

"La flore microbienne du fromage de Roquefort. V. Les lactobacilles".
Le Lait, 495-496, 1.

DEVOYOD J. J., SPONEM D. (1970)

"La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures".
Le Lait, 498, 524.

DEVOYOD J. J., DESMAZEAUD M. J. (1971)

"Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. Action des enterocoques et des levures fermentant le lactose vis à vis des Lactobacilles".

Le Lait, 51, 399.

DEVOYOD J. J., DESMAZEAUD D., ASSEMAT L., AUCLAIR J. (1972)

"Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. IV. Action inhibitrice des microcoques caséolytiques sur l'ouverture du caillé".

Le Lait, 515-516, 297.

DO NGOC M., LENOIR J., CHOISY D. (1971)

"Les acides aminés libres des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté".

Revue Lait., France., 288, 447.

DUCASTELLE A., LENOIR J. (1965)

"Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. I. Son évolution au cours de la maturation".

Le Lait, 447, 371.

DUCASTELLE A., LENOIR J. (1965)

"Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage Saint-Paulin. II. Ses espèces dominantes".

Le Lait, 45, 509.

DUCASTELLE A., LENOIR J. (1969)

"Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage type Saint-Paulin. III. Son activité proteolytique".
Le Lait, 489-490, 615.

DUCLAUX E. (1883)

"Principes de Laiterie".
Paris. France.

EFTHYMIU C.J., BACASH P., LABOMBARDI V. J., EPSTEIN D.S. (1974)

"Improved isolation and differentiation of enterococci in cheese".
Appl., Microbiol., 28 (3), 417.

ELLIKER P.R., ANDERSON A.W., HANNESSON G. (1956)

"An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli".
J. Dairy Sci., 39, 1611.

EVANS A.C., HASTING E.C., HART E.B. (1914)

"Bacteria concerned in the production of characteristic flavor in cheese of the Cheddar type".
J. Agric., Res., 2, 167.

FATICENTI F., FARRIS G.A., DEIANA P. (1977)

"L'evoluzione della microflora blastomicetica nel Fiore Sardo".
Industria del Latte, 13, 11.

FATICENTI F., DEIANA P., FARRIS G.A. (1979)

"Impiego di uno starter misto di fermenti lattici e lieviti in una nuova tecnologia di fabbricazione di formaggio di capra a pasta - molle".
Industria del Latte, 2, 13.

FRAZIER W.C. (1926)

"A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria".
J. Infec., Dis., 39, 302.

FREUDENREICH E. DE (1901-1902)

Revue General du Laiterie. Paris.

FRYER T.F., SHARPE M.E. (1966)

"Pediococci in Cheddar cheese".
J. Dairy Res., 33, 325.

FRYER T.F. (1969)

"Manufacture of Cheddar cheese in new equipment".
Dairy Sci., Abstr., 31 (417), 68.

GARVIE E.I. (1960)

"The genus Leuconostoc and its nomenclature".
J. Dairy Res., 27, 283.

GARVIE E.I. (1967)

"Leuconostoc oinos sp. nov."
J. Gen., Microbiol., 48, 431.

GIBSSON T., ABD-EL-MALEK Y. (1945)

J. Dairy Res., 14, 35.

GREEN M.L., FOSTER P.M.D. (1974)

"Comparison of rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheese made with calf rennet and swine pepsin as coagulants".
J. Dairy Res., 40, 269.

GRIPON J.C., DESMAZEAUD M.J., LE BARS D., BERGERE J.L. (1975)
"Etude du rôle de microorganismes et des enzymes au cours de la
maturation des fromages. II. Influence de la presure commerciale".
Le Lait, 548, 502.

GRIPON J.C. (1978)
"Levures et moisissures dans la preparation des produits laitiers".
XX Congres International de Laiterie, Paris.

HAMMER B.N., BAILEY D.E. (1919)
"The volatile acid production of starters and of organisms isolated
from them".
Iowa state Coll., Res., Bulletin nº 55.

HAMMER B.N. (1926)
"Les levures et les produits de laiterie".
J. Dairy Sci., 9 (6), 507

HISCOX E.R., ROWLAND S.J., WOLF C.J., JACOB M. (1941)
"Cheese. Some recent chemical and physicochemical findings".
Chemical and Industry 411, 413.

IÑIGO B., ROSSI J. (1957)
"Gli agenti microbici nella maturazione della mozzarella".
Il Latte, XXXI (6), 3.

IÑIGO B., ARROYO V. (1960)
"Los agentes de fermentación en la zona de Montilla-Moriles".
Rev. Ciencia Aplicada, 72, 18.

IÑIGO B., VAZQUEZ D. (1964)
"Los agentes de fermentación vínica en las zonas del Condado y
El Aljarafe".
Rev., Agroq., Tec., Alimentos, 4 (2), 246.

JACQUET J., LENOIR J. (1969)

"Mecanismes intimes de l'affinage des fromages".

Economie et Medicine Animales, 10, 38.

JENSEN J.P., REINBOLD G.M., WASHAM C.J., VEDAMUTHU E.R. (1975)

"Role of Enterococci in Cheddar cheese : Proteolytic activity and lactic acid development".

J. Milk Food Technol., 38, 37.

KERNEN A.E., van KANDLER O. (1966)

"Lactobacillus flora of Tilsit cheese".

Milchwissenschaft, 21, 436.

KLUYVER A.J., DONKER H.L. (1935)

"Die bakterien zuckervergarungen".

Ergeb., Enzymforsch, 4, 436.

KOSIKOWSKI F.V. (1978)

"Cheese and fermented milk foods".

Published by F.V. Kosikowski and Associates. Brooktondale, New York.

LAMBERET G., LENOIR J. (1972)

"Aptitude de l'espece Penicillium caseicolum à la production d'enzymes proteolytiques".

Le Lait, 52, 513.

LANE E.B., HAMMER D.W. (1935)

"Bacteriology of cheese. Effect of L. casei on the nitrogenous des composition and flavor development in Cheddar cheese made from pas teurized milk".

Iowa state Agr., Exp., Sta., Bulletin 190.

LAVIOLETTE P. (1977)

"Sur une microméthode d'identification des activités enzymatiques."
Revue de quelques résultats dans divers domaines d'application".
(Communication personnelle).

LAWRENCE R.C., THOMAS T.D., TERZAGHI B.E. (1976)

Reviews of the progress of Dairy Science : Cheese starters.
J. of Dairy Res., 43, 141.

LENOIR J. (1962)

"La flore microbienne du Camembert et son évolution au cours de
la maturation".
C.R. Acad., Agric., 48, 392.

LEWIS J.E. (1956)

"A new approach to the problem of phage control during the produc-
tion of commercial cheese starters".
J. Soc., Dairy Technol., 9, 123.

LODDER J., KREGER VAN RIJ N.J.W. (1967)

"The yeast. A taxonomic study".
North Holland Publishing Company. 2^e eth., Amsterdam-London.

LODDER J. (1970)

"The yeast. A taxonomic study"
North Holland Publishing Company. 2^e eth., Amsterdam-London.

MABBIT L.A., CHAPMAN H.R., SHARPE E. (1959)

"Making Cheddar cheese on a small scale under controlled bacte-
riological conditions".
J. Dairy Res., 26, 105.

MABBIT L.A. (1961)

"Experiments in cheesemaking without starter".

J. Dairy Res., 22, 365.

MABBIT L.A., ZIELINSKA M. (1965)

"The use of selective medium for the enumeration of lactobacilli in Cheddar cheese".

J. Appl., Bact., 19, 95.

MARMOL M.P. (1976).

"Estudios sobre el queso del Roncal".

Tesina de Grado, Universidad de Granada.

MARMOL M.P., ORDOÑEZ J.A. (1977).

VI Congreso Nacional de Microbiología, Santiago de Compostela.

MATUSZEWSKI T., PIJANOWSKI E., SUPINSKA J. (1936).

"Streptococcus diacetylactis n.sp. i jego zastosowanie przy wyrobie masła".

Polish Agric., Forest Annual, 36, 1.

MAXA V., JICINSKY V. (1956)

14 th. International Dairy Congress, 2, 345.

MAZE P. (1910)

"Technique fromagère".

Annal., Inst., Pasteur, 24, 395.

MILLER I., KANDLER O. (1967)

"Eiweißabbau und Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch".

Milchwissenschaft, 22, 150.

MILLET L., MELCION D., DEVOYOD J.J. (1974)

"La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. III. Rôle de levures dans la maturation de la "Tome".
Le Lait, 54, 616.

MOSSEL D.A.A., VISSER M., MENGENIN A. (1962)

"A comparison of media used for the enumeration of moulds and yeast in foods and beverages".
Lab., Pract., 11, 109.

NAYLOR J., SHARPE M.E. (1958)

"Lactobacilli in Cheddar cheese. I. The use of selective media for isolation and serological typing for identification".
J. Dairy Res., 25, 92.

NAYLOR J., SHARPE M.E. (1968)

"Lactobacilli in Cheddar cheese. III. The source of lactobacilli in cheese".
J. Dairy Res., 25, 431.

NELSON P.E., BABEL F.J. (1947)

Report and Agricol., Research for the Year Ending In., 30, 182.

NUÑEZ M., MARTINEZ MORENO J.L. (1976)

"Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos artesanales".
Anales I.N.I.A. Ser., General nº 4, 11, 31.

NUÑEZ M. (1976)

"Flora microbiana del queso Manchego. V. Leuconostoc".
Anales I.N.I.A. Ser., General nº 4, 67, 74.

NUÑEZ M. (1976)

"Flora microbiana del queso Manchego. VI. Pediococos".
Anales I.N.I.A. Ser., General nº 4, 75, 81.

NUÑEZ M. (1976)

"Flora microbiana del queso Manchego. VII. Micrococcos."
Anales I.N.I.A. Ser. General nº 4, 83, 92

NUÑEZ M. (1978)

"Microflora of Cabrales cheese: Changes during maturation"
J. Dairy Res., 45, 501.

NUÑEZ M., MEDINA M. (1979)

"La flore lactique du fromage bleu de Cabrales".
Le Lait, 558, 497.

NUÑEZ M., NUÑEZ J.A. (1979)

"Preparación de fermentos concentrados liofilizados para queso Manchego. Inoculación directa en la cuba de coagulación".
VII Congreso Nacional de Microbiología. Cádiz.

NUÑEZ M., MEDINA M., GAYA P., DIAS-AMADO C. (1981)

"Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales".
Le Lait, 61, 62.

OHMIYA K., SATO Y. (1970)

"Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria.
Part XI. The ripening of aseptic rennet curd by Streptococcus cremoris and Lactobacillus helveticus".
Agr., Biol., Chem., 34, 1463.

ORDOÑEZ J.A. (1974)

"Microbiología y bioquímica del queso tipo "Ulloa" y preparación de un fermento para su elaboración a partir de leche pasteurizada".
Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Fac. de Veterinaria.

ORDOÑEZ J.A., BURGOS J. (1977)

"Etude de la variété de fromage "Ulloa". II. Préparation d'un levain pour sa fabrication à partir de lait pasteurisé".

Le Lait, 565-566, 278.

ORDOÑEZ J.A., BARNETO R., RAMOS M. (1978)

"Studies on Manchego cheese ripening in oliva oil".

Milkwissenschaft, 32, 531.

ORDOÑEZ J.A., MASSO J.R., MARMOL M.P., RAMOS M. (1980)

"Contribution à l'étude du fromage Roncal"

Le Lait, 595-596, 283.

ORLA - JENSEN S. (1905-1906)

Revue General de Laiterie. Paris.

ORLA - JENSEN S. (1943)

"The lactic acid bacteria".

Einar Munksgaard: Copenhaguen.

OTOGALLI G., BIANCHI B., RONDININI G., SARACHI S., RESMINI P.,

GALLI A., SALVADORI P., VOLONTERIO G. (1971)

"Chemical and microbiological study of ripening of Gongonzola cheese"

Dairy Sci., Abstr., 34, 4226.

OTOGALLI G., GALLI A. (1972)

Scienza e Techn., Lattiero Casearia, 23, 363.

OVERCAST W.W., ALBRECHT T.W. (1952)

"Gas production in Cheddar cheese caused by Leuconostoc citrovorum".

J. Dairy Sci., 35, 554.

PERRY K.D., SHARPE M.E. (1960)

"Lactobacilli in raw milk and Cheddar cheese"

J. Dairy Res., 27, 267.

PERRY K.D. (1961)

J. Dairy Res., 28, 221.

PETRICIC A. (1960)

"Study of Geotrichum candidum and its rôle in the ripening of soft cheese".

Dairy Sci., Abstr., 23, 3525.

PETTE J. (1946), Tomado de LODDER en The Yeast.

"A taxonomic study"

North Holland Publishing Company. Amsterdam-London (1957), pág.530

POZNANSKI S., RYMASZEWSKI J. (1965)

"Proteolysis during the ripening of Edam cheese with the participation of some bacteria strains. I. Changes in particular nitrogen fractions".

Milchwissenschaft, 20, 14.

PROKS J., DOLEZALEK J., PECH Z. (1959)

15 th. International Dairy Congress, 2, 742.

RAPP M. (1969)

"Über das Eiweißabbauvermögen von Milchsäurebakterien"

Milchwissenschaft, 24, 208.

REDDY M.S., VEDAMUTHU E.R., REINBOLD G.W. (1971)

"A differential broth for separating the lactic streptococci".

J. Milk Food Technol., 34, 43.

REITER B., SOROKIN Y., PICKERING A., CHAPMAN H.R., LAWRENCE R.C.,
SHARPE M.E. (1967)

"The effect of the microbial flora on the flavor and free fatty
acid composition of Cheddar cheese".

J. Dairy Sci., 34, 257.

ROBERTSON P.S. (1966)

"Some cheese starter handling techniques".

Dairy Industries, 31, 805.

ROGOSA M., MITCHEL J.A., WISEMAN R.F. (1951)

"A selective medium for the isolation and enumeration of oral
and fecal lactobacilli".

J. Bacteriol., 62, 132.

ROMAN M. (1975)

"Étude de la flore microbienne du fromage espagnol Manchego. I.
Son evolution au cours de la fabrication et de l'affinage".

Le Lait, 547, 401.

ROSE A.H. (1981)

"Producción microbiológica de alimentos y bebidas".

Investigación y Ciencia, Vol. 62, 67.

ROSINI G. (1976)

"I lieviti in formaggi "Pecorino" ottenuti con cogli tradizionali
e microbici".

Ann., Fac. Agrar., Perugia, 31, 435.

SANDINE W.E., RADICH P.C., ELLIKER P.R. (1972)

"Ecology of the lactic streptococci: A review".

J. Milk Food Technol., 35 (3), 176.

SCHMIDT J.L., LENOIR J. (1978).

"Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. Son évolution au cours de la maturation".

Le Lait, 557, 335.

SHARPE M.E., BRINDLEY M. (1956)

"Lactobacilli isolated from the surface of normal and slipcoat Stilton cheese".

J. Dairy Res., 23, 361.

SHARPE M.E. (1961)

"Rôle des Lactobacillus dans le produits alimentaires".

Anal., Inst., Pasteur Lille, 12, 133.

SHARPE M.E., FRYER T., SMITH D.G. (1966)

"Identification of the lactic acid bacteria. Identification methods for microbiologist".

Ed., Academic Press. London.

SHARPE M.E. (1979)

"Lactic acid bacteria in the dairy industry".

J. Soc., of Dairy Technol., 32 (1), 9.

SHERWOOD I.R. (1939)

"Lactic acid bacteria in relation to cheese flavours. III. Observations on the inoculation of the milk employed in cheese manufacture with lactobacilli".

J. Dairy Res., 10, 449.

SLANETZ L.W., BARTLEY C.H. (1957)

"Numbers of enterococci in water determined by the membrane filter technique with and improved medium".

J. Bacteriol., 74, 591.

SOROKIN YU YU (1967)

"Role of some strains of lactobacilli in free fatty acid formation during cheese ripening".

Trudy Vologod., Moloch., Inst., 55, 44.

STORCH V. (1919)

"Fortsatte undersfgelsen over fremstillingen at syrevaektere".

102 de Beretning fra Forsogslaboratoriet, Copenhagen, Denmark.

STORCH V. (1890)

"Nogle undersfgelser over flodens syrning".

18 de Beretning fra Forsogslaboratoriet, Copenhagen, Denmark.

SYRJÄNSEN H. (1965)

"Lactobacilli in Edam cheese"

Karjantuote, 48, 487.

THATCHER F.S., SIMON W. (1956)

"A comparative appraisal of the properties of staphylococci isolated from clinical sites and from dairy products".

Can., J. Microbiol., 2, 703.

TOFTE-JESPERSEN N.J. (1974)

"Recent development in dairy starter cultures".

S. Afr., J. Dairy Technol., 6, 63.

TOKITA F., HOSONO A. (1963)

"An investigation about Limburger cheese ripening of gel filtration of Sephadex".

Milchwissenschaft, 23, 758.

TRUPER E. (1928)

"Sur les levures faisant fermenter le lactose dans le lait".

Milchwirtsch., Forschungen, 6, 351.

VEISSEYRE R. (1980)

"Lactología Técnica".

Ed., Acribia, Zaragoza, España.

VERGEADE J. (1975)

"Etude des levures du fromage Saint-Nectaire"

Thèse de Doctorat de troisième cycle. Université de Clermont-Ferrant.

VIZZARDI M. (1975)

"Microbiological study of the ripening of Taleggio cheese in mountain huts in Valsassina".

Dairy Sci., Abstr., 38, 8125.

WECKES M., VANDERPOORTEN R. (1973)

"Protein breakdown during the ripening of Herve cheese investigated by polyacrylamide gel electrophoresis".

Michwissenschaft, 28, 332.

WILSON G.S. (1935)

"Medical Research Council Special".

Reports Series n° 206. London: H.M.S.O.

