

- 27) SERRANO MORENO, A. (1979). Evolución de varias microfloras y su interdependencia con las condiciones físico-químicas durante la maduración del salchichón. *Alimentaria*, 100, 39-56.
- 28) STEIN, W. y MOORE, S. (1948). Photometric ninyhidrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 176, 367.
- 29) ZAIKA, L.L.; ZELL, T.E.; SMITH, J.L.; PALUMBO, S.A. y KISSINGER, J.C. (1976). The role of nitrite and nitrate in Lebanon bologna, a fermented sausage. *J. Food Sci.*, 41, 1.457-1.460.

EVOLUCION DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS DURANTE LA ELABORACION Y MADURACION DEL QUESO DE VALDETEJA ***

(MICROBIOLOGICAL CHANGES DURING THE MANUFACTURE AND RIPENING OF VALDETEJA CHEESE)

Por L. M. Gutiérrez *
 J. Carballo *
 I. Vidal **
 J. González Prieto *
 R. Martín Sarmiento *
 y A. Bernardo*

Palabras clave: Queso, maduración del queso, microbiología de los alimentos.
 Key words: Cheese, cheese ripening, food microbiology.

SUMMARY

The evolution of the main groups of microorganisms in four batches of Valdeteja (Spain) goat cheese has been studied. Counts of aerobic mesophilic bacteria (PCAS), aerobic psychrotrophic bacteria (PCAS), lactic streptococci (M-17), lactobacilli (Rogosa), leuconostocs (MSE), *Micrococaceae* (MSA), yeasts and moulds (OGY) and *Enterobacteriaceae* (VRBGA) were carried out in milk, curd (0 day, immediately after moulding) and cheese at 2, 5, 10, 17 and 27 days.

Lactic acid bacteria predominated during cheese making and ripening. Lactic streptococci and leuconostocs reached the highest levels (10^9 c.f.u./g) at 0-2 days, and lactobacilli increased up to a similar figure at 17 days. *Micrococaceae* decreased from 10^4 - 10^5 c.f.u./g in the curd to 10^2 c.f.u./g and *Enterobacteriaceae* from 10^4 - 10^5 c.f.u./g to 10^1 - 10^2 c.f.u./g. Yeast and moulds show a clear and progressive increase from 10^4 c.f.u./g at the beginning of the ripening up to 10^6 c.f.u./g.

* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.

** Dpto. de Física, Química y Expresión Gráfica. Universidad de León.

*** Este trabajo ha sido realizado en el marco de un proyecto financiado por la Consejería de Cultura y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León.

RESUMEN

Se ha estudiado la evolución de la microflora en cuatro lotes de queso de cabra de Valdeteja, tomándose muestras de leche, cuajada (día 0, inmediatamente después del moldeado) y queso a los dos, cinco, diez, diecisiete y veintisiete días de maduración. Se siguieron las variaciones experimentadas por los siguientes grupos de microorganismos: flora aerobia mesófila (P.C.A.S.), flora aerobia psicrotrofa (PCAS), estreptococos lácticos (M-17), lactobacilos (Medio de Rogosa), leuconostoc (M.S.E.), micrococos (M.S.A.), enterobacteriáceas (V.R.B.G.A.), y mohos y levaduras (O.G.Y.E.A.).

Se observó un predominio de las bacterias lácticas: los estreptococos lácticos y los leuconostocs alcanzaron valores de 10^9 u.f.c./g ya a los 0-2 días de maduración y los lactobacilos aumentaron hasta alcanzar cifras similares a los diecisiete días. Los recuentos en M.S.A. descendieron progresivamente, desde 10^4 - 10^5 u.f.c./g en la cuajada, hasta alcanzar valores muy bajos a partir del décimo día. Las enterobacteriáceas pasaron de valores iniciales en torno a 10^4 - 10^5 u.f.c./g a 10^1 - 10^2 al final del proceso madurativo. Los mohos y levaduras ($2-3 \times 10^4$ u.f.c./g en la cuajada), aumentaron paulatinamente hasta obtenerse cifras de $2-4 \times 10^6$ u.f.c./g.

INTRODUCCION

Los fenómenos implicados en la maduración del queso son de gran complejidad debido en parte a la gran diversidad de microorganismos, en constante evolución, que participan en el proceso. Ciertas especies se desarrollan y otras tienden a desaparecer, sin que exista un equilibrio microbiológico estable. El conocimiento de la flora microbiana de un queso, de su evolución a lo largo de la maduración, y de la contribución de los diversos microorganismos a este proceso tiene una importancia fundamental para la puesta a punto de una tecnología adecuada de fabricación.

El queso de Valdeteja (León) se elabora a partir de leche de cabra por procedimientos artesanales. Es un queso de corta maduración (3-4 semanas), de pasta firme, blancomarillento, ligeramente picante y con ojos en toda la masa¹. En la actualidad se obtiene exclusivamente a partir de leche no pasteurizada, por lo que el Código Alimentario Español prohíbe su comercialización. Este trabajo tiene por objeto el estudio de la evolución de los diferentes grupos de microorganismos presentes durante su maduración y constituye un estudio preliminar para la formulación de un cultivo iniciador adecuado con el fin de lograr su fabricación a escala industrial.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de las muestras

Para la realización del presente estudio se utilizaron cuatro partidas de quesos (A, B, C y D), elaboradas por artesanos de Valdeteja según el procedimiento siguiente: se calentó la leche hasta la temperatura de coagulación (37°C), se añadió cuajo comercial con un título de 1/10000 en proporción de 25 ml/100 litros de leche, se mantuvo unas horas en reposo hasta la obtención de una cuajada firme, que se cortó en trozos grandes (unos 10 cm. de lado) y posteriormente se repartió, desmenuzándola a mano, en moldes de 12 cm. de diámetro y 9 cm. de altura, provistos de varios orificios de 2

mm. de diámetro para facilitar la salida del suero. Los quesos se salazonaron en seco con aproximadamente un 3% de sal, en dos fases, por una cara al terminar el moldeo y por la otra a las cuarenta y ocho horas de sacarles del molde. Se maduraron en una bodega a $10-14^\circ\text{C}$ y humedad relativa en torno al 75-85% durante veintisiete días, volteándolos diariamente.

Toma de muestras

Se estudiaron muestras de la leche, de la cuajada (inmediatamente después del moldeado y salazonado por una cara) y de los quesos a los dos, cinco, diez, diecisiete y veintisiete días de maduración. Se utilizó cada vez un queso entero, del que se tomaron asepticamente 50 g. por medio de un sacabocados.

Homogeneizado y diluciones

Las muestras se homogeneizaron durante un minuto en un Colworth Stomacher con 200 ml. de una disolución acuosa de citrato sódico al 2% y temperatura de 40°C para facilitar la emulsión de la grasa. Se consiguió de este modo una dilución 1/5. Las diluciones decimales subsiguientes se hicieron tomando 10 ml., que se pasaron a frascos con 90 ml. de agua de peptona estéril al 0,1%.

Análisis microbiológicos

Se utilizó la técnica de siembra en todo el medio con 1 ml. de inóculo, en los siguientes grupos de microorganismos:

- Flora aerobia mesófila viable: Agar de Recuento en Placa (PCAS)³ de Oxoid incubando a 30°C .

- Flora aerobia psicrotrofa viable: Agar de Recuento en Placa (PCAS)³ de Oxoid incubando a 7°C .

- Lactobacilos: en Agar Rogosa¹⁵ de Oxoid a 30°C .

- Mohos y levaduras: en Agar Oxitetraciclina, Glucosa, Extracto de Levadura (OGY)³ de Oxoid a 22°C .

- Enterobacteriáceas: en Agar Rojo Bilis Violeta Dextrosa (VRBGA) con un 1% de glucosa⁹ de Oxoid a 37°C .

En los siguientes grupos de microorganismos, se utilizó la siembra en superficie con 0,1 ml. de inóculo.

- Estreptococos lácticos: en Agar M-17¹⁶ incubando a 30°C .

- Leuconostocs: en Agar Mayeux- Sandine- Elliker (MSE)⁸ a 22°C .

- Micrococáceas: en Mannitol Salt Agar (MSA)², de Difco, a 30°C .

Los recuentos se efectuaron en aquellas placas que presentaban un número de colonias entre treinta y trescientas, según recomendación de la norma FIL-IDF 3., 1958, m.

RESULTADOS

Los resultados de la evolución de la flora en la fabricación y maduración del queso de Valdeteja se reflejan en las gráficas 1, 2, 3 y 4, que corresponden a los lotes A, B, C y D, respectivamente.

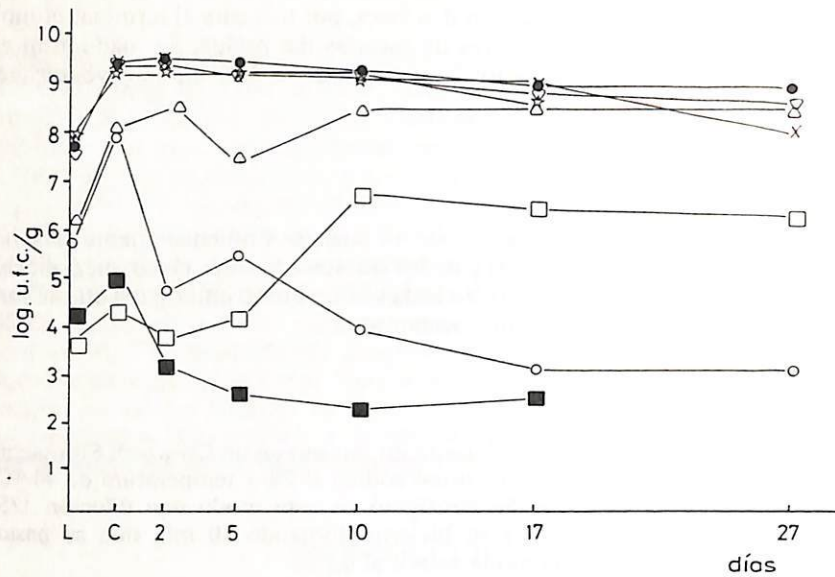


Fig. 1.- Evolución de la flora durante la maduración del queso de Valdeteja elaborado de forma artesanal. Lote A. ●-● flora mesófila total, ☆-☆ flora psicrotrofa total, △-△ lactobacilos, ▽-▽ leuconostocs, X-X estreptococos lácticos, □-□ mohos y levaduras, ○-○ enterobacteriáceas, ■-■ micrococcos.

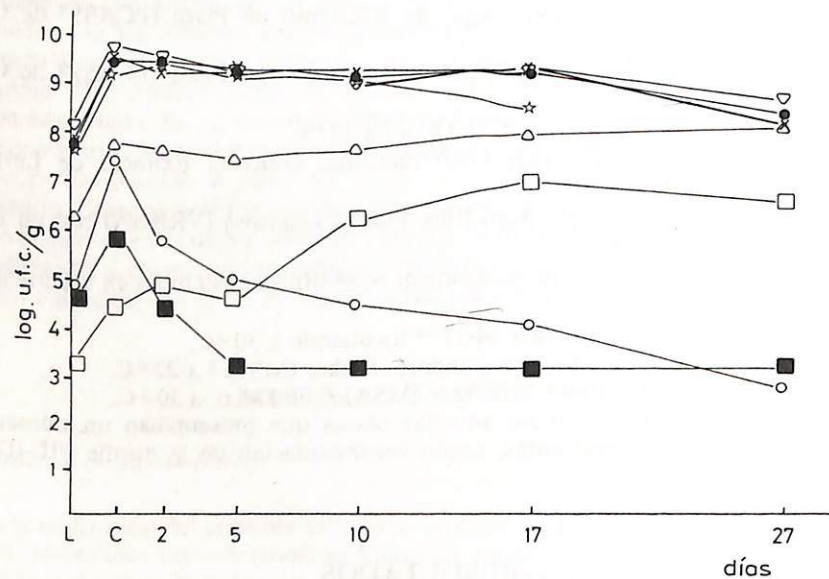


Fig. 2.- Evolución de la flora durante la maduración del queso de Valdeteja elaborado de forma artesanal. Lote B. ●-● flora mesófila total, ☆-☆ flora psicrotrofa total, △-△ lactobacilos, ▽-▽ leuconostocs, X-X estreptococos lácticos, □-□ mohos y levaduras, ○-○ enterobacteriáceas, ■-■ micrococcos.

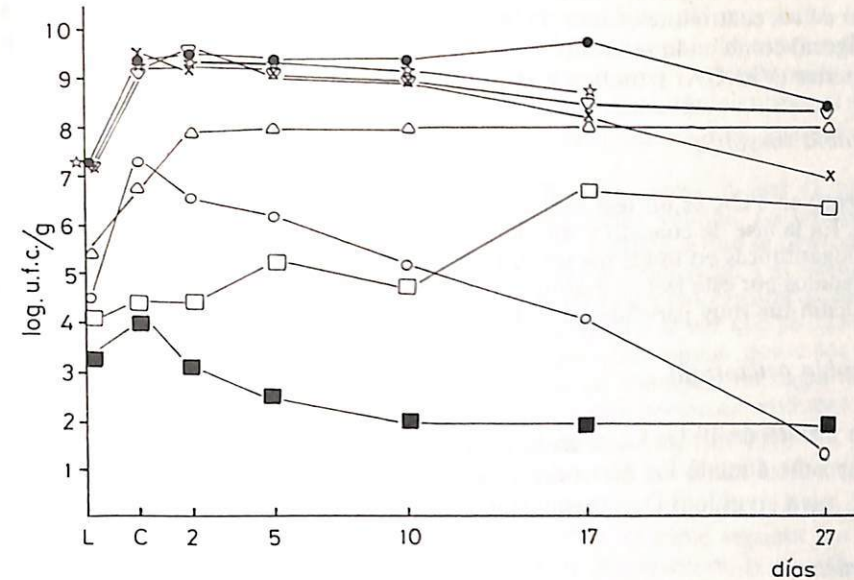


Fig. 3.- Evolución de la flora durante la maduración del queso de Valdeteja elaborado de forma artesanal. Lote C. ●-● flora mesófila total, ☆-☆ flora psicrotrofa total, △-△ lactobacilos, ▽-▽ leuconostocs, X-X estreptococos lácticos, □-□ mohos y levaduras, ○-○ enterobacteriáceas, ■-■ micrococcos.

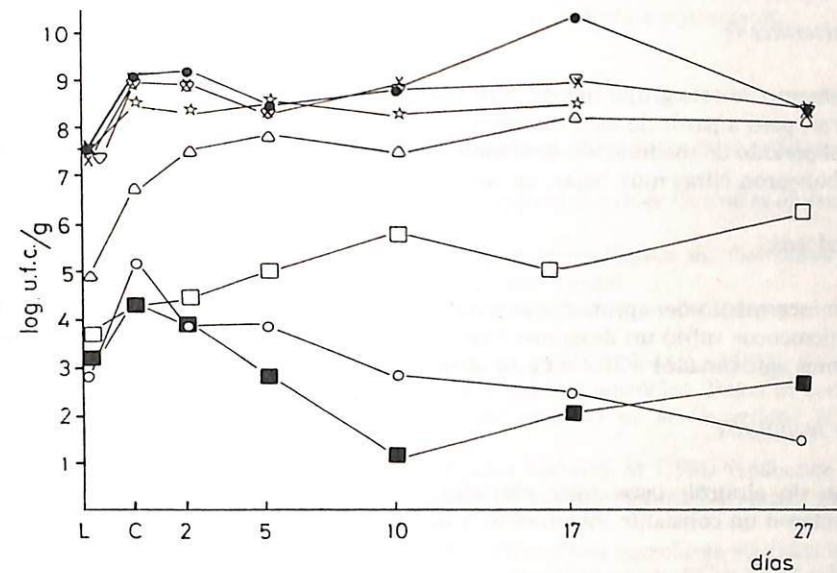


Fig. 4.- Evolución de la flora durante la maduración del queso de Valdeteja elaborado de forma artesanal. Lote D. ●-● flora mesófila total, ☆-☆ flora psicrotrofa total, △-△ lactobacilos, ▽-▽ leuconostocs, X-X estreptococos lácticos, □-□ mohos y levaduras, ○-○ enterobacteriáceas, ■-■ micrococcos.

Destaca en primer lugar la elevada carga microbiana de la leche utilizada en la fabricación de los cuatro lotes, tanto de la flora láctica de posible interés (medios M-17, MSE y Rogosa) como en lo referente a las floras aerobias mesófila y psicrotrofa (PCA), enterobacterias (VRBGA) y mohos y levaduras (OGY).

Flora aerobia mesófila

El recuento en PCA es un test indicativo de los cambios generales en la microflora del queso. En la fase de cuajado y moldeado se produjo un aumento del orden de dos unidades logarítmicas en todos los lotes. Durante la maduración, la tasa de microorganismos medidos por este test se mantuvo prácticamente constante en torno a 10^9 ufc/g y su evolución fue muy parecida en todos los lotes estudiados.

Flora aerobia psicrotrofa

Alcanza niveles de 10^9 u.f.c./g en la cuajada, en los que se mantiene aproximadamente constante durante los diez primeros días de maduración, a partir de los cuales comienza, salvo en el lote D, a manifestarse cierto descenso.

Flora láctica

En la cuajada se observa ya un incremento de 1,5-2 unidades logarítmicas en la tasa de bacterias lácticas. A lo largo de la maduración descienden ligeramente los recuentos de estreptococos y aumentan algo los de lactobacilos, permaneciendo prácticamente constantes los leuconostocs.

Enterobacteriáceas

El incremento de este grupo fue espectacular en la cuajada, en torno a tres unidades logarítmicas, pero a partir de este momento se observó un descenso continuado hasta el final del período de maduración y, si bien no llegaron a desaparecer, a los veintisiete días se obtuvieron cifras muy bajas, en torno a 10^2 u.f.c./g.

Micrococáceas

Tras un incremento de, aproximadamente, una unidad logarítmica en la cuajada, la tasa de microcococos sufrió un descenso bastante pronunciado, sobre todo en el lote C, hasta valores aproximados a 10^2 u.f.c./g al final del período de maduración.

Mohos y levaduras

Aunque sin alcanzar tasas muy elevadas, los recuentos de mohos y levaduras experimentaron un constante incremento a lo largo del proceso de maduración.

DISCUSION

La evolución de la flora microbiana durante la maduración del queso de Valdeteja no

había sido investigada anteriormente. Este queso es, por otra parte, un producto muy peculiar (elaborado con leche de cabra, de pasta prensada, pH muy bajo, 4, 4-4, 5, y muy seco, con un contenido en agua del orden del 28%) que se diferencian claramente de los demás quesos de cabra nacionales ^{4, 5, 6} y extranjeros ^{4, 6, 17} conocidos. Por todo ello, no se han encontrado referencias que permitan la discusión de nuestros resultados frente a los obtenidos por otros autores con productos iguales o análogos al estudiado aquí.

Sin embargo, existe una abundante bibliografía sobre otros quesos de pasta prensada, con los que es posible establecer comparaciones válidas. La composición y evolución de la flora del queso de Valdeteja es muy similar a la que se observa en otros quesos prensados elaborados en nuestro país, como el Manchego y el Roncal. Como en estos, predominan las bacterias lácticas, inicialmente los leuconostoc y los estreptococos, que van progresivamente decreciendo en número a la vez que se incrementa la tasa de lactobacilos ^{7, 10, 11, 13, 14}. Los microcococos disminuyen desde los primeros momentos de la maduración, si bien en el queso de Valdeteja no llegan a alcanzar cifras tan altas como en los Manchego y Roncal y su eliminación se produce a un ritmo más rápido ^{7, 11, 14} probablemente por las condiciones de muy bajo pH y Aw existentes en aquél. La evolución de las enterobacteriáceas y de las floras totales mesófila y psicrotrofa tampoco presenta características muy distintas de las de otros quesos de pasta prensada ^{11, 12, 14}. Ha de destacarse, en cambio, el curso seguido por mohos y levaduras que aumentan progresivamente desde el comienzo de la maduración para alcanzar cifras de 10^6 u.f.c./g al término de la misma, bastante altas para un producto de este tipo. Tal comportamiento puede achacarse a la elevada carga de estos microorganismos en el ambiente de las bodegas utilizadas para el afinado del queso de Valdeteja, que, además, no es sometido a cepillado, y, sobre todo, a que los bajos valores de pH y Aw dificultan el desarrollo de la flora bacteriana capaz de competir con ellos. No obstante, consideramos que los datos referentes a mohos y levaduras deben ser mirados con cautela hasta su confirmación por estudios posteriores.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANONIMO (1973). Catálogo de quesos españoles. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- 2) CHAPMAN, G.H. (1945). The significance of sodium chloride on studies of staphylococci. *J. Bacteriol.*, 50, 201-203.
- 3) I.C.M.S.F. (1978). Microorganisms in Foods I. Their significance and methods of enumeration. 2.^a Ed. University of Toronto Press. Toronto. Canadá.
- 4) JUAREZ, M. y RAMOS, M. (1984). Dairy products from ewe's and goat's milk. *Dairy Industries International*, 49, 20-24.
- 5) MARCOS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, J.; ESTEBAN, M.A.; LEON, F.; ALCALA, M. y BELTRAN DE HEREDIA, F.H. (1985). Quesos españoles. Tablas de composición, valor nutritivo y estabilidad. *Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba*. Córdoba.
- 6) MARTIN-HERNANDEZ, M.C.; JUAREZ, M. y RAMOS, M. (1984). Producción y características de composición de la leche y quesos de cabra. *Alimentación, equipos y tecnología*, julio-agosto, 61-71.
- 7) MARTINEZ-MORENO, J.L. y NUÑEZ, M. (1976). Flora microbiana del queso manchego. II. Evolución de la flora microbiana de quesos manchegos industriales. *Anales del I.N.I.A.*, 4, 33-40.
- 8) MAYEUX, J.V.; SANDINE, W.E. y ELLIKER, P.R. (1962). A selective medium for detecting leuconostoc organisms in mixed strain starters cultures. *J. Dairy Science.*, 45, 655-656.

- 9) MOSSEL, D.A.A.; MENGERINK, W.H.I. y SCHOLTS, H.H. (1962). Use of a modified McConkey agar medium for the selective growth and enumeration of *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.*, 84, 381.
- 10) NUÑEZ, M. (1976). Flora microbiana de quesos manchegos elaborados a partir de leche pasteurizada. Composición de un starter para queso Manchego. *Anales del I.N.I.A.*, 4, 113-121.
- 11) NUÑEZ, M. y MARTINEZ-MORENO, J.L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos manchegos artesanales. *Anales del I.N.I.A.*, 4, 15-31.
- 12) NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J.A.; MEDINA, A.L.; GARCIA ASER, G. y RODRIGUEZ-MARIN, M.A. (1981). Contribución al estudio de la flora psicrotrofa del queso Manchego. *Anales del I.N.I.A.*, 12, 53-64.
- 13) ORDOÑEZ, J.A.; BARNETO, R. y RAMOS, M. (1978). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft*, 33, 609-613.
- 14) ORDOÑEZ, J.A.; MASSO, J.A.; MARMOL, M.P. y RAMOS, M. (1980). Contribution a l'étude du fromage "Roncal". *Le lait*, LX, 283-294.
- 15) ROGOSA, M. y SHARPE, M.E. (1959). An approach of the classification of the lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 22, 329-340.
- 16) TERZAGHI, B.E. y SANDINE, W.E. (1978). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29, 807-813.
- 17) SCOTT, R. (1981). *Cheesemaking practice*, pgs. 335-461. Applied Sciences Publishers. England.

CINETICA DE LA REDUCCION DE LOS PIRUVATOS DE ETILO Y DE METILO POR LA L-GLICOL DESHIDROGENADA (NAD⁺) DE *Enterobacter aerogenes***

(KINETIC STUDIES OF ETHYL AND METHYL PYRUVATE REDUCTION BY L-GLYCOL DEHYDROGENASE (NAD⁺) FROM *Enterobacter aerogenes*)

Por J. Carballo *
J. González Prieto *
A. Bernardo *
y R. Martín Sarmiento *

Key words: Enzyme kinetics, L-glycol dehydrogenase (NAD⁺).
Palabras clave: Cinética enzimática, L-glicol deshidrogenasa (NAD⁺).

SUMMARY

The shape of the primary Hanes' plots and the inhibition pattern by products and by a substrate analogue prove that ethyl pyruvate reduction by L-glycol dehydrogenase from *Enterobacter aerogenes* proceeds through an Ordered Bi-Bi mechanism with the coenzyme as the "leading" substrate and that of methyl pyruvate by this same mechanism or by the Theorell-Chance's one.

RESUMEN

La forma de las gráficas obtenidas al representar por el método de Hanes los resultados de los análisis de actividad en ausencia de inhibidores y los patrones de

* Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.

** Este trabajo fué financiado con una ayuda de la Excm. Diputación Provincial de León.

An. Fac. Vet. León. 1988, 34, 127-140