# MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DEL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO. MADURACIÓN ACELERADA

Prof. Dr. D. JOSÉ FERNÁNDEZ-SALGUERO CARRETERO

Se admite que la maduración del queso comienza durante el salazonado, pero la transformación de sus componentes comienza mucho antes; de hecho la lactosa, las sales y la microflora comienzan a experimentar ya cambios cualitativos y cuantitativos durante la preparación de la leche previa a la coagulación, que se prolonga durante la coagulación, el tratamiento y manipulación de la cuajada y las operaciones de moldeo y prensado.

La maduración constituye la última fase de la fabricación del queso y sin duda alguna es la de mayor importancia y significación. En ella tienen lugar las más importantes transformaciones químicas y bioquímicas. Como consecuencia de estos cambios, el queso experimenta notables cambios generales en sus características organolépticas (cuerpo, aspecto, sabor, color y textura), en su digestibilidad y en su valor nutritivo, adquiriendo el producto sus caracteres típicos propios.

Por tanto la maduración se puede definir como el conjunto de modificaciones físico-químicas sufridas por la cuajada en el proceso de transformación en queso. Las modificaciones puramente físicas son la pérdida de humedad o el secado y a formación de corteza junto con la modificación de su textura, la intensidad y rapidez de estos procesos físicos dependen de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) reinantes y del tiempo que dura el proceso de maduración.

Los cambios químicos o bioquímicos se deben a la acción catalítica de los siguientes agentes:

Enzimas del cuajo.

Bacterias del fermento y sus enzimas.

Enzimas propias de la leche (sobre todo lipasas y proteasas)

Microflora de la leche (bien que hayan resistido a la pasteurización o la contaminante en los no tratados, o bien gérmenes que se incorporan al

queso posteriormente sobre todo en superficie). En la página siguiente se representa un esquema donde se puede apreciar la complejidad del proceso de maduración y los numerosos agentes y factores participantes así como los cambios más significativos.

Como se ve los microorganismos y sus enzimas juegan un papel fundamental en el proceso de maduración. Dentro de esta microflora también hay que decir que como contaminante natural, con frecuencia, se hallan microorganismos patógenos tales como algunos estafilococos, salmonellas, brucelas, M. tuberculosis, etc. Estos gérmenes son destruidos por el tratamiento de pasteurización y en los quesos no tratados la bajada del pH, Aw, y la formación de otros compuestos inhibe su desarrollo.

Los microorganismos (añadidos como fermentos o contaminantes) que en uno u otro momento participan en el conjunto de transformaciones sufridas por la cuajada son muy numerosos y pertenecen a los tres grandes grupos: bacterias, levaduras y mohos. Salvo en los quesos madurados por mohos superficiales como el Camembert, Brie, etc., en la mayoría de las variedades de queso los microorganismos predominantes son las bacterias (Manchego, Tetilla, Los Pedroches, etc.).

La leche destinada a la fabricación del queso debe contener una tasa adecuada de bacterias fundamentalmente lácticas que aseguren una rápida hidrólisis de la lactosa con producción de ácido. Este ácido láctico formado favorece la coagulación de la leche (mixta: ácida y enzimática), facilita la retracción del coágulo y la expulsión del suero, controla el desarrollo de proteolíticas y enterobacteríaceas (las enterobacteríaceas o los organismos coliformes se utilizan como indicadores de contaminación y altas tasas de estos microorganismos pueden representar un serio problema en la fabricación de quesos) y en cierto modo los procesos de proteólisis y lipólisis. Los gérmenes lácticos se clasifican según su metabolismo en homofermentativos (si a partir de la lactosa dan fundamentalmente ácido láctico) y heterofermentativos (si además de ácido láctico liberan también ácido acético, fórmico, acetaldehído, diacetilo, etc.). Otros microorganismos no clasificados como lácticos que participan en la maduración del queso son los micrococos (buena actividad proteolítica y lipolítica), los enterococos, los leuconostoc, etc.

En muchos quesos se están utilizando un fermento láctico mixto de *L. Cremosis* y *L. lactis* subesp. *Lactis* como gérmenes lácticos homofermentativos

y el *L. Diacetilactis* como heterofermentativos. También se pueden añadir lactobacilus, leuconostoc., etc.

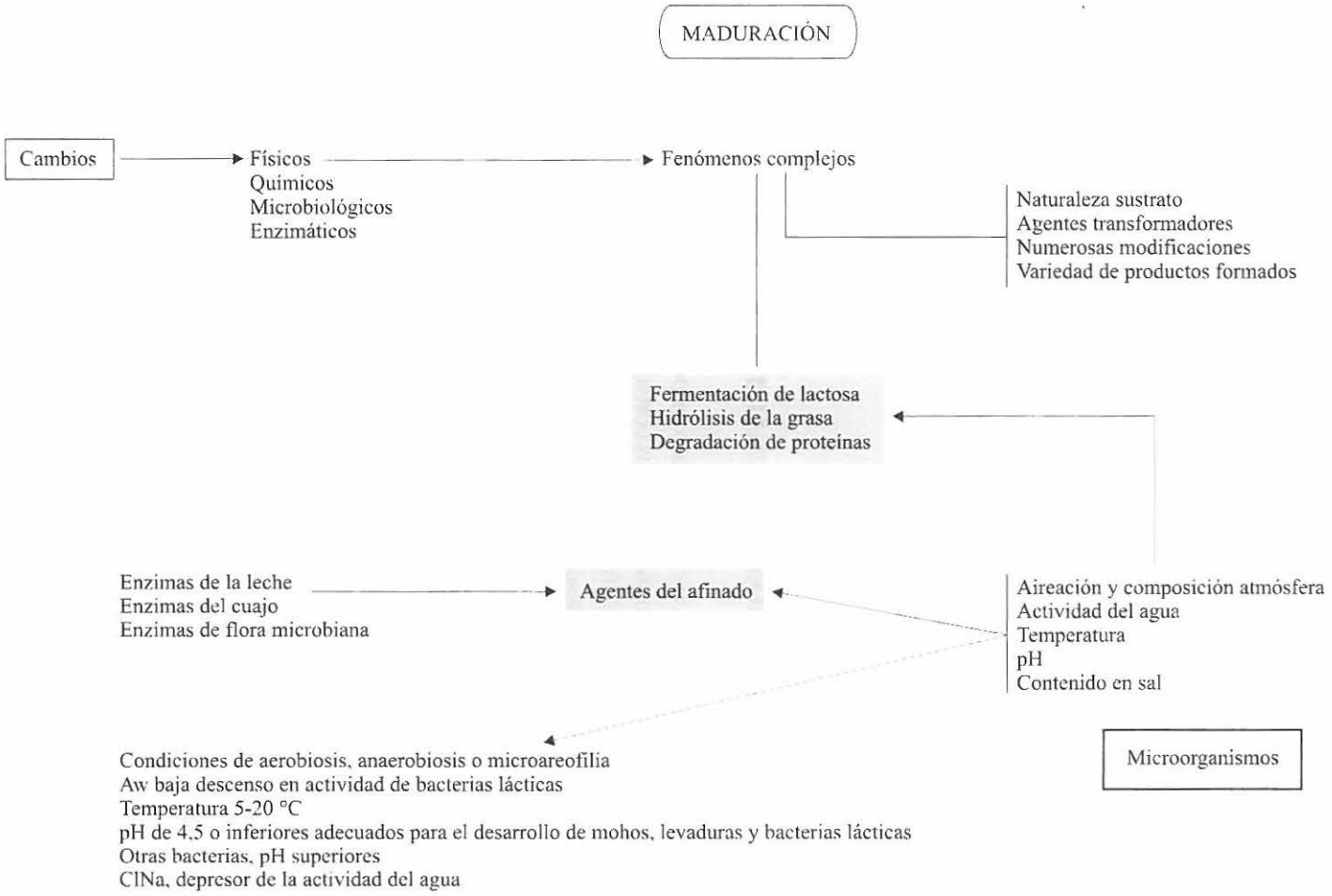
El proceso de maduración es en su aspecto bioquímico extraordinariamente complejo, ya que se entrecruzan numerosas rutas de degradación y de síntesis, así el producto de hidrólisis de una reacción con frecuencia se convierte en el substrato de otra y a su vez todo esto está regulado por numerosos factores continuamente cambiantes tales como: aireación, composición de la atmósfera, pH, humedad, ClNa, actividad de agua, temperatura, humedad relativa, etc.

Los principales cambios químicos durante la maduración cronológicamente considerados son la fermentación de la lactosa, la proteólisis y la degradación de las grasas. A partir de estos procesos se forman multitud de compuestos tales como péptidos, aa libres, aminas, AGL, ésteres, metilcetonas, amoniaco, etc. que contribuyen a dar al queso las características de aroma y sabor típico de cada variedad.

## 1.- TRANSFORMACIÓN DE LA LACTOSA

La lactosa como único carbohidrato importante en la leche es degradada rápidamente en sus dos monosacáridos constitutivos la glucosa y la galactosa y a partir de estos, se forma fundamentalmente ácido láctico (homofermentativos) y otros compuestos (heterofermentativos) tales como ácido acético, etanol, $CO_2$, etc. El ácido láctico formado es posteriormente metabolizado por los microorganismos, produciéndose una neutralización de la cuajada con lo que: se desarrollan los gérmenes ácido-sensibles (micrococos, corinebacterias, etc.), se favorece la actuación de numerosas enzimas que tiene pH óptimos de actuación cercanos a la neutralidad e influye en las propiedades reológicas del queso, ya que el aumento del pH origina ablandamiento del queso.

En los quesos no madurados tipo fresco de Burgos y otros muchos que se consumen en fresco, el ácido láctico es un compuesto importante en el desarrollo del sabor de estos quesos.


MADURACIÓN
Cambios
Físicos
Químicos
Microbiológicos
Enzimáticos
Fenómenos complejos
Naturaleza sustrato
Agentes transformadores
Numerosas modificaciones
Variedad de productos formados
Fermentación de lactosa
Hidrólisis de la grasa
Degradación de proteínas
Enzimas de la leche
Enzimas del cuajo
Enzimas de flora microbiana
Agentes del afinado
Aireación y composición atmósfera
Actividad del agua
Temperatura
pH
Contenido en sal
Microorganismos
Condiciones de aerobiosis, anaerobiosis o microaereofilia
Aw baja descenso en actividad de bacterias lácticas
Temperatura 5-20 °C
pH de 4,5 o inferiores adecuados para el desarrollo de mohos, levaduras y bacterias lácticas
Otras bacterias, pH superiores
ClNa, depresor de la actividad del agua

## 2.- LIPÓLISIS

La hidrólisis de la materia grasa tiene un papel muy importante en la génesis del flavor del queso, sin embargo no provoca modificaciones notables en su textura. Los componentes lipídicos mayoritarios de la leche son los triacilgliceroles, ya que los fosfolípidos no tienen un papel muy significativo. La primera transformación de la grasa es la hidrólisis de los triglicéridos con la liberación de ácidos grasos. Esta hidrólisis se produce por la acción de las lipasas de la leche, de los microorganismos psicrotrofos y de los fermentos lácticos empleados como starter.

La lipasa nativa se destruye a 60 ºC por lo que sólo actúa en quesos de leche cruda y además es inactiva a pH inferiores a 6,5 por lo que su papel es bien escaso. En los quesos azules si puede tener cierta importancia. Las lipasas de los psicrotrofos son termoresistentes y son activas durante la maduración, pero pueden causar rancidez. Las lipasas de los *Lactococcus* lácticos hidrolizan a los mono- y diglicéridos y más débilmente a los triglicéridos.

Del resto de los microorganismos las levaduras también participan en la lipólisis y también a los micrococos se les reconoce una actividad lipolítica importante. Por todo ello los quesos madurados por bacterias presentan unos niveles bajos de lipólisis. En algunos quesos italianos presentan un sabor picante (Romano, Parmesano. Provolone) debido a un contenido elevado de ácidos grasos de cadena corta como el butírico y compuestos como las metilcetonas (los AGL por acción enzimática pueden sufrir una desaturación y una transformación más completa, la cetonización o β-oxidación). Este sabor se debe a la acción de la lipasa pregástrica que acompaña a la quimosina en cuajos no purificados o a la adición de lipasas pancreáticas. En los quesos que sí se produce una intensa actividad lipolítica produciéndose una cantidad de AGL del orden del 6% del queso o del 18-25% de los ácidos grasos totales.

## 3.- PROTEÓLISIS

Por la gran importancia que los distintos componentes nitrogenados tienen sobre las cualidades organolépticas del producto terminado, los cambios que acontecen en las proteínas son sin duda los de mayor significación y los más característicos de la maduración, ya que afectan de una forma muy acusada tanto al sabor y aroma como a la textura. La primera manifestación de la proteólisis consiste en la solubilización progresiva de las caseínas que se pone de manifiesto por un aumento del nitrógeno hasta un 20-50% al final de la

maduración y se traduce en la aparición de una masa blanda y untuosa y de numerosas sustancias sápidas.

En efecto, la caseína experimenta una degradación progresiva formándose en primer lugar compuestos más simples, pero todavía de peso molecular considerable, las proteasas y peptonas, que posteriormente son hidrolizados a péptidos, aminoácidos, aminas, amoniaco, etc. es decir, sustancias de peso molecular cada vez más pequeño. Las enzimas encargadas de la degradación inicial de las proteínas proceden del cuajo añadido, bacterias, del fermento, enzimas propias de la leche y procedente de la flora secundaria o contaminante.

El cuajo tiene enzimas específicas como es la que hidroliza la k-Cn y desestabiliza las caseínas para formar la cuajada y también la quimosina hidroliza la alfa$_{s1\text{-}I}$-Cn produciendo el péptido alfa$_{s1\text{-}I}$-Cn que identifica la leche de vaca, las otras caseínas las hidroliza muy lentamente. Las proteasas de la leche (una proteasa ácida termolábil, una proteasa neutra, la aminopeptidasa y serinproteasas termoestables similares a la plasmina de la sangre. La más importante es la plasmina o proteasa alcalina) son menos activas que las del cuajo y las de los microorganismos. Tienen cierta actuación sobre la alfa$_{s2}$ y beta-Cn.

Las proteasas de los microorganismos tanto del fermento como la de la flora contaminante tienen un papel más importante. Así los lactococos y lactobacilos contienen proteasas y peptidasas que degradan las proteínas a péptidos grandes y de estos a pequeños péptidos y aminoácidos libres. Otros gérmenes como los micrococos tienen actividad proteolítica y sobre todo las levaduras y mohos pues en los quesos madurados por hongos el nivel de aminoácidos, aminas, amoniaco, etc. es grande a consecuencia de la actividad proteolítica y amino-, carboxi- y dipeptidasa.

La extensión e intensidad de la proteólisis se puede conocer a partir de la determinación y evolución de numerosos compuestos nitrogenados de menor peso molecular tales como nitrógeno soluble, nitrógeno no proteico, nitrógeno aninoacídico, nitrógeno amoniacal, etc. Entre los productos de degradación de las proteínas los aminoácidos libres tienen particular interés por participar estos componentes en el desarrollo del sabor y por servir de sustrato a diversos sistemas enzimáticos; así por desaminación oxidativa los aminoácidos libres se transforman en ácidos grasos libres. También pueden los aminoácidos servir para la formación de aldehídos bien por transformación enzimática seguida de descarboxilación o bien por un proceso químico de degradación de Strecker. Los aldehídos a su vez pueden dar origen a alcoholes. La descarboxilación de los aminoácidos conducen a la formación de aminas, etc., etc.

## MADURACIÓN ACELERADA DE QUESOS

Uno de los principales cometidos de la Tecnología de los alimentos es la de conservar los alimentos producidos, es decir, la de aumentar su vida útil. El queso es una excelente forma de conservar la leche. De ahí que tradicionalmente el largo período de maduración de algunas variedades era considerado como una ventaja. Sin embargo, desde el punto de vista económico este prolongado periodo entre la fabricación del queso y la venta puede ser una desventaja para el fabricante a escala industrial que necesita una rápida rotación para cubrir los altos costes de capital y trabajo.

Esta considerable inmovilización de capital junto con las mayores pérdidas de peso, mayor riesgo de alteración y la necesidad de destinar grandes superficies al almacenamiento de los quesos durante la maduración, hacen que desde hace años se esté investigando intensamente el proceso de la MADURACIÓN ACELERADA DE QUESOS O QUESOS MODIFICADOS ENZIMÁTICAMENTE. La falta de un conocimiento detallado de los componentes de sabor del queso y de los mecanismos exactos que lo generan durante la maduración se mantiene como el principal obstáculo para el diseño racional y científico de los sistemas de maduración acelerada del queso. A pesar de ello existen desde algunos años patentes y diferentes laboratorios que están comercializando distintos productos con el fin de acelerar la maduración.

Los principales objetivos del sistema de maduración acelerada son los siguientes:

Producir un queso curado (no fundido) con sabor y textura típicos dentro de 3-4 meses.

Incremento del margen de beneficio empresarial.

Aumentar las garantías del sabor.

Compensar los cambios del sabor debidos a la introducción de tecnología nueva (tratamientos térmicos, quesos obtenidos con procesos de membranas, etc.).

Incrementar la gama de productos/sabores del mercado.

El progreso de I+D en materia de maduración acelerada tiene que dirigirse sobre la actuación en los tres sustratos principales del queso (carbohidratos, proteínas y grasas). Se admite que los productos formados de la fermentación de la lactosa no tienen en sí mismo mucho que ver con el sabor del queso en el producto final, pero pueden, sin embargo, actuar sinérgicamente más tarde con otros componentes del sabor. Puesto que el control sobre la lactosa

es difícil no se han desarrollado con éxito sistemas comerciales de aceleración basados en esta etapa de la fabricación.

La mayor parte del esfuerzo se ha hecho sobre cómo actuar en las *proteínas y la grasa*. Aunque no se comprende muy bien toda la bioquímica implicada, sí se sabe cómo controlar la descomposición sobre los péptidos, aminoácidos, AGL, metilcetonas, etc. Algunas de las reacciones secundarias no se controlan muy bien, pero sus resultados pueden ser examinados por la industria.

Hay cuatro opciones de acelerar la maduración:

Temperatura elevada.

Adición de enzimas.

Adición de fermentos atenuados, y

También la técnica de papillas o "slurries".

## Maduración a temperatura elevada

Aunque se reconoce en este procedimiento como una de las principales estrategias, existen pocos trabajos con éste método, probablemente por el control higiénico y microbiológico que es necesario tener. Así hay que tener un queso con una composición y calidad higiénica correcta.

El límite superior de temperatura para MAQ debe ser probablemente de 15°C, temperaturas superiores incluso con poca carga microbiana incrementa el riesgo de alteración de la textura. A veces los problemas ocasionados son que la pasta se vuelve **harinosa** (se deshace más rápidamente). Distintos investigadores han aportado datos sobre la maduración a temperaturas altas de quesos Cheddar, Gouda, Manchego, Los Pedroches, La Serena, etc.

Una proteólisis muy fuerte puede afectar adversamente a las propiedades reológicas ya que la hodrólisis de la alfa-$_{s1}$-I-CN produce debilidad en la estructura tridimensional de la caseína, así como aumentar demasiado los péptidos (amargos).

A pesar de algunas de las ventajas el procedimiento de elevación de temperatura no despierta mucho interés ni se utiliza con la profusión que cabría esperar, probablemente debido a las precauciones higiénicas que habría que tener. Pero muchos quesos tradicionales se maduran a las temperaturas altas de primavera-verano.

## Adición de fermentos atenuados

Se trata de fermentos que han sido tratados para que no produzcan ácido durante la fabricación ya que al adicionarse en gran cantidad si conservaran la capacidad de metabolizar la lactosa provocaría una acidez muy alta, pero manteniendo su contenido normal en enzimas hidrolíticas (sobre todo peptidasas), no ocurrirá.

El tratamiento que pueden sufrir los fermentos se dirige en dos direcciones: - Fermentos atenuados mediante un choque térmico o de congelación y – Fermentos modificados genéticamente.

Fermentos atenuados con calor o congelación: se trata de producir fermentos lac$^-$ con diferentes combinaciones de tiempo/temperatura según especie, para alterar su actividad metabólica sin alterar sus enzimas hidrolíticas. Se han usado *Lactobacillus casei, Lactobacillus helveticus, Bulgariscus, Lactococcus thermophilus*, etc. El problema es que gran parte de estos gérmenes se van con el suero y por ello se necesita incorporar a la leche una bioamina que resulta antieconómica. Sí parecen tener éxito combinados con las enzimas.

Fermentos modificados genéticamente: los intentos en este sentido no solo tratan de acelerar la maduración sino de desarrollar gérmenes resistentes a los bacteriófagos. Se están probando cepas proteinasas y lactosa negativa.

## Maduración mediante la adición de enzimas.

Al contrario de la MAQ con temperatura elevada, la adición de enzimas está siendo ampliamente investigada en muchos lugares y en diferentes tipos de queso.

En la MAQ se utilizan los siguientes grupos de enzimas:

| | |
|---|---|
| Proteinasas | Peptidas |
| Lipasas | Estearasas |
| Desulfurilasas | |
| Desmetiolasas | |
| Beta-galactosidasa | |

obtenidas de diversas fuentes con diferente tecnología.

La desmetiolasa y la desulfurilasa se han utilizado en investigaciones para acelerar la maduración del queso Cheddar. La beta-galactosidasa no ha

cumplido las expectativas que se crearon. Las proteinasas y peptidasas son las enzimas de mayor futuro en la MAQ.

Hay cierta controversia sobre el papel de la lipólisis y los AGL en el sabor de los quesos duros. Estos AGL desempeñan un importante papel en el sabor de determinados quesos o también pueden participar en fenómenos de enranciamiento oxidativo.

Se ha generado mucha información sobre el efecto de diferentes proteinasas sobre la hidrólisis proteica durante la maduración del queso, así como en el desarrollo de distintas propiedades organolépticas. Los iniciales esfuerzos de emplear solamente proteinasas fallaron porque sólo actuaban sobre las primeras etapas de la degradación de la caseína. Los investigadores tomaron proteinasas y endopeptidasas del "frasco", y las pusieron en le queso y desarrollaron sabores fuertes y también defectos en la textura y en el sabor. Dentro de las proteasas las "proteasas neutras" (*B. subtilis*) son las que producen los mejores baremos de proteólisis y de calidad. De ahí que muchos de los estudios orientados a la adición de enzimas partan con una proteinasa microbiana neutra como enzima "básica" sobre la que luego con otras enzimas se perfila el sabor. Sin embargo, el sabor aparecido era a veces raro, también la textura resultaba afectada, por ello estos problemas y los que resultan de la producción de péptidos amargos se resuelven mediante el uso de PEPTIDASAS de microorganismos en combinación con las proteasas. Así la proteasa produce sustrato para la peptidasa, pero no bastante para alterar la textura del queso ni se acumulan péptidos amargos, ya que son degradados por las peptidasas (aminopeptidasas, carboxipeptidasas, y dipeptidasas procedentes de microorganismos como el *L. lactis*).

La forma de adición de proteinasas y peptidasas constituye también un punto importante. Si se adicionan a la leche la distribución es buena pero pueden atacar prematuramente a las caseínas y reducir el rendimiento del queso y además se pierde en el suero que cuando es cara es antieconómico. En la adición a la cuajada la distribución es menos eficaz y la mejor forma puede ser la adición de enzimas encapsuladas (por varios procedimientos) para que la distribución sea buena, no ataque a las proteínas en la leche y se mantenga en la cuajada sin contaminar el suero.

## Mediante la adición de papillas o "slurries"

Con este procedimiento aumenta el contenido en humedad de la cuajada hasta el 60% y se incuba con la adición de distintas enzimas a 30ºC. Se han adicionado diversas enzimas como Neutrase, lipasa y también miroorganismos

*L. lactis* subsp. *Lactis* en intentos con diversos quesos. Esta técnica se utiliza actualmente a escala industrial para obtener quesos modificados enzimáticamente que luego se empleas como ingredientes de galletas saladas y productos lácteos de imitación. El principal inconveniente de este método es la dificultad de controlar el proceso. La incubación a 30ºC puede favorecer el desarrollo de patógenos en leches de mala calidad.

## ACELERACIÓN DE LA MADURACIÓN DEBIDO AL EMPLEO DE MÉTODOS NO CONVENCIONALES

En orden al incremento del rendimiento del queso y economizar espacio y coagulante, un buen número de quesos se están obteniendo a partir de **leche ultrafiltrada** (UF), sobre todo quesos frescos y de pasta blanda (Camembert, Feta, Mozarella, Quarg). También en función de los cuidados en la nutrición existe demanda de **quesos bajos en grasa**. En ambos productos al alterar el balance de los componentes del queso tradicional se requiera cambiar las estrategias en su fabricación y maduración.

1.- La tecnología implicada en la elaboración de quesos a partir de leche UF se observa un descenso en la velocidad de la maduración y una menor proteólisis. Algunos intentos utilizando proteinasas encapsuladas en liposomas y fermentos atenuados por congelación o modificados genéticamente de lactobacillus parecen acelerar la maduración.

2.- En quesos con bajo contenido en grasa. En estos quesos se han señalado flavores a caldo, amargo o sin sabor. En queso Cheddar bajo en grasa se ha usado extractos liofilizados de distintos microorganismos sobre todo potenciadores del sabor. En la mayoría de los intentos en este sentido se ha conseguido que no aparezcan sabores amargos u otros sabores defectuosos pero los quesos así fabricados no desarrollan un sabor intenso.