

CONTENIDO DE DIACETILO EN QUESO VENEZOLANO TIPO PALMITA

Diacetyl Content in Venezuelan Palmita Type Cheese

Lilibeth Cabrera, Alexis Ferrer y Graciela Ojeda de Rodríguez

*Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.
Apartado 526, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Teléfono 0261-7598107. E-mail: cabrerallibeth@latinmail.com*

RESUMEN

Veinte muestras de queso venezolano tipo Palmita, proveniente de dos expendios comerciales en la ciudad de Maracaibo, fueron analizadas en su contenido de diacetilo durante un lapso experimental de cinco semanas. Las muestras de queso fueron sometidas a destilación para recuperar el diacetilo formado. A 10 ml del destilado de cada queso, se le adicionó 0,5 ml de o-fenilendiamina y 2 ml de HCl para obtener valores de absorbancia del diacetilo a 340 nm, en un espectrofotómetro-UV Perkin-Elmer, λ 3- β . La concentración de diacetilo en cada muestra de queso se obtuvo a través de una curva estándar. Los resultados revelaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los quesos analizados. Las concentraciones de diacetilo variaron entre niveles de 0,92 y 6,92 ppm, los cuales están dentro del rango encontrado en los quesos Emmental, Cheddar y Parmesano.

Palabras clave: Diacetilo, queso Palmita, espectrofotometría UV.

ABSTRACT

Twenty samples of Palmita type Venezuelan cheese coming from two commercial stores located in Maracaibo City, were analyzed to determine the content of diacetyl during an experimental period of five weeks. The samples were subjected to distillation in order to recover the diacetyl. To 10 ml samples taken from each cheese distillate, 0.5 ml of o-phenylendiamine and 2 ml HCL were added, in order to obtain diacetyl absorbance values at 340 nm in a Perkin-Elmer, λ 3 β UV spectrophotometer. The diacetyl concentration in each cheese sample was obtained from a standard curve. The data was processed by unilateral (one-sided) ANOVA. The results showed significant differences ($P < 0.05$) between the cheese samples analyzed. The diacetyl concentrations varied between

0.92 and 6.92 ppm, which are within the ranges found in Emmental, Cheddar, and Parmesan cheeses.

Key words: Diacetyl, Palmita cheese, UV spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

El diacetilo es una dicetona, responsable del aroma del queso, leche fermentada, mantequilla, yogurt, cerveza, vino y jugo de frutas [13]. Este compuesto se produce como consecuencia de reacciones metabólicas por parte de microorganismos en dichos alimentos [18]. En el queso, el diacetilo se forma por la presencia de bacterias ácido lácticas en la leche, que hidrolizan la lactosa a través de la ruta metabólica de Entner-Doudoroff [13].

El contenido de diacetilo en alimentos, ha sido estudiado utilizando métodos analíticos cromatográficos, polarográficos, espectrofluorimétricos y espectrofotométricos [2, 24]. La espectrofotometría UV ha permitido la determinación de diacetilo en queso [13] y en cultivos iniciadores [4].

Los valores de concentración de diacetilo en los quesos, varían dependiendo de la variedad de los mismos. Así se reportan valores de 2,9 ppm, 1,9 ppm, 0,16-3,35 ppm, 1,14-2,85 ppm, en los quesos Emmental, Roquefort, Cheddar y Parmesano, respectivamente.

Hasta ahora no hay ninguna literatura acerca del contenido de diacetilo en quesos frescos, y específicamente en queso tipo Palmita. El interés se ha centrado en el estudio de la concentración de diacetilo en productos lácteos tales como yogurt [22], quesos madurados [2, 15, 16, 19, 21, 30] y cultivos iniciadores [17, 20, 23]. En el queso venezolano tipo Palmita sólo se ha llegado a estudiar la producción de compuestos aromáticos (diacetilo y acetaldehído) por parte de bacterias ácido lácticas aisladas del mismo y sembradas en cultivos en leche descremada [4, 5].

En el orden de conocer compuestos asociados con el sabor y aroma en los quesos, los cuales son indicativos de su

calidad organoléptica, se planteó en el presente estudio, determinar el contenido de diacetilo en el queso venezolano tipo Palmita, utilizando la técnica de espectrofotometría UV, y de esta forma relacionar los valores encontrados con los aportados por las cepas bacterianas implicadas en dicho queso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de queso tipo Palmita

Las muestras de queso tipo Palmita, correspondientes a dos productores: A (A1 – A10) y B (B1 – B10), fueron obtenidas de dos expendios situados en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia. Se muestrearon 500 g de queso por productor/expendio, con un total de cuatro muestras semanales, durante cinco semanas de muestreo.

Determinación de diacetilo

Para la determinación de diacetilo se utilizó la metodología descrita por Álvarez y col. [1], estandarizada para cultivos iniciadores [4]. Cada muestra de queso, por duplicado, fue triturada en un mortero, tomando una cantidad representativa de 50g y llevada a un volumen de 100 ml de agua destilada. Esta mezcla fue colocada en un balón de 250 ml y destilada a una temperatura de 90°C por un período de 15 a 20 min, utilizando un baño de glicerol, hasta obtener un volumen de 25 ml en un balón aforado sumergido en hielo. 10 ml del destilado fue mezclado con 0,5 ml de una solución de o-fenilendiamina (10 g/L en HCl, 4 mol/L) bajo oscuridad durante 25 min, luego se añadió 2 ml de ácido clorhídrico (HCl, 4 M).

Determinación de las concentraciones de diacetilo

Para la determinación de las concentraciones de diacetilo, el destilado tratado con los reactivos, se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm (verificado previamente a través de una corrida espectrofotométrica a varias longitudes de onda) en un espectrofotómetro-UV Perkin Elmer, lambda 3, utilizando celdas ópticas de sílice de 10 mm [4]. Las lecturas se hicieron contra un blanco de agua destilada (lecturas de 0,09 ppm). La concentración de diacetilo fue obtenida a partir de una curva estándar de diacetilo (Fischer S.C., New Jersey), con patrones de concentraciones desde 0,5 y 8 ppm y con un rango de coeficiente de correlación de $r = 0,988 - 0,999$.

Recuperación de diacetilo

Se llevó a cabo según lo descrito por Cabrera y col. [4], utilizando muestras de queso con o sin un estándar conocido y aplicándole el procedimiento analítico descrito por Álvarez y col. [1].

Análisis Estadístico

En este estudio se aplicó el diseño aleatorizado a las concentraciones de diacetilo en los quesos, a través del "Análisis de Varianza Unilateral". Cuando el análisis detectó diferen-

cias significativas ($P < 0,05$) se realizaron comparaciones de medias, mediante el procedimiento de Fisher, la mínima diferencia significativa (MDS) [26], según el paquete estadístico S.A.S., versión 6,02 [27].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La TABLA I muestra los valores de diacetilo en ppm presentes en los quesos analizados. Los resultados muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) con valores entre 0,92 y 6,92 ppm. En relación al Productor, se observa que hubo una gran variabilidad entre las concentraciones encontradas en las muestras correspondientes al Productor "A", lo cual no fue así en el Productor "B". Esta variabilidad podría deberse a la leche, al manejo de la misma, al proceso tecnológico y al cultivo iniciador utilizado en la elaboración de los quesos [6]. Al conocerse que son las bacterias ácido lácticas las responsables de la producción de compuestos como el diacetilo, es posible que

TABLA I
VALORES PROMEDIOS EN PPM, DESVIACIÓN
ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
DE DIACETILO EN 20 MUESTRAS
DE QUESO VENEZOLANO TIPO PALMITA

Muestra de queso	Diacetilo x	DE (±)	CV (%)
A1	4,40 ^b	0,28	6,43
A2	4,12 ^{bc}	0,01	0,34
A3	1,75 ^{efg}	0,21	12,12
A4	3,08 ^{cd}	0,11	3,45
A5	6,92 ^a	0,01	0,20
A6	2,58 ^{def}	0,82	31,79
A7	4,63 ^b	0,11	2,29
A8	2,80 ^{de}	1,06	38,57
A9	2,00 ^{defg}	0,14	7,07
A10	2,13 ^{defg}	0,01	0,33
B1	1,75 ^{efg}	0,35	20,20
B2	1,49 ^{efg}	0,02	1,43
B3	1,96 ^{defg}	0,01	0,72
B4	1,04 ^g	0,04	3,42
B5	1,99 ^{defg}	0,01	0,36
B6	1,35 ^{fg}	0,07	5,24
B7	0,92 ^g	0,03	3,07
B8	1,39 ^{fg}	0,01	1,02
B9	1,53 ^{efg}	0,01	0,92
B10	1,74 ^{efg}	0,01	0,41

DE: Desviación Estándar, CV: Coeficiente de Variación. a, b y c: Letras distintas en una misma columna indican medias que difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

en la elaboración de los quesos del Productor "A", el cultivo iniciador esté constituido por cepas diferentes de una misma especie bacteriana, que producen concentraciones de diacetilo diferentes [25]. En la literatura se reporta que la concentración de diacetilo producida por bacterias presentes en el queso venezolano tipo Palmita, varía dependiendo de la cepa bacteriana [4]. En la TABLA II se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en cuanto a los valores promedios de concentración de diacetilo entre los dos Productores A y B. En este caso, la mayor concentración observada en los quesos del Productor A, quizás fue debida a diferencias en cuanto al inóculo utilizado, constituido por cepas bacterianas, mayor productoras de diacetilo. De hecho, el queso tipo Palmita presenta una microflora constituida principalmente por especies de *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus casei* [11], a las cuales se les ha detectado niveles promedios de diacetilo entre valores del 12,0 y 13,2 ppm, en cultivos simples y de niveles comparables con los obtenidos en el presente estudio, en cultivos múltiples [4]. Son varios los autores que resaltan el papel tecnológico de las especies bacterianas antes mencionadas, en cuanto a la generación de compuestos que proporcionan sabor en productos lácteos [3, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 19, 23, 29], en concentraciones que resultan diferentes, en relación a la especie y a la cepa, cuando son cultivadas en leche [4].

El contenido de diacetilo en los quesos ha sido ampliamente estudiada en quesos tales como Emmental, Cheddar y Parmesano, donde se han obtenido concentraciones de 2,9 ppm, 0,16-3,35 ppm, 1,14-2,85 ppm, respectivamente [13, 24]. Hasta ahora no se ha encontrado literatura referente a valores de concentraciones de diacetilo en quesos frescos, sino en quesos con grados diversos de maduración. No obstante, el conocimiento del umbral de diacetilo en quesos frescos, como el Palmita, resulta importante, en el sentido, de conocer su calidad organoléptica. En el presente estudio, los valores se encontraron dentro de lo reportado para mantequilla, y en niveles superiores en comparación con el queso Kefalotyri de Grecia, donde después de seis meses de maduración los niveles promedios de diacetilo están en el orden de 0,75 ppm [21]. Está claro que dentro de los quesos, existen variabilidades en la cantidad de compuestos volátiles, como consecuencia de las diferencias metabólicas que muestran las diferentes cepas bacterianas ácido lácticas [25].

Según lo descrito en la literatura, el interés sobre el conocimiento del contenido de dicetonas vecinales, tales como el

diacetilo, reside en la información acerca de la calidad organoléptica del producto lácteo [28], que promueve en cierto modo, la elevada degustación por parte del consumidor [16]. A su vez introduce controles en la producción de queso. La evaluación sensorial de los quesos [14], la aceptación en cuanto al sabor, es una práctica que aporta los niveles adecuados de concentración de diacetilo [13]. Zeppa y col. [30] resaltan la importancia del conocimiento de dicetonas vecinales, así como de los niveles de azúcares y ácidos orgánicos, en función de contribuir con la evaluación fermentativa microbiana.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación indicaron variabilidad en la concentración de diacetilo de los quesos, dentro y entre los Productores. La poca variabilidad en el contenido de diacetilo en los quesos del Productor "B" revela una mejor calidad organoléptica con respecto al Productor "A" y esto pudiera incrementar su comercialización.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar determinaciones de otras dicetonas vecinales, así como del acetaldehído en dichos quesos, para contar con un conocimiento del perfil de compuestos aromáticos presentes.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), por el financiamiento de esta investigación, así como al Laboratorio de Espectroscopia del Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, por habernos facilitado el espectrofotómetro-UV Perkin Elmer, $\lambda 3 \beta$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVAREZ, B.; FERNÁNDEZ, E.; DELGADO, M.; FERRETE, F. Vicinal diketones in beer. Part I: A modified EBC method for the determination of diacetyl and other vicinal diketones in beer. **J. Inst. Brew.** 95: 21-23.1989.
- [2] BEDNARSKI, W.; JEDRYCHOWSKI, L.; HAMMOND, E.; NICOLOV, Z. A method for the determination of alpha-dicarbonyl compounds. **J. Dairy Sci.** 72: 2474-2477. 1990.
- [3] BRANEN, A.; KEENAN, T. Diacetyl and acetoin production by *Lactobacillus casei*. **Appl. Microbiol.** 22: 517-521. 1971.
- [4] CABRERA, L.; FERRER, A.; OJEDA DE R., G.; PÉREZ, L. Producción de diacetilo en leche por cultivos iniciado-

TABLA II
VALORES PROMEDIOS EN PPM, EN LOS QUESOS
VENEZOLANOS TIPO PALMITA

Productor	Concentración (ppm)
A	3,44 ^a
B	1,52 ^b

a, b: Letras distintas en una misma columna indican medias que difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

- res simples y múltiples. **Rev. Cient. FCV-LUZ**, Vol. VIII (4): 366-371. 1998.
- [5] CABRERA, L.; FERRER, A.; OJEDA DE R., G.; COLINA, G. Producción de acetaldehído en leche por cultivos iniciadores simples y múltiples. **Rev. Cient. FCV-LUZ**, Vol. XI (1): 47-52. 2001.
- [6] CARUNCHIA, M.; PARKER, J.; DRAKE, M.; LARICK, D. Determining flavor and flavor variability in commercially produced liquid cheddar whey. **J. Dairy Sci.** 86:439-448. 2003.
- [7] EL-GENDY, S.; ABDEL-GALID, H.; SHALIN, Y.; HE-GAZI, F. Acetoin and diacetyl production by homo and heterofermentative lactic acid bacteria. **J. Food Prot.** 46:420-425. 1983.
- [8] EL-GENDY, S.; ABDEL-GALID, H.; SHALIN, Y.; HE-GAZI, F. Acetoin and diacetyl production by *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*. **J. Food Prot.** 46:537-541. 1983.
- [9] EL-SAMRAGY, Y.; FAYED, E.; ALY, A.; HAGRASS, A. Properties of labneh-like product manufactured using *Enterococcus* starter cultures as novel dairy fermentation bacteria. **J. Food Prot.** 51:386-390. 1988.
- [10] FAYED, E.; HAGRASS, A.; ALY, A.; EL-SAMRAGY, Y. Use of enterococci starter culture in the manufacture of a yoghurt-like product. **Cult. Dairy Prod. J.** 24:16-18. 1989.
- [11] FERRER, A.; URDANETA, D.; RINCÓN, Z.; CABRERA, L.; BASANTA, Y. Microflora isolated from Venezuelan "Palmita-type" cheese. **J. Food Prot.** 54:856-860. 1991.
- [12] FERRER, A.; GRANADOS, A. Organic acids of low molecular weight in Palmita-type cheese. **Food Chem.** 45:311-317.1992.
- [13] GARCIA, R.; GARCIA, R. Diketonas vecinales en alimentos. Significado, origen y análisis. **Anal. Brom.** 39:291-296. 1987.
- [14] G'OSHEVA, B.; STEFANOVA, M.; BANKOVA, N.; DE-DOVA, P. Taste and aroma of white brined cheese. **Khanitel. Promishl.** 40:15-16. 1991.
- [15] HAGRASS, A.; FAYED, E.; ALY, A.; EL-SAMRAGY, Y. Growth characteristics of enterococci isolated from laban rayeb. **Nahrung** 35:209-213. 1991.
- [16] HARDI, J. GC Head space determination of the quality of Edam cheese concentrated aroma obtained from a model system. **Euro Food Chem.** 2:365-370. 1995.
- [17] KANEKO, T.; WATANABE, Y.; SUZUKI, H. Differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 and citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the characteristics of diacetyl production. **Appl. Environ. Microbiol.** 57:3040-3042. 1991.
- [18] KOSIKOWSKI, F. Cheese and fermented milk foods In: F. Kosikowski (ed). **Cultured and starters**. Kosikowski & Associate. New York, 16-17pp. 1987.
- [19] LEE, W. Production of diacetyl (2,3-butanedione) by continuous fermentation with simultaneous product separation. **Dessert. Abst. Internat.** 52:3738. 1992.
- [20] LIBUDZISZ, Z.; GALEWSKA, E. Citrate metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* strains. **Nahrung** 35:611-618. 1991.
- [21] LITOPOULOU, E.; VAFOPOULOU, A. Diacetyl and Acetaldehyde concentrations during ripening of Kefalotyri cheese. **J. Food Sci.** 53:663-664. 1988.
- [22] MATSUURA, H.; FUJIYAMA, K.; MINAGAWA, N.; SAWA, J. Determination of acetoin, diacetyl and acetaldehyde in foods by HPLC. **Bunseki Kagaku** 39:405-409. 1990.
- [23] MENÉNDEZ, S.; CENTERO, J.; GODINEZ, R.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. Some technological properties and enzymatic activities of strains of *Enterococcus faecalis* isolated from Cebreiro cheese. **Alimentaria** 296:71-76.1998.
- [24] MONZANI, A.; PLESSI, M.; COPPINI, D. Acetoin and diacetyl in Parmesan cheese. **Dairy Sci. Abst.** 42:447-449. 1979.
- [25] SEEFELDT, K.; WEIMER, B. Diversity of sulfur compound production in lactic and acid bacteria. **J. Dairy Sci.** 83:2740-2746. 2000.
- [26] SNEDECOR, G.; COCHRAN, W. **Statistical methods**. 6 Ed. Iowa State University Press. Iowa, U.S.A. 91-104 pp. 1974.
- [27] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. PROC. GLM. **SAS Users Guide: Statistics**. 5th Edition. Version 6.02. Cary NC. USA.1990.
- [28] XANTHOPOULOS, V.; PICQUE, D.; BASSIT, N.; BO-QUIEN, C.; CORRIEU, G. Methods for the determination of aroma compounds in dairy products: a comparative study. **J. Dairy Res.** 61:289-297. 1994.
- [29] YU, J.; NAKANISHI, T. Studies on production of flavour constituents by various lactic acid bacteria. II. Effect of milk fat on formation of volatile carbonyl compounds by various lactic acid bacteria. **Japan J. Dairy Sci.** 24:A27-A31. 1995.
- [30] ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of organic acids, sugar, diacetyl and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 49: 2722-2726. 2001.