

**MADURACION DEL QUESO «CABRALES»  
MICROFLORA: I.—Lactobacilos.**

*Por J. Burgos  
A. López  
Fco. J. Sala T.*

Las bacterias ácido-lácticas desempeñan un papel de sumo interés en los períodos iniciales de la maduración de múltiples variedades de quesos por establecer unas condiciones que acaban imponiendo la selección de una flora característica, de desarrollo más tardío, que es la principal responsable de los cambios madurativos.

En tanto que los estreptococos prácticamente participan sólo en la acidificación inicial, el papel desempeñado por los lactobacilos es mucho más complejo en virtud de su superior actividad proteolítica y lipolítica y de su actuación en etapas más avanzadas del proceso madurativo.

La participación de los lactobacilos en el desarrollo del aroma de ciertos quesos ha sido perfectamente demostrada<sup>1,2</sup>. Aunque en los quesos de «vena azul» el desarrollo del aroma se debe fundamentalmente a las funciones metabólicas de hongos pertenecientes al género *Penicillium*, es evidente que en el estudio de las variedades de maduración espontánea tendente a la normalización de sus técnicas de fabricación resulta inevitable la investigación de su flora acidoláctica.

En el presente trabajo se describe el aislamiento e identificación de los lactobacilos del queso «Cabrales» y las variaciones de su tasa a lo largo del proceso madurativo.

## MATERIAL Y METODOS

Los reactivos empleados para la preparación de los medios de cultivo a lo largo de estas experiencias fueron suministrados por Difco.

Los métodos utilizados para el muestreo son los sugeridos por la Industrial Dairy Federation.<sup>3</sup>

Para el cultivo de las cepas aisladas y la determinación de sus temperaturas óptimas de crecimiento se utilizó el medio de cultivo de Man Rogosa Sharpe.<sup>4</sup>

Las pruebas de fermentación se efectuaron con células lavadas de las cepas aisladas y las siembras se efectuaron en medio de cultivo MRS en el que se omitió la adición de glucosa y de extracto de carne y se ajustó el pH a 6,4. Los carbohidratos utilizados fueron esterilizados por filtración.

La evolución de anhídrido carbónico se comprobó por el método descrito por GIBSON y ABDEL-MALEK.<sup>5</sup>

La actividad catalasa se analizó inundando los cultivos en tubos de agar inclinado con agua oxigenada de 3 vols. y observando la liberación de oxígeno.

La producción de ácido láctico se probó en leche desnatada tras tres días de incubación a 30° C midiéndose el ácido láctico producido por titulación con NaOH de normalidad conocida.

La identificación de las especies aisladas se efectuó de acuerdo con los esquemas de SHARPE, FRYER y SMITH.<sup>6</sup>

El material de partida consistió en cuatro muestras de queso procedentes de una de las más acreditadas cuevas de la región de Cabrales.

*Recuento de lactobacilos:* Para el recuento de lactobacilos se trituraron en un triturador de cuchillas M.S.E., durante cinco minutos, 10 gr. de queso con citrato sódico al 2 % hasta un volumen final de 100 ml. De la solución original se efectuaron progresivas diluciones 1/10 con las que se sembraron placas de Petri con medio de cultivo de agar Rogosa. Las placas se incubaron a 30° C y los recuentos se efectuaron a los tres días de incubación.

*Aislamiento de cepas:* De las placas utilizadas para el recuento de lactobacilos se aislaron seis tipos aparentemente distintos de colonias que se sembraron en tubos de agar inclinado con el mismo medio de cultivo para estudiar su actividad catalasa y su comportamiento frente a la tinción de Gram y en medio de MRS para su perpetuación y estudio de su morfología.

## RESULTADOS

### *Evolución de la población de lactobacilos durante la maduración:*

Los resultados del recuento de lactobacilos en las muestras de distintos períodos de maduración figuran en la Tabla I.

TABLA I.—*Evolución de la población de lactobacilos durante la maduración.*

Muestra de queso	Período de maduración (días) (1)	Recuento de lactobacilos (lactob. / gr. de queso)
A	4-5	$6,5 \times 10^8$
B	12	$1,2 \times 10^{11}$
C	21	$2,3 \times 10^{10}$
D	28	$1,1 \times 10^{10}$

(1). Los períodos de maduración comprenden desde que el queso entró en la cueva hasta la llegada a nuestro laboratorio e incluyen por lo tanto los dos o tres días de transporte a una temperatura no controlada.

### *Identificación de las cepas*

Todos los gérmenes aislados tenían forma bacilar y eran «Gram +». Crecieron abundantemente a 15° C pero su crecimiento a 45° C fue escaso. No producían CO<sub>2</sub> ni catalasa, pero sí ácido láctico en proporciones diferentes (Tabla II). El crecimiento en medio de cultivo con 0,4 % de «Teepol» resultó positivo en una sola de las cepas aisladas, que fue además también la única capaz de fermentar la xylosa. Esta cepa fue identificada como *Lactobacillus plantarum* y las cinco restantes como *Lactobacillus casei*, var: *casei*.

TABLA II.—Identificación de las cepas aisladas.

Cepa tipo	1	2	3	4	5	6
Gram	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:						
15° C	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45° C	—+	—+	—+	—+	—+	—+
Catalasa	—	—	—	—	—	—
Morfología	B	B	B	B	B	B
CO <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—
Acido láctico	+	+	+	+	+	+
% de ác. láctico en el medio	1,6	1,3	1,6	1,6	1,5	1,5
Crecimiento en 0,4 % de «Teepol»	—	+	—	—	—	—
Fermentación de la xylosa	—	+	—	—	—	—

B = Forma bacilar; +++ = crecimiento muy intenso; —+ = Crecimiento escaso.

## DISCUSION

Las cifras correspondientes a la primera muestra de queso pueden no ser muy representativas de las presentes en el queso de 4 a 5 días de estar en la cueva, ya que gran parte del período que media entre fabricación y recuento corresponde al transporte en condiciones no controladas. La población de lactobacilos que a los cuatro días de maduración debe considerarse ya como muy alta, experimenta un rápido ascenso y al cabo de doce días se ha multiplicado por un factor de 200; a partir de este instante descende, aunque a un ritmo mucho menos acentuado que el del ascenso.

Según demuestran PERRY y SHARPE,<sup>7</sup> el número de lactobacilos en diferentes muestras de quesos de igual período de maduración varía ampliamente, en parte debido a la dificultad de obtener muestras homogéneas; pese a ello y a que las muestras de queso por ellos analizadas correspondían a la sexta semana de maduración, puede deducirse, a pesar de la mar-

cha descendente de nuestras cifras, que nuestros valores son más elevados que los señalados por ellos para muestras de «Cheddar»; y son superiores también a los publicados por LENOIR<sup>8</sup> para el queso «Cammembert».

Aunque uno de los factores que determinan la tasa de los lactobacilos en una muestra de queso es la incidencia de los mismos en la leche original, no parece, sin embargo, a juzgar por el trabajo de PERRY y SHARPE con sesenta muestras diferentes de queso, que la población presente en la leche original tenga en la práctica una importancia decisiva; de mayor relevancia parecen ser otros factores tales como las concretas características fisicoquímicas del queso y asociaciones entre las distintas especies microbianas presentes.

La tasa de lactobacilos hallada consistentemente en ésta y otras experiencias ya en las primeras etapas de la maduración resulta en cierta medida sorprendente si se consideran las cifras dadas por PERRY y SHARPE para los lactobacilos presentes en la leche recién ordeñada.

La marcha descendente de la población de lactobacilos después de alcanzar su máximo alrededor de los doce días, podría explicarse como un fenómeno de autoinhibición al alcanzar el pH valores excesivamente bajos para el crecimiento de estos gérmenes, cediendo así paso a otros microorganismos tales como levaduras y mohos, aislados también a partir de estos quesos,<sup>9,10</sup> capaces de crecer en estas condiciones y responsables probablemente de la etapa principal de la maduración.

## RESUMEN

El presente trabajo describe el aislamiento e identificación de las especies de lactobacilos presentes en el queso «Cabrales».

*Lactobacillus casei* var. *casei* y *Lactobacillus plantarum* son las únicas especies aisladas.

La tasa de lactobacilos alcanza un máximo de  $1,2 \times 10^{11}$  lact./gr. durante la segunda semana y descende posteriormente hasta  $1,1 \times 10^{10}$  lact./gr. al final de la cuarta semana.



## RESUME

Ce travail décrit l'isolément et l'identification des espèces de Lactobacilli présents dans le fromage espagnol «Cabrales».

Le *Lactobacillus casei* var. *casei* et le *Lactobacillus plantarum* sont les seules espèces isolées.

Le nombre de bacilli atteint un maximum de  $1,2 \times 10^{11}$  lact/gr. pendant la deuxième semaine et diminue jusqu'à  $1,1 \times 10^{10}$  lact/gr. à la fin de la quatrième semaine.

## SUMMARY

An account is given on the species of lactobacillii present during ripening of «Cabrales» cheese. *Lactobacillus casei* var. *casei* and *Lactobacillus plantarum* are the only species isolated.

The incidence of lactobacillii in our samples reaches a maximum of  $1.2 \times 10^{11}$  lactobacilli/gr. during the second week, falling from then on down to  $1.1 \times 10^{10}$  lactobacilli/gr. at the end of the fourth week.

## BIBLIOGRAFIA

1. PHILLIPS. Citado en «*Dairy Bacteriology*» por B. W. HAMMER y BABEL F. J. (Eds.). John Wiley & Sons Inc. Pub. (1948). p. 570.
2. HAMMER, B. W. y BABEL, F. J. «*Dairy Bacteriology*». John Wiley & Sons. Inc. Pub. (1948). p. 519.
3. INDUSTRIAL DAIRY FEDERATION. (1958). «*Methods of sampling milk and milk products*». International Standard. F. I. L.—IDF— 1958.
4. MAN, J. C., ROGOSA, M. and SHARPE, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacillii. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
5. GIBSON, T. y ABDEL-MALEK, J. (1945). The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* **14**, 35-44.
6. SHARPE, M. E., FRYER, F. T., and SMITH, D. G. En «*Identification Methods for Microbiologists*». Part A. (Eds. GIBBS, B. M., and SKINNER, F. A. Academic Press. London and New York (1966).
7. PERRY, K. D., and ELISABETH SHARPE, M. (1960). Lactobacillii in raw milk and in «Cheddar» cheese. *J. Dairy Res.* **27**, 267-277.
8. LENOIR, J. (1962). La flore microbienne du Camembert et son évolution au cours de la maturation. *C. R. Acad. Agric.* **48**, 392-399.
9. SALA, T., Fco. J. y BURCOS, J. Maduración del queso «Cabrales». Microflora: III.—Levaduras. *Anales de Bromatología*. (En prensa).
10. SALA, T., Fco. J., BURCOS, J. y ORDÓÑEZ, J. A. Maduración del Queso «Cabrales». Microflora: II.—Mohos.