

diciembre 1984

fermentos de cepas múltiples para utilización en la industria quesera: caracterización y selección

dra. maya piñeiro

dra. graziella verger

téc. lech. césar mario gretter

monografías tecnológicas

serie microbiología

3



Laboratorio Tecnológico del Uruguay

FERMENTOS DE CEPAS MULTIPLES PARA
UTILIZACION EN LA INDUSTRIA QUESERA:
CARACTERIZACION Y SELECCION

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo de los parámetros de crecimiento de cepas microbianas mesófilas utilizadas como fermentos en la industria láctea. Los parámetros estudiados fueron tiempo de coagulación, acidez titulable, pH, producción de diacetilo, hidrólisis de la arginina y utilización del citrato.

De acuerdo a sus propiedades bioquímicas se seleccionaron diferentes cepas individuales que, combinadas entre sí en distintas proporciones, permitieron obtener fermentos múltiples con características específicas en cuanto a producción de ácido, aroma y gas.

Estos fermentos múltiples permitirán, de acuerdo a las exigencias del mercado, seleccionar la combinación de cepas microbianas con la que se podría obtener las características deseadas de acidez, sabor, aroma y formación de ojos durante la elaboración del queso.

MULTIPLE STARTER CULTURES FOR THE DAIRY INDUSTRY:
CHARACTERIZATION AND SELECTION.

SUMMARY

A comparative study was conducted on the growth parameters of mesophilic microbial strains utilized as starters in the dairy industry. The parameters studied were coagulation time, titratable acidity, pH, diacetyl production, arginine hydrolysis and citrate utilization.

Based on biochemical reactions, individual strains were selected and combined in different proportions so as to obtain multiple starter cultures with specific characteristics regarding aroma, acid and gas production.

These multiple starters will permit, based on market demands, the selection of microbial strain combinations with the characteristics of acidity, taste, aroma and eye formation desired during cheese production.

INTRODUCCION

El LATU cuenta actualmente con un Banco de Fermentos como centro de identificación, almacenamiento y distribución de cepas microbianas para la industria láctea. Este servicio contribuye con las industrias nacionales, tanto como proveedor de cepas puras de fermentos de calidad probada y estandarizada, así como en calidad de centro consultor ante problemas ocasionados durante el manejo y/o fallas en la eficiencia de los fermentos lácticos. El Banco suministra cepas microbianas garantizadas de uso industrial, con historial de producción comprobado y verificado en la Planta Piloto del LATU.

El objetivo de este trabajo es el de seleccionar por sus propiedades bioquímicas, y a partir de un cultivo mixto comercial, diferentes cepas individuales que, combinadas entre sí, permitan obtener las características deseadas de acidez, aroma y producción de gas durante la industrialización del queso.

Se incluyen técnicas de rápida ejecución que permiten una fácil identificación de los fermentos lácticos a partir de cultivos comerciales y que pueden ser empleadas en los laboratorios de control de las plantas industrializadoras.

El fermento múltiple seleccionado está compuesto por: *Streptococcus lactis*, cuya principal función es la producción de ácido láctico a partir de los azúcares presentes; *Streptococcus cremoris*, incluido también por su capacidad de producir ácido láctico; *Streptococcus lactis* subespecie *diacetylactis*, seleccionado por su particular metabolismo, ya que a partir de la lactosa y del citrato produce diacetilo y anhídrido carbónico, responsables del sabor, aroma, textura y ojos característicos, y finalmente *Leuconostoc cremoris*, cuya principal función es la producción de aroma.

Las propiedades bioquímicas estudiadas fueron: tiempo de coagulación, acidez titulable, pH, producción de diacetilo, hidrólisis de la arginina y utilización del citrato.

MATERIAL Y METODOS

1 — Aislamiento de cepas individuales

Se seleccionó un cultivo mixto de fermentos lácticos mesófilos comerciales (CHR Hansen BD, CH — normal 01) que contenía 70 a 75 % *Streptococcus cremoris*, 15 a 20 % *Streptococcus lactis* subespecie *diacetylactis*, 1 a 5 % *Streptococcus lactis* y 5 a 10 % *Leuconostoc cremoris*, según especificación del fabricante. Este cultivo se rehidrató en un matraz que contenía 1.000 ml de leche en polvo descremada, reconstituída al 11 % y previamente esterilizada a 110°C durante 15 minutos, y se incubó a 23°C. Al cabo de 24 horas se transfirió 1 ml del cultivo a un matraz conteniendo 100 ml de leche estéril y se incubó nuevamente a 23°C por 24 horas. Al término de la incubación se rayaron placas de agar infusión cerebro corazón (agar BHI) (1) con el cultivo sin diluir y con sus diluciones al décimo y al centésimo, que se incubaron posteriormente 7 días a 21°C. Se seleccionaron las colonias que presentaron características morfológicas diferentes (tamaño, brillo, textura y color) (4), se transfirieron a tubos con 10 ml de caldo BHI y se incubaron a 21°C hasta que presentaron turbidez. Con estos cultivos se rayaron nuevamente placas con agar BHI, repitiendo este proceso tres veces hasta obtener colonias puras.

2 — Determinación de los parámetros de crecimiento

2.1. Tiempo de coagulación

Se estableció como tiempo de coagulación la formación de coágulo en la leche dentro de las primeras 72 horas de incubación. —Se clasificaron como formadores rápidos de ácido aquellos microorganismos que coagularon la leche antes de las 48 horas, moderados los que lo hicieron dentro de las 72 horas, y productores lentos de ácido los que no coagularon en este período.

Para la determinación de este parámetro, se transfirió 0,1 ml del cultivo de las cepas puras en caldo BHI a tubos conteniendo 10 ml de leche en polvo reconstituída al 9 %. Los tubos se incubaron a 21°C durante 72 horas, efectuando las lecturas cada 4 horas.

2.2. Acidez titulable

La acidez se expresó como el porcentaje de ácido láctico libre producido. Para esta determinación, 1 ml de cada cultivo puro en caldo BHI fue transferido a matraces conteniendo 100 ml de leche, reconstituída como en 2.1, e incubados a 21°C por 16 horas sin agitación. Al término de la incubación se determinó el título de ácido láctico, pesando 20 ml de la suspensión de cada cultivo y titulando con hidróxido de sodio (Na OH) 0.1 N y fenolftaleína, de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ Acido láctico libre} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{Normalidad} \times 0,09008 \times 100}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

Este procedimiento se repitió para todas las cepas aisladas, que se agruparon de acuerdo a la cantidad de ácido láctico producido dentro de las 16 primeras horas. Se determinó la acidez titulable también a las 48 horas.

2.3. Determinación del pH

Las determinaciones del pH se efectuaron en cultivos de 24 horas de los fermentos en leche reconstituída al 9 %, utilizando un peachímetro Corning 130.

2.4. Producción de diacetilo

Para este análisis se utilizó el método de Barrit (2,5).

A 1 ml del cultivo en leche del fermento problema (48 horas a 30°C), se añadieron 0,6 ml de una solución de alfa-naftol al 5 % en alcohol etílico absoluto y 0,2 ml de hidróxido de potasio al 40 %. Se agitó vigorosamente, se dejó reposar y se consideró como resultado positivo el desarrollo de color rojo.

2.5. Hidrólisis de la arginina y utilización del citrato

Se utilizó el caldo diferencial para estreptococos lácticos (3) que contiene leche como única fuente de carbohidratos (lactosa), arginina y citrato de sodio como sustratos específicos y púrpura de bromocresol como indicador de pH. Se ajustó el pH del medio a $6,2 \pm 0,05$. Se inocularon tubos conteniendo 7 ml del caldo diferencial y campanas de Durham con una ansada de los cultivos incubados 18 horas de cada una de las cepas. Se incubaron a 30°C, efectuando las lecturas a las 24, 48 y 72 horas.

Streptococcus lactis hace virar el caldo inicialmente al amarillo, por la producción de ácido láctico, y luego al violeta, por la liberación del amoníaco producto de la hidrólisis de la arginina.

Streptococcus cremoris produce un amarillo profundo, ya que no hidroliza la arginina y solamente produce ácido láctico.

Streptococcus lactis subespecie *diacetylactis* libera anhídrido carbónico (CO₂) por la fermentación del citrato de sodio, que se acumula en la campana de Durham, y da un color violeta por la desaminación de la arginina, más profundo que el violeta producido por el *Sptreptococcus lactis*.

Leuconostoc cremoris no cambia el color del caldo y no produce CO₂ o solamente pequeña cantidad.

3 — Morfología

Se confirmó la pureza de las cepas con observación microscópica utilizando las tinciones de Gram (modificación Hucker) y nigrosina (1).

4 — Selección de cepas

Se clasificaron las cepas agrupándolas en tres categorías de acuerdo a los parámetros de crecimiento. El primer grupo fue constituido por los formadores rápidos de ácido láctico (0,70 — 0,85 en 48 horas), coagulación en 48 horas y pH de 4,5 — 5,0. El segundo grupo por los formadores moderados de ácido (0,31 — 0,69 en 48 horas), coagulación a las 72 horas y pH de aproximadamente 5,5. El tercer grupo fue integrado por los no formadores de ácido o formadores lentos (0,20 — 0,30 en 48 horas), coagulación posterior a las 72 horas y pH de aproximadamente 6,0.

Finalmente se clasificaron las cepas según las posibilidades de hidrolizar la arginina, de utilizar el citrato de sodio y de producir CO₂, y se identificaron como *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. lactis* subesp. *diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*.

5 — Preparación de la cepa múltiple

Se seleccionaron cepas puras de cada uno de los grupos, eligiendo 3 cepas de cada grupo para minimizar el efecto de los bacteriófagos. Estas cepas se cultivaron hasta el estado de viabilidad pico, inoculando tubos conteniendo 10 ml de leche estéril reconstituída al 9 % y se incubaron de 8 a 24 horas a 21°C. Se repitió este procedimiento 3 veces. El estado de viabilidad pico se determinó mediante el tiempo de coagulación, acidez titulable, y pH. A un frasco conteniendo 100 ml del medio de leche se agregaron 0,1 ml de cada una de las cepas individuales seleccionadas, obteniéndose las diferentes cepas combinadas o fermentos múltiples.

Las cepas individuales se combinaron en distintas cantidades obteniendo tres tipos de fermentos múltiples denominados Recombinante Cremoris, Lactis y Diacetylactis según fuera la mayor proporción de la cepa seleccionada.

Estas tres cepas combinadas fueron entonces usadas para inocular el medio de leche en proporción de 1 % de inóculo a medio. Se incubaron a 20 — 21°C sin agitar y se determinaron los parámetros de crecimiento. Se consideró estado de viabilidad pico el momento en que los cultivos mixtos llegaron a pH 4,3 — 4,6 y el porcentaje de ácido a 0,8 — 1,3, habiéndose detenido el aumento de acidez y los cambios visibles. Esto ocurrió entre las 12 y 24 horas.

6 — Congelación

Una vez obtenido el pico de viabilidad, se agregó 1 ml del cultivo de las cepas múltiples a 2 ml de leche reconstituída al 9 % contenidos en viales de vidrio con tapa de rosca resistentes a las bajas temperaturas. Se congelaron los viales por inmersión en nitrógeno líquido en una garrafa Apollo SX-18 (MVE Cryogenies). Luego de 24 horas en el nitrógeno líquido se retiraron los viales y se almacenaron a —70°C.

7 — Comportamiento Post-congelación

Se efectuaron determinaciones de los parámetros de crecimiento en las tres cepas múltiples a las 48 horas y a los 30 días de mantenimiento a -70°C .

RESULTADOS

En el Cuadro I se detallan los resultados de las determinaciones de los parámetros de crecimiento de las cepas aisladas a partir del cultivo comercial. Se obtuvieron 50 cepas individuales que fueron clasificadas como descrito en Material y Métodos.

Dentro de las 50 cepas aisladas, 20 % de ellas se consideraron pertenecientes al grupo denominado R (formadores rápidos de acidez), presentando acidez titulable entre 0,70 y 0,85, coagulación en 48 horas y pH de aproximadamente 5,0. El 54 % de las cepas fue clasificado como M (formadores moderados de acidez), con acidez titulable de 0,31 a 0,69, coagulación a las 72 horas y pH de aproximadamente 5,5.

El 14 % restante pertenece al grupo de los formadores lentos de ácido, con acidez titulable de 0,20 a 0,30 sin coagulación a las 72 horas y pH de aproximadamente 6,0. Las cepas restantes (12 %) no pertenecían a ninguno de los tres grupos, dando resultados intermedios.

CUADRO I

Parámetros de Crecimiento de las Cepas Aisladas

Clasificación	% de Cepas	Acidez titulable 48 horas	Tiempo de Coagulación	pH 24 horas
Rápidos (R)	20	0,70 - 0,85	≤ 48 h	5,0
Moderados (M)	54	0,31 - 0,69	≤ 72 h	5,5
Lentos (L)	14	0,20 - 0,30	> 72 h	6,0

En el Cuadro II se clasificaron las cepas aisladas en *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. lactis* subesp. *diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*, de acuerdo a la posibilidad de hidrolizar la arginina, de fermentar el citrato y de producir diacetilo, con confirmación microscópica. De las cepas puras obtenidas, 64 % fueron *S. cremoris*, 20 % *S. lactis*, 4 % *Leuconostoc cremoris* y 4 % *S. lactis* subesp. *diacetylactis*.

CUADRO II

Clasificación de las Cepas Aisladas

Organismos aislados			Reacciones en el Caldo Diferencial			Producción de Diacetilo 72 horas
Identificación	Cantidad	%	Acidez 24 hs.	Hidrólisis de la Arginina 48 hs	Fermentación del Citrato 48 - 72 hs.	
<i>S. cremoris</i>	32	64	+	—	—	—
<i>S. lactis</i>	10	20	+	+	—	—
<i>S. lactis</i> subespecie <i>diacetylactis</i>	2	4	+	+	+	+
<i>L. cremoris</i>	2	4	s/c	s/c	±	+

s/c = sin cambio

En el Cuadro III se muestra la selección de cepas efectuada con el objeto de formar los fermentos múltiples. En el primer recombinante se agruparon tres *S. cremoris*, clasificados como formadores rápidos de ácido, tres *S. lactis* moderados, los dos *S. lactis* subesp. *diacetylactis* aislados y los dos *Leuconostoc cremoris* aislados. Esta cepa fue determinada Cremoris por ser estos Streptococcus los de mayor actividad. El segundo recombinante, denominado Lactis, fue integrado por cinco *S. lactis* moderados, ya que no se pudieron aislar *S. lactis* rápidos, tres *S. cremoris* rápidos, los dos *Leuconostoc cremoris* y los dos *S. lactis* subesp. *diacetylactis*. Finalmente para el tercer recombinante, se emplearon los dos *S. lactis* subesp. *diacetylactis*, tres *S. cremoris* moderados, tres *S. lactis* moderados, y los dos *Leuconostoc cremoris*.

CUADRO III

Selección y Recombinación de las Cepas en Fermentos Múltiples

Denominación del Fermento Múltiple	Número de Cepas de			
	<i>S. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>S. lactis</i> subesp. <i>diacetylactis</i>	<i>L. cremoris</i>
1. Cremoris	3 R	3 M	2	2
2. Lactis	3 R	5 M	2	2
3. Diacetylactis	3 M	3 M	2	2

El Cuadro IV presenta los parámetros de crecimiento de las tres cepas múltiples luego de congeladas, a las 48 horas y a los 30 días de mantenimiento a baja temperatura. Se detallan los valores obtenidos de acidez titulable, pH, tiempo de coagulación y producción de diacetilo. Todas las cepas múltiples coagularon totalmente en menos de 24 horas, obteniendo a su vez los valores máximos de acidez titulable en 16 horas y pH de 4,5 a las 24 horas. Solamente el recombinante Diacetylactis dió reacción positiva en la prueba de producción de diacetilo.

CUADRO IV

Parámetros de Crecimiento de los Fermentos Recombinados determinados a las 48 horas y 30 días post-congelación

Fermento Múltiple	Acidez Titulable		pH 24 h	Tiempo de Coagulación	Producción de Diacetilo
	16 h	48 h			
1. Cremoris	0,94	0,94	4,5	< 24 h	Negativo
2. Lactis	0,94	0,97	4,5	< 24 h	Negativo
3. Diacetylactis	0,94	0,95	4,5	< 24 h	Positivo

CONCLUSION

De acuerdo a los resultados anteriores, y utilizando el sistema de selección de cepas múltiples descrito en esta publicación, con técnicas sencillas de rápida ejecución en laboratorios industriales, se podrá preparar la combinación de fermentos que permita, de acuerdo a las exigencias del mercado, obtener las características deseadas de acidez, sabor, aroma y formación de ojos durante la elaboración del queso.

BIBLIOGRAFIA

- (1) American Public Health Association, Inc. 1976. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.

Barrit, M. 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α naphthol. J. Path. Bact. Vol. 42: 441 - 454.

Reddy, M. S., Vedamuthu, E. R., and G. W. Reinbold. 1970. A differential broth for separating the lactic streptococci. Journal Paper N° 5 - 6727 of the Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station, Ames, Iowa.

- (4) Schwartz, M. E. 1973. Cheese-making Technology. Food Technology Review N° 7: 201 - 206. Noyes Data Corporation.

Serres, L. et col. Contrôle de la Qualité des Produits Laitières. Direction des Services Vétérinaires. Ministère de l'Agriculture, France Tome II: Ch. III H.

MONOGRAFIAS PUBLICADAS

SERIE MICROBIOLOGIA

1. — Efecto de la irradiación sobre la contaminación microbiológica de los productos chacinados.

G. Verger, M. Piñeiro, E. Marchelli, A.M. Dovat. Agosto 1980.

2. — Evolución de diferentes poblaciones microbianas durante la elaboración y maduración de queso dambo.

G. Verger, M. Piñeiro, O. Paez, A. Dovat. Diciembre 1981.

DEPOSITO LEGAL 206.769 - 85

CARLOS CABARES IMPRESORES

LABORATORIO TECNOLOGICO DEL URUGUAY (LATU)

**DIRECCION: GALICIA 1133
TELEFONOS: 98 44 32 y 90 63 86
MONTEVIDEO - URUGUAY**
