

5

CARACTERIZACIÓN DE LÉVEDOS PROCEDENTES DE QUEIXOS GALEGOS ARTESANAIS DE CURTA MADURACIÓN



Galicia ostenta unha gran tradición na elaboración de queixos. Conta con tres variedades de curta maduración amparadas por senllas denominacións de orixe protexidas: Arzúa-Ulloa, Queixo Tetilla e Cebreiro. Con todo, as producións tradicionais están a desaparecer, e a calidade e a tipicidade dos produtos lácteos artesanais estanse a ver ameazadas polas modificacións na flora microbiana dos ambientes leiteiros e polos cambios na composición cuantitativa e cualitativa do leite cru.

As comparacións entre os perfís de compostos aromáticos dos queixos tradicionais elaborados con leite cru e os dos elaborados con leite pasteurizado, realizadas en estudos previos, revelaron que **varios compostos responsables dos aromas típicos dos produtos tradicionais soamente eran detectados en queixos de leite cru**. Os investigadores atribúenlles estes matices desexables de aroma e sabor ás actividades encimáticas de microorganismos autóctonos presentes nas producións artesanais de leite cru. No caso dos lévedos, a presenza natural de poboacións de determinadas especies destes fungos unicelulares nos queixos é debida á súa tolerancia aos baixos valores de pH, actividades de auga reducidas, altas concentracións de sal e baixas temperaturas de maduración.

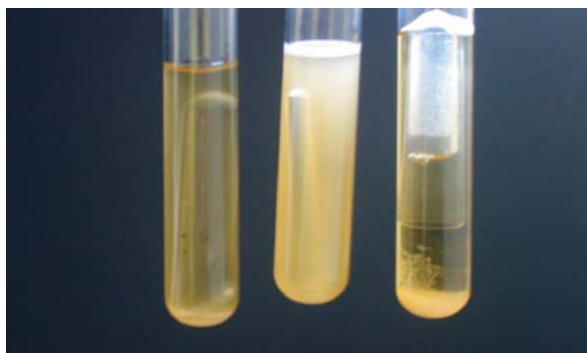
Os obxectivos do presente traballo foron:

1. *Illar e identificar* os lévedos predominantes nos queixos artesanais de curta maduración de boa calidade sensorial producidos en Galicia, e

2. *Caracterizar* estes lévedos dende un punto de vista tecnolóxico, con vistas a seleccionar aqueles que puidesen ser utilizados como cultivos adxuntos para preservar os aromas e sabores típicos dos queixos galegos tradicionais.

Identificación dos lévedos

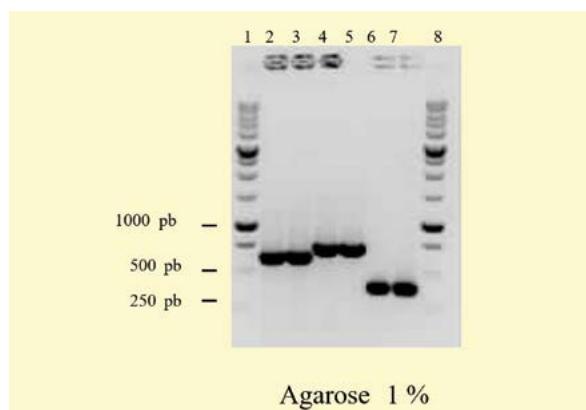
Os investigadores analizaron 21 unidades de queixos (7 Arzúa-Ulloa, 7 Tetilla e 7 Cebreiro). O primeiro paso foi sementar dilucións decimais obtidas a partir de homoxeneizados de mostras en medios de cultivo sólidos selectivos, subcultivando as colonias ata obter cultivos puros. A continuación realizouse unha identificación **fenotípica** empregando un “kit” comercial (RapID®; REMEL, Lenexa, KS, Estados Unidos), seguida dunha identificación **xenotípica** mediante análise do ADN (ácido desoxirribonucleico) cunha técnica denominada RFLP-PCR (Polimorfismos da lonxitude dos fragmentos de restrición dos produtos da reacción en cadea da polimerasa). Desta forma, os investigadores foron quen de asignar 101 dun total de 143 illados a un xénero e especie concretos, é dicir, identificalos con total fiabilidade. Os principais lévedos atopados, en función da súa abundancia, foron: ***Yarrowia lipolytica*** (o lévedo máis frecuente nos queixos Arzúa-Ulloa e Tetilla), ***Kluyveromyces lactis*** e ***Debaryomyces hansenii*** (os lévedos máis abundantes nos queixos Cebreiro) e ***Pichia guilliermondii***. Estas especies téñense igualmente identificado noutros queixos europeos de codia lavada.



Características de crecemento e tecnolóxicas dos lévedos

Os investigadores estudaron a capacidade dos diferentes lévedos para multiplicarse nas condicións ambientais habituais nos queixos, ou de desenvolver certas actividades encimáticas de interese tecnolóxico:

- a. Resistencia a concentracións salinas elevadas:** todos os lévedos identificados foron capaces de medrar a 8 °C (temperatura habitual de maduración) e en presenza de ata 15% de cloruro sódico.
- b. Actividade alcalinizante:** a especie de lévedo que presentou a maior actividade alcalinizante foi *Y. lipolytica*. Esta actividade, responsable do aumento do pH do queixo (particularmente na superficie), é importante porque pode contribuír ao crecemento de diferentes grupos bacterianos, ás modificacións na textura e ao favorecemento de diferentes reaccións bioquímicas que teñen lugar durante a maduración.
- c. Capacidade para producir diacetilo:** o diacetilo e o seu derivado, a acetoina, son compostos que achegan notas aromáticas de manteiga e de froitos secos. Só cinco dos 101 lévedos identificados, pertencentes ás especies *K. lactis*, *Y. lipolytica* e *D. hansenii*, foron capaces de producir estes compostos.
- d. Actividade acidificante:** a especie con maior capacidade acidificante foi *K. lactis*.
- e. Actividade proteolítica extracelular:** as especies que máis destacaron pola súa capacidade para degradar as caseínas do leite foron *Y. lipolytica* e *K. lactis*.



Identificación molecular mediante RFLP-PCR dos lévedos *Debaryomyces hansenii* (ringleiras 2 e 3), *Kluyveromyces lactis* (ringleiras 4 e 5) e *Yarrowia lipolytica* (ringleiras 6 e 7)

- f. Actividade lipolítica extracelular:** cando se estudou a acción lipolítica dos lévedos sobre varios substratos (Tween 80, tributirina) foi, unha vez máis, *Y. lipolytica* a especie que amosou unha maior actividade. Os compostos resultantes da lipólise, como ácidos graxos libres e ésteres, son responsables dos matices aromáticos a rancio, a lévedo ou afroitados apreciáveis en diferentes queixos.

Avaliación de propiedades non desexables

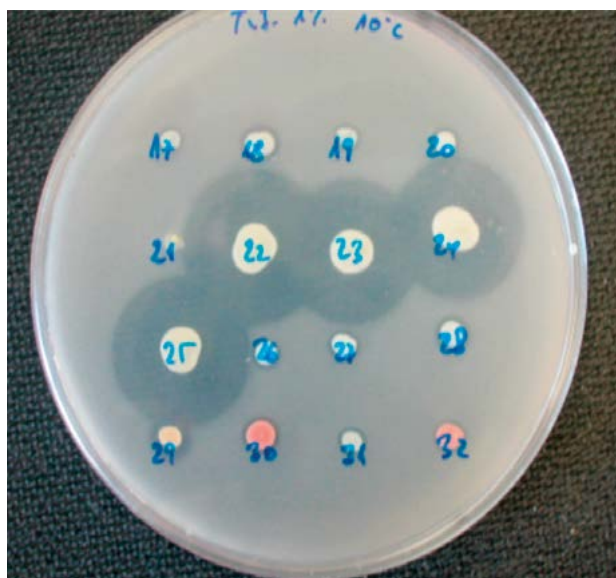
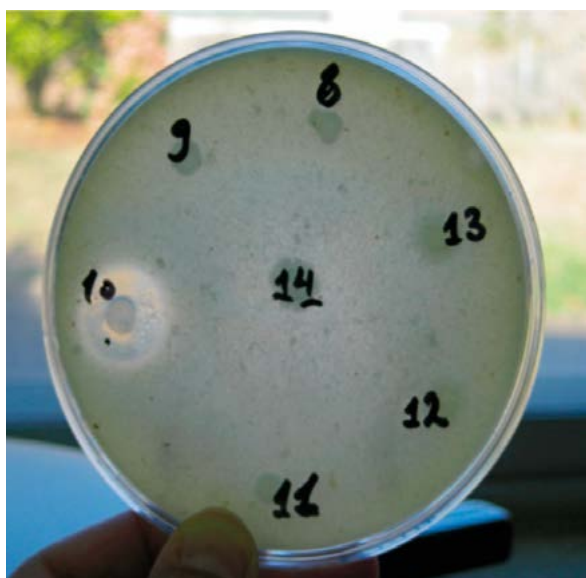
Os lévedos poden exhibir actividades prexudiciais para a fabricación de queixos, tales como a **produción excesiva de gas** ou a **peptonización** (formación de coágulos moi retraídos con forte desprendemento de soro, relacionada con menores rendementos). Catorce illados de *K. lactis* amosaron unha produción excesiva de gas, 6 dos cales peptonizaron ademais a caseína.

Características sensoriais e produción de compostos volátiles

O seguinte paso foi analizar o **tipo de aromas** que cada un dos lévedos producía ao incubarse en leite pasteurizado baixo axitación, para favorecer o seu crecemento. Un panel de cata de alimentos, constituído por sete membros adestrados, detectaron mediante olfacción os seguintes aromas para cada unha das especies:

- a. *Y. lipolytica*:** xerou sobre todo notas rancias, atribuíbles á alta capacidade lipolítica deste lévedo.
- b. *K. lactis*:** produciu principalmente notas alcohólicas, afroitadas, a lévedo e acéticas, presumiblemente debidas á súa alta capacidade fermentativa e formadora de ésteres.
- c. *D. hansenii*:** xerou predominantemente notas xofradas, a queixo, rancias e alcohólicas, atribuíbles á súa actividade proteolítica e ao metabolismo da lactosa.

O último paso foi analizar, mediante cromatografía de gases e espectrometría de masas (GC-MS, ou Gas Chromatography-Mass Spectrometry), os grupos de **compostos volátiles** que cada unha das especies era capaz de producir no leite enteiro pasteurizado:



Avaliación da actividade proteolítica (esq.) e lipolítica (dta.) dos lévedos. Neste exemplo, o lévedo "10" deu positivo en actividade proteolítica e os lévedos "22-25" deron positivo en actividade lipolítica

- a. **Alcohois:** os maiores produtores de etanol e outros alcohois de cadea ramificada foron os cultivos de *K. lactis*;
- b. **Cetonas:** *D. hanseii* resultou ser o principal produtor de metilcetonas (maioritariamente 2-pentanona e 2-heptanona);
- c. **Ácidos graxos e os seus ésteres:** o maior produtor de ésteres do ácido acético (acetatos de etilo e de propilo) foi *K. lactis*. Non obstante, o produtor máis destacado de ésteres doutros ácidos graxos distintos do ácido acético (principalmente butanoato, hexanoato e octanoato de etilo) foi *Y. lipolytica*.
- d. **Compostos xofrados:** *Y. lipolytica* resultou ser igualmente a especie máis produtora de compostos xofrados (principalmente metanotiol e disulfuro de dimetilo).

Avaliación da produción de aminos bioxénicas

As aminos bioxénicas son compostos nitroxenados que se forman durante a transformación dos aminoácidos dos alimentos e que, en grandes concentracións, poden resultar tóxicas. Estas aminos chámanse bioxénicas por ser o resultado da acción de organismos vivos. Unha das aminos máis perigosas é a histamina. Por este motivo, os investigadores avaliaron a posible presenza das principais aminos bioxénicas mediante cromatografía líquida de alta resolución en

fase reversa (RP-HPLC, ou Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography). Os autores comprobaron que varias das especies de lévedos eran capaces de producir aminos de escaso interese sanitario, como **tiramina e triptamina**. Malia que algúns cultivos de *Y. lipolytica* foron produtores de **histamina**, os investigadores observaron que as concentracións eran demasiado baixas para supoñer un risco dende o punto de vista da seguridade alimentaria.

Conclusións

Despois de estudar polo miúdo as propiedades de 101 cepas de lévedos illadas de 21 queixos galegos das variedades Arzúa-Ulloa, Tetilla e Cebreiro, os investigadores concluíron que, por unha banda, a especie *Yarrowia lipolytica* podería empregarse como cultivo adxunto na elaboración de queixos Arzúa-Ulloa e Tetilla, nos cales é desexable unha lipólise temperá coa formación de ácidos graxos libres e ésteres responsables de aromas característicos dos produtos tradicionais. Por outra banda, *Kluyveromyces lactis* presenta un interese potencial como cultivo adxunto ou co-iniciador na elaboración do queixo Cebreiro, debido á súa capacidade para producir alcohois e ésteres, particularmente acetatos, responsables de matices aromáticos alcohólicos e afroitados. A produción moderada de gas non sería un problema dada a textura granulosa e friable do queixo Cebreiro. 🍀